

M. Magdalena Mora Salazar

MEMORIA

Para optar al título de doctora en Ciencias Químicas

“MODELIZACIÓN DEL PROCESO DE INTERACCIÓN DE LOS ANALGÉSICOS
NICOTÍNICOS FRENTE AL SUBTIPO $\alpha 4\beta 2$ DEL RECEPTOR nAChR”

Tesis dirigida por los Drs.: Camelia Muñoz Caro y Alfonso Niño Ramos

Grupo QCYCAR

E.S.I. Universidad de Castilla La Mancha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Química

Madrid, 2008

Al espíritu indomable de mi madre.

Al amor a la vida de mi padre.

A la paciencia de mis hermanos.

A los silencios de mi marido.

A la felicidad de mis hijos.

A la inocencia de mis nietos.

Un camino de mil millas comienza por un solo paso
(Proverbio chino)

Quiero expresar mi agradecimiento a los doctores Camelia Muñoz Caro y Alfonso Niño Ramos sin cuya paciencia y empuje este trabajo no habría visto la luz. Al Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Madrid, y en particular a la Dra. Otilia Mó, por aceptar actuar como mi tutora. A la Universidad de Castilla La Mancha por su soporte y ayuda. También agradezco a los profesores de los cursos de doctorado de Salamanca 2002 la magnífica calidad de su formación, y a mis compañeros su inestimable ayuda. Muchas gracias también a todos mis compañeros del grupo de QCYCAR, Mamen, Norma, Maru, Sebastián, María y Javi-Sergio, así como mi cariño a Paco. Un recuerdo muy especial a los profesores Julia Muela, que me llevaba a la escuela, Alicia y Daniel que se saltaron las normas y Cristóbal Pérez que me enseñó a pensar. A mi marido, porque siempre ha estado ahí y a mi hermano Miguel Ángel, por sus palabras de ánimo. Gracias a mis amigos Camelia (que me enseñó a respirar) y Alfonso. Y gracias sobre todo a mi madre, a quien todavía hoy le hace ilusión colgar un título de sus hijos en la pared.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN.	1
CAPÍTULO II.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.	5
2.1.- Introducción.	5
2.2.- La ecuación de Schrödinger molecular.	6
2.3.- La aproximación de Born-Oppenheimer.	7
2.4.- Principio variacional.	9
2.5.- Determinante de Slater.	12
2.6.- Ecuaciones de Hartree-Fock.	13
2.7.- Las ecuaciones de Roothaan-Hall.	15
2.8.- Métodos Ab-initio y semiempíricos.	17
2.9.- Funciones de base y cálculos SCF.	18
2.10.- Correlación electrónica. Métodos post Hartree-Fock.	22
2.11.- Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).	28
2.12.- La hipersuperficie de Energía Potencial. Puntos críticos.	31
2.13.- Evaluación de propiedades termodinámicas.	33
2.14.- Efecto del disolvente.	38
2.14.1.- Método de Onsager-cuántico SCRF.	40
2.14.2.- Modelo del continuo polarizable PCM.	43
2.15.- Análisis de semejanza.	45
2.16.- Mecánica Molecular (MM).	47
2.16.1.- Campos de Fuerza (FF)	48
2.16.2.- Docking.	49
2.16.3.- Funciones de scoring o idoneidad	52

CAPÍTULO III.- EL PROBLEMA BIOLÓGICO.	55
3.1.- Mecanismo General de actividad farmacológica.	55
3.1.1.- Interacción (llave-cerradura).	55
3.1.2.- Agonista. Antagonista.	57
3.1.3.- Concepto de farmacoforo.	58
3.1.4.- Actividad.	59
3.2.- Dolor y analgesia.	62
3.3.- Analgésicos nicotínicos.	63
3.3.1.- Acetilcolina y receptores.	63
3.3.2.- Receptor nicotínico.	64
3.3.3.- Epibatidina.	66
3.3.4.- Nuevos analgésicos nicotínicos.	68
3.3.5.- Farmacoforo y sitio receptor.	73
3.3.6.- Problemas pendientes.	75
CAPÍTULO IV.- METODOLOGÍA.	77
4.1.- Definición de geometrías, ángulos diedros y Matriz Z.	78
4.2.- Desarrollo de la función de partición rotovibracional.	91
4.3.- Distancias internitrógeno.	98
4.4.- Índices de semejanza.	99
4.5.- Acoplamiento Molecular.	99
CAPÍTULO V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	103
5.1.- Estudio de la forma protonada de la molécula de ABT-594.	103
5.1.1.- Valores de energía.	104
5.1.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.	116
5.1.3.- Distancia internitrógeno.	117

5.2.- Estudio de la forma protonada de la molécula de epibatidina.	121
5.2.1.- Valores de energía.	121
5.2.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.	127
5.2.3.- Distancia internitrógeno.	129
5.3.- Estudio de la forma protonada de la molécula de DBO-83 (Bote).	132
5.3.1.- Valores de energía.	132
5.3.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.	139
5.3.3.- Distancia internitrógeno.	141
5.4.- Estudio de la forma protonada de la molécula de DBO-83 (Silla).	143
5.4.1.- Valores de energía.	143
5.4.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.	150
5.4.3.- Distancia internitrógeno.	152
5.5.- Estudio de la forma protonada de la molécula de nicotina.	154
5.5.1.- Valores de energía.	154
5.5.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.	161
5.5.3.- Distancia internitrógeno.	163
5.6.- Estudio comparativo de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 (B), DBO-83 (S) y nicotina.	165
5.6.1.- Valores de energía.	165
5.6.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.	166
5.6.3.- Distancia internitrógeno.	166
5.6.4.- Semejanza.	167

5.7.- Estudio de acoplamiento molecular (molecular docking) con el subtipo $\alpha 4\beta 2$ del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 (B), DBO-83 (S) y nicotina.	170
5.7.1.- Molécula de ABT-594	171
5.7.2.- Molécula de epibatidina	172
5.7.3.- Molécula de DBO-83 (B).	173
5.7.4.- Molécula de DBO-83 (S).	174
5.7.5.- Molécula de nicotina.	175
5.7.6.- Acoplamiento Ligando-Receptor.	176
CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	187
ÍNDICE DE TABLAS	203
ÍNDICE DE FIGURAS	207
APÉNDICE	215

Capítulo I

Introducción

El presente estudio se enmarca dentro de una de las líneas de trabajo del grupo de investigación en Química Computacional y Computación de Alto Rendimiento (QCyCAR) de la Universidad de Castilla La Mancha. Dicha línea es la relativa a la modelización de compuestos bioactivos y en particular a la modelización de los analgésicos nicotínicos.

El proceso de obtención de nuevos fármacos lleva implícito muchos años de trabajo de investigación y pruebas de laboratorio, tanto en animales como en humanos. Por esta razón, el desarrollo de un nuevo fármaco requiere de una fuerte inversión económica. El objetivo del proceso de desarrollo de nuevos fármacos es sintetizar compuestos que sean potentes, tengan una alta especificidad y mínimas reacciones adversas, con una inversión temporal y económica mínimas. En este contexto, los métodos y técnicas teóricos y computacionales se han convertido en herramientas extremadamente útiles para el estudio y diseño de nuevos compuestos bioactivos.

Este trabajo presenta, mediante la aplicación de diversas técnicas computacionales, un estudio del mecanismo de acción de los analgésicos nicotínicos ABT-594, epibatidina, DBO-83 en sus formas silla y bote y nicotina frente al receptor nicotínico. Para ello, se han considerado las formas protonadas (activas) de dichos compuestos en vacío y en disolución acuosa.

Los objetivos perseguidos son los siguientes:

Objetivo General

Caracterizar el modo de actuación de los agonistas nicotínicos frente al subtipo $\alpha 4\beta 2$ del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR).

Objetivos específicos

- 1.- Identificar los conformeros más estables desde el punto de vista energético y los que presentan mayor población a temperatura fisiológica.
- 2.- Establecer las semejanzas moleculares entre los conformeros preferidos de las distintas moléculas a fin de establecer patrones comunes.
- 3.- Identificar el sitio receptor realizando el acoplamiento con el receptor nicotínico de los distintos ligandos considerados utilizando técnicas de *molecular docking*.
- 4.- Establecer si en el sitio receptor los ligandos se comportan como en vacío o como en disolución.
- 5.- Definir las características del farmacoforo nicotínico.
- 6.- Identificar las interacciones responsables del enlace.

El trabajo se ha estructurado de la siguiente forma:

Capítulo I. En el que nos encontramos y que presenta el alcance y la organización del estudio realizado.

Capítulo II. Se desarrollan los fundamentos teóricos en los que se basan las herramientas de estudio que se han utilizado.

Capítulo III. Se realiza una presentación de los conceptos farmacológicos que fundamentan nuestra línea de trabajo y los antecedentes relativos a los compuestos objeto del actual estudio.

Capítulo IV. Describe la metodología utilizada en las distintas fases de los trabajos realizados.

Capítulo V. Se detallan los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos.

Capítulo VI. Se presentan las conclusiones alcanzadas como resultado de este trabajo.

Por último se recoge la Bibliografía utilizada, los índices de las tablas y figuras y un Apéndice donde se incluyen los artículos publicados o en vías de publicación correspondientes al presente estudio.

Capítulo II

Fundamentos teóricos

2.1.- Introducción.

En el presente trabajo, se aplican técnicas de modelización molecular utilizando modelos de mecánica cuántica y molecular y métodos computacionales. Por ello, comenzaremos con una exposición de los mismos.

En los comienzos de los estudios mecanocuánticos, en los que, obviamente, no existían los recursos computacionales actuales, el tratamiento no se podía aplicar más allá de sistemas atómicos, diatómicos o altamente simétricos, los cuales se podían resolver manualmente. La aparición de los computadores y programas especializados ha permitido la extensión de estos estudios a sistemas complejos, reales, de interés práctico.

La mecánica cuántica representa explícitamente los electrones en los cálculos, siendo así posible obtener propiedades que dependen de la distribución electrónica y en particular investigar reacciones químicas, en las cuales se rompen y forman enlaces.

En este contexto, se han desarrollado varias teorías, de las cuales la más utilizada es la *teoría de orbitales moleculares*. Dentro de la misma, se han introducido diversas aproximaciones que han dado lugar a distintos métodos de cálculo, más o menos especializados en la resolución de los distintos tipos de problemas. Así,

encontramos los métodos ab-initio y semiempíricos, siendo los primeros los que interesan de manera particular en nuestro trabajo.

Nuestro sujeto de estudio es un conjunto de entidades cuánticas (núcleos y electrones), por lo cual nuestro punto de partida es la *ecuación de Schrödinger molecular*. Así, a través de modelos y aproximaciones adecuados, podremos establecer con razonable precisión los valores de la energía y diversos observables para los sistemas moleculares.

2.2.- La ecuación de Schrödinger molecular.

La ecuación de Schrödinger de un sistema cualquiera es una ecuación diferencial de valores propios simbolizada como:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}) = E\Psi(\mathbf{r}) \quad (1)$$

donde \hat{H} es el operador Hamiltoniano que viene dado por:

$$\hat{H} = \hat{T} + V \quad (2)$$

siendo \hat{T} el operador de energía cinética, V el de energía potencial, y Ψ la función de onda, que contiene toda la información acerca del sistema, siendo el valor propio E la energía del sistema en el estado definido por Ψ .

El Hamiltoniano no relativista para un sistema de N núcleos con masas M_A y cargas Z_A y M electrones, usando unidades atómicas y considerando solamente interacciones de tipo electrostático, se puede formular como:

$$\hat{H} = \hat{T}_N + \hat{T}_e + V_{eN} + V_{ee} + V_{NN} \quad (3)$$

donde el subíndice e representa la parte electrónica, y el subíndice N la parte nuclear. En forma desarrollada el Hamiltoniano es:

$$\hat{H} = -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^M \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^M \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^M \sum_{j>i}^M \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (4)$$

En esta formulación, la parte nuclear describe todos los movimientos de núcleos (rotación y vibración) y la parte electrónica da cuenta de los fenómenos netamente químicos, como rotura y formación de enlaces. El problema central de la química cuántica es la resolución de la ecuación de Schrödinger que se plantea con este Hamiltoniano.

2.3.- La aproximación de Born-Oppenheimer.

Al ser los núcleos mucho más pesados que los electrones, si repartimos equitativamente la energía entre núcleos y electrones, estos últimos se moverán en promedio mucho más rápidamente que aquellos. Podemos suponer que un electrón realizará todo su ciclo de movimiento antes de que los núcleos hayan variado apreciablemente su posición, con lo cual podemos considerar independientemente el movimiento de los núcleos y el de los electrones, pudiendo separar los términos en la ecuación de Schrödinger. Así, partiendo del Hamiltoniano molecular (4), el Hamiltoniano puramente electrónico sería:

$$\hat{H}_{elec} = -\sum_{i=1}^M \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^M \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=j}^M \sum_{j>i}^M \frac{1}{r_{ij}} \quad (5)$$

que se corresponde con la ecuación de valores propios:

$$\hat{H}_{elec} \Phi_{elec} = E_{elec} \Phi_{elec} \quad (6)$$

donde:

$$E_{elec} = E_{elec}(\mathbf{R}_A) \quad (7)$$

$$\Phi_{elec} = \Phi_{elec}(\mathbf{r}_i; \mathbf{R}_A) \quad (8)$$

y la energía total para núcleos fijos es:

$$E_{total} = E_{elec} + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (9)$$

en donde se recoge el planteamiento de la aproximación de Born-Oppenheimer respecto al movimiento electrónico y nuclear (Born y Oppenheimer, 1927; Born y Huang, 1968): *la función de onda electrónica depende paramétricamente de las coordenadas nucleares.*

Analícemos con más detalle este punto. Si operamos sobre el Hamiltoniano total y promediamos sobre las coordenadas electrónicas, obtendremos el Hamiltoniano nuclear:

$$\hat{H}_{nucl} = -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \left\langle \Phi_{elec} \left| -\sum_{i=1}^M \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^M \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^M \sum_{j>i}^M \frac{1}{r_{ij}} \right| \Phi_{elec} \right\rangle + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (10)$$

es decir:

$$\hat{H}_{nucl} = -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E_{elec}(\mathbf{R}_{AB}) + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (11)$$

o, de otra forma:

$$\hat{H}_{nucl} = -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E_{total}(\mathbf{R}_{AB}) \quad (12)$$

Lo que nos indica que *la energía total para núcleos fijos define el potencial para el movimiento nuclear* (Born y Oppenheimer, 1927; Born y Huang, 1968).

Esa energía total depende de las $3N-6$ coordenadas necesarias para especificar la posición relativa de los N núcleos. La E_{total} está definida en un espacio $3N-6$

dimensional y se denomina *hipersuperficie de energía potencial*. Para estudiar movimientos de núcleos, como vibraciones moleculares, hay que trabajar con esta hipersuperficie.

2.4.- Principio variacional.

Todo estudio de interés químico de una molécula empieza por la resolución de la ecuación de Schrödinger puramente electrónica, si bien esta ecuación solo es resoluble analíticamente en casos triviales como la molécula ión de Hidrógeno (H_2^+). Por lo tanto, habremos de recurrir a métodos aproximados de resolución. En particular, podemos utilizar el principio variacional, que aplicado al estado fundamental de una molécula constituye el teorema de Ritz (Levine, 2000): *la energía del estado fundamental calculada con una función de onda aproximada es siempre un límite superior de la energía exacta*.

Se puede demostrar el teorema considerando Ψ' como la función aproximada y Ψ la función exacta, ambas normalizadas a la unidad. La energía promedio se puede calcular como:

$$\langle E \rangle = \frac{\langle \Psi' | \hat{H} | \Psi' \rangle}{\langle \Psi' | \Psi' \rangle} \geq E_0 \quad \text{o bien} \quad (13)$$

$$(\langle \Psi' | \hat{H} | \Psi' \rangle - \langle \Psi' | \Psi' \rangle E_0) \geq 0$$

Teniendo en cuenta que E_0 (energía del estado fundamental) es una constante, la ecuación (13) se puede escribir como:

$$(\langle \Psi' | \hat{H} | \Psi' \rangle - \langle \Psi' | E_0 | \Psi' \rangle) \geq 0 \quad (14)$$

o:

$$\langle \Psi' | \hat{H} - E_0 | \Psi' \rangle \geq 0 \quad (15)$$

Definiendo un conjunto de funciones de base Ψ_i constituido por las funciones propias para todos los estados, se puede expandir Ψ' como una combinación lineal de las mismas:

$$\Psi' = \sum_i c_i \Psi_i \quad (16)$$

Sustituyendo en (15), se obtiene:

$$\left(\langle \sum_i c_i \Psi_i | \hat{H} | \sum_j c_j \Psi_j \rangle - E_0 \right) \geq 0 \quad (17)$$

Como las Ψ_i son funciones propias del Hamiltoniano con valor propio E_i , y además son ortonormales, el resultado es:

$$\sum_i |c_i|^2 (E_i - E_0) \geq 0 \quad (18)$$

Puesto que E_0 es la energía más baja, las diferencias $E_i - E_0$ son siempre positivas, lo que completa la demostración.

La ecuación (16) supone un desarrollo exacto, conocidas todas las funciones de onda propias para todos los estados. A fin de minimizar los costes computacionales, se trabaja habitualmente con la mejor aproximación posible del tipo:

$$\Psi' \approx \sum_i c_i \Psi_i \quad (19)$$

Como se trata de buscar los coeficientes que minimizan la energía, podemos derivar con respecto a cada uno de los coeficientes e imponer la condición:

$$\delta E / \delta c_i = 0 \quad \forall i \quad (20)$$

Partimos de la energía media:

$$\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = \langle \Psi | E | \Psi \rangle \quad (21)$$

con:

$$\Psi = \sum_i c_i \phi_i \quad (22)$$

donde las ϕ_i forman un conjunto ortonormal pero no tienen por qué ser funciones propias del Hamiltoniano. Sustituyendo en (19), se obtiene:

$$\sum_i \sum_j c_i c_j \langle \phi_i | \hat{H} | \phi_j \rangle = E \sum_i \sum_j c_i c_j \langle \phi_i | \phi_j \rangle \quad (23)$$

derivando con respecto a c_k , para todo k:

$$\frac{\partial}{\partial c_k} \sum_i \sum_j c_i c_j \langle \phi_i | \hat{H} | \phi_j \rangle = E \frac{\partial}{\partial c_k} \sum_i \sum_j c_i c_j \langle \phi_i | \phi_j \rangle \quad \forall k \quad (24)$$

imponiendo la condición de mínimo y como las funciones son ortonormales, se obtiene:

$$\sum_i c_i [\langle \phi_k | \hat{H} | \phi_i \rangle - E \delta_{ij}] = 0 \quad \forall k \quad (25)$$

Se trata de un sistema lineal de ecuaciones, donde δ_{ij} es la delta de Kronecker, tal que $\delta_{ij} = 0$ cuando $i \neq j$, y $\delta_{ij} = 1$ cuando $i = j$. La condición para que este sistema de ecuaciones sea resoluble es que el determinante de los coeficientes de las c_i sea igual a cero. Numéricamente, el problema se resuelve diagonalizando la matriz del hamiltoniano H cuyos elementos son $h_{ij} = \langle \phi_i | \hat{H} | \phi_j \rangle$. Los valores propios son los valores de energía para distintos niveles y cada vector propio proporciona los valores de las c_i que corresponden a cada energía.

2.5.- Determinante de Slater.

Con todo lo anterior, el problema de resolver la ecuación de Schrödinger para una molécula, se puede plantear construyendo una función de onda inicial que luego se refine utilizando el principio variacional. Si tenemos N electrones, la aproximación más sencilla es utilizar una función de onda para cada electrón (orbital molecular) independiente de los demás. Si introducimos el spin y lo consideramos independiente de la parte espacial, nos encontramos con dos funciones distintas para cada valor propio de spin denominadas spinorbitales (Leach, 1996). Los spinorbitales se representan por:

$$\begin{aligned}\psi(x_i) &= \phi(r_i) \alpha(\omega) \\ \psi(x_{i+1}) &= \phi(r_i) \beta(\omega)\end{aligned}\tag{26}$$

donde ϕ es la parte espacial y ω es la coordenada de spin.

De esta forma se establece la primera aproximación, la aproximación orbital, que plantea generar la función de onda polieletrónica como un producto de orbitales moleculares monoeléctricos, de la forma

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) = \psi(x_1) \psi(x_2) \cdots \psi(x_N) = \prod_i^N \psi(x_i)\tag{27}$$

expresión conocida como Producto de Hartree (Hartree, 1928).

Ahora bien, la formulación del Producto de Hartree no considera ninguna correlación entre los electrones. Teniendo en cuenta que los electrones son fermiones (spin semientero), el principio de exclusión de Pauli indica que deben estar descritos por funciones de onda antisimétricas. La forma más sencilla de conseguir una función de onda antisimétrica es usar un determinante de la forma:

$$\Psi = (N!)^{-1/2} \begin{vmatrix} \psi_1(x_1) & \psi_2(x_1) & \dots & \psi_N(x_1) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \psi_1(x_N) & \psi_2(x_N) & \dots & \psi_N(x_N) \end{vmatrix}\tag{28}$$

donde el término $(N!)^{-1/2}$ es un factor de normalización.

Este determinante se denomina de Slater, garantiza que la función de onda sea antisimétrica y contempla la correlación electrónica de intercambio o canje entre electrones del mismo spin.

2.6.- Ecuaciones de Hartree-Fock.

Así pues, es posible resolver variacionalmente el Hamiltoniano electrónico molecular usando como función de prueba un determinante de Slater de spinorbitales. Para ello, calculamos el valor promedio de la energía con el Hamiltoniano dado en (5):

$$E_0 = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle \quad (29)$$

y, operando (Szabo y Ostlund, 1982), se obtiene:

$$E_0 = \sum_a \langle \Psi_a(r_1) | h(r_1) | \Psi_a(r_1) \rangle + \frac{1}{2} \sum_a \sum_b \langle \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) \rangle - \langle \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_b(r_1) \Psi_a(r_2) \rangle \quad (30)$$

donde el primer término es un término monoeléctrico, ya que no aparecen las coordenadas de más de un electrón, con h :

$$h(r_1) = -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} \quad (31)$$

El segundo término se denomina integral de Coulomb que tiene el análogo clásico de la repulsión interelectrónica. El tercer término se denomina integral de canje, consecuencia de la antisimetría de la función de onda de los electrones, y no tiene análogo clásico.

Las ecuaciones de Hartree-Fock (Hartree, 1928) se obtienen aplicando variaciones con la condición de que los orbitales moleculares se mantengan ortonormales. Para cada spinorbital, la ecuación de valores propios es:

$$f|\Psi_a\rangle = \epsilon_a |\Psi_a\rangle \quad \forall a=1, N \quad (32)$$

con el operador de Fock (f) definido como:

$$f(r_1) = h(r_1) + \sum_b j_b(r_1) - k_b(r_1) \quad (33)$$

y donde j y k son los operadores de Coulomb y de canje definidos por su efecto sobre un spinorbital como:

$$k_b(r_1) \Psi_a(r_1) = \left[\int dr_2 \Psi_b^*(r_2) r_{12}^{-1} \Psi_a(r_2) \right] \Psi_b(r_1) \quad (34)$$

$$j_b(r_1) \Psi_a(r_1) = \left[\int dr_2 \Psi_b^*(r_2) r_{12}^{-1} \Psi_b(r_2) \right] \Psi_a(r_1) \quad (35)$$

Así pues, resolviendo la ecuación de Schrödinger a través del método de Hartree-Fock, se realizan dos simplificaciones importantes:

- a) La repulsión coulombiana interelectrónica electrón a electrón se reemplaza por una repulsión promedio.
- b) Las ecuaciones para cada spinorbital son monoelectrónicas.

El método de resolución consiste en calcular el operador de Fock y resolver la ecuación de valores propios. Ahora bien, para calcular el operador de Fock son necesarios los orbitales. Claramente la solución a este problema pasa por la aplicación de un método iterativo. Dicho método se denomina *método del campo autoconsistente de Hartree-Fock* ó *SCF (Self Consistent Field)*.

2.7.- Las ecuaciones de Roothaan-Hall.

La resolución del sistema de ecuaciones de Hartree-Fock es un problema muy complejo, que se simplifica mediante el método de Roothaan y Hall (Roothaan, 1951; Hall, 1951). Este método se basa en expresar cada spinorbital como combinación lineal de funciones de base, que suelen ser orbitales atómicos centrados sobre cada núcleo:

$$\Psi_i = \sum_{\mu=1}^K c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (36)$$

Lo cual, sustituyendo en las ecuaciones de Hartree-Fock, produce:

$$f(r_1) \sum_{\mu} c_{\mu a} \chi_{\mu} = \epsilon_a \sum_{\mu} c_{\mu a} \chi_{\mu} \quad (37)$$

y, operando, se obtiene:

$$\sum_{\mu} f_{\mu\nu} c_{\nu a} = \epsilon_a \sum_{\nu} s_{\mu\nu} c_{\nu a} \quad (38)$$

donde $f_{\mu\nu}$ y $s_{\mu\nu}$ son elementos de matriz dados por:

$$\begin{aligned} f_{\mu\nu} &= \langle \chi_{\nu} | f(r_1) | \chi_{\mu} \rangle \\ s_{\mu\nu} &= \langle \chi_{\nu} | \chi_{\mu} \rangle \end{aligned} \quad (39)$$

y las $f_{\mu\nu}$ involucran integrales monoelectrónicas y bielectrónicas de coulomb y de canje.

Las ecuaciones de Roothaan-Hall se pueden expresar en forma matricial como:

$$FC = SC\epsilon \quad (40)$$

Es conveniente ortonormalizar la base de forma que S sea la matriz unidad. Con

esto:

$$\begin{aligned}
 F' C' &= C' \epsilon \\
 \text{o bien} & \\
 (F' - \epsilon) C' &= 0
 \end{aligned}
 \tag{41}$$

y se obtiene un sistema lineal de ecuaciones que se resuelve diagonalizando F' . Los valores propios proporcionan la energía de cada orbital molecular y los vectores propios el orbital molecular. En todo caso, este sistema es fácil de resolver, pero hay que seguir aplicando el método del campo autoconsistente.

La energía electrónica así obtenida vale:

$$\begin{aligned}
 E_0 &= \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{o.a.} \sum_{\nu}^{o.a.} P_{\mu\nu} (h_{\mu\nu} + F_{\mu\nu}) \\
 \text{donde} & \\
 P_{\mu\nu} &= 2 \sum_i^{o.m.} c_{\mu i} c_{\nu i}
 \end{aligned}
 \tag{42}$$

se denomina matriz densidad, y los límites de los sumatorios, *o.a.* y *o.m.* significan orbital atómico y orbital molecular, respectivamente.

Cuando los spinorbitales se construyen de dos en dos, poniendo a cada pareja la misma parte espacial pero a uno spin α y al otro spin β , tenemos el método *Restricted Hartree-Fock* (RHF) (Szabo y Ostlund, 1982). Para los sistemas de capa abierta, se utiliza el método *Unrestricted Hartree-Fock* (UHF) (Pople y Nesbet, 1954), en que los spinorbitales con spin α se manejan por un lado y los spinorbitales con spin β por otro.

En todo caso, y ateniéndonos al principio variacional, solo obtendremos una aproximación por exceso a la que sería la energía exacta Hartree-Fock (límite Hartree-Fock), y la calidad del valor de energía obtenido es una función directa del tamaño de la base elegida, hasta una base de longitud infinita que describa exactamente los orbitales moleculares.

2.8.- Métodos Ab-initio y semiempíricos.

Aún cuando la consecución de nuestro principal objetivo, la resolución de la ecuación de Schrödinger, necesariamente pasa por simplificaciones y aproximaciones, si no se introducen más aproximaciones que las vistas hasta el momento, estamos utilizando métodos ab-initio. Cuando en nuestro método de resolución introducimos parámetros que se deducen de datos experimentales, hablamos de métodos semiempíricos, los cuales se utilizan normalmente para los cálculos que afectan a moléculas muy grandes.

Las aproximaciones mas habituales en los métodos semiempíricos, son (Sadlej, 1985):

- * El uso exclusivo de los electrones de la capa de valencia (en los ab-initio se consideran todos los electrones). La aproximación se conoce como de base de valencia.

- * Los conjuntos de base que se utilizan normalmente son orbitales de tipo Slater (STO)

- * La aproximación ZDO (*Zero Differential Overlap*, $\chi_\mu \chi_\nu d\tau=0$). (Parr, 1952; Pariser y Parr, 1953; Pople, 1953). En ella se anula el solapamiento diferencial cuando las funciones están sobre átomos distintos.

Dentro de los métodos semiempíricos, el *Extended Hückel (EH)* (Hoffmann, 1963) fue uno de los primeros métodos mecanocuánticos de estructura electrónica. En él se consideran solo los electrones de valencia, y se parametrizan los elementos de la matriz de Fock. Es rápido pero poco preciso.

Dentro de los métodos semiempíricos, se establecen distintos niveles de aproximación:

- * *CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap)* (Pople *et al.*, 1965), y dentro de él, diferentes parametrizaciones, como *CNDO/2* (Pople y Segal, 1966) y

CNDO/S (Del Bene y Jaffe, 1968).

* *INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap)* (Pople *et al.*, 1967), con parametrizaciones como *MINDO/3* (Bingham *et al.*, 1975).

* Menos estricta es la aproximación *NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap)* (Pople *et al.*, 1965), con la parametrización *MNDO* (Dewar y Thiel, 1977), o las posteriores *AM1* y *PM3* (Dewar *et al.*, 1985; Stewart, 1989).

Los métodos semiempíricos han permitido realizar cálculos de problemas complejos que hubiera resultado imposible afrontar con los métodos ab-initio, si bien siguen sin reproducir correctamente muchos de los valores fisicoquímicos en estudio (conformaciones, geometrías de sistemas con enlaces de hidrógeno, etc.). Actualmente se utilizan para el tratamiento de moléculas muy grandes.

2.9.- Funciones de base y cálculos SCF

En los cálculos de tipo SCF, la importancia de la elección de las funciones de base es vital. Comúnmente se utilizan dos tipos de funciones de base atómicas:

* *Orbitales atómicos de Slater (STO)* (Slater, 1930). Los orbitales de Slater son funciones de la forma:

$$\chi^{STO} = N r^{n-1} \exp(-\zeta r) Y_{lm}(\theta, \Phi) \quad (43)$$

donde N es la constante de normalización, ζ es una constante denominada exponente del orbital que determina el tamaño del mismo, r es la distancia electrón núcleo, n es el número cuántico principal e Y_{lm} es un armónico esférico.

Estas funciones proporcionan una descripción razonable de los orbitales atómicos, si bien el cálculo de las integrales bielectrónicas con ellas es muy lento.

* *Funciones de tipo gaussiano o gaussianas (GTO)* (Boys, 1950). Tienen la forma:

$$\chi^{GTO} = N x^l y^m z^n \exp(-\alpha r^2) \quad (44)$$

donde α es el exponente de la gaussiana, una constante que determina la extensión radial de la función, y L está definido como $L = l+m+n$. A través de los distintos valores que puede tomar, se nombran las distintas funciones. Con $L=0$ tenemos una función s , con $L=1$ una función p , con $L=2$ una función d , etc.

Las funciones gaussianas son una representación pobre de los orbitales atómicos, pero mediante ellas se realizan fácilmente los cálculos de integrales.

Para ganar precisión en la representación del orbital atómico y poder usar las funciones gaussianas, se elige como función de base no una gaussiana (una función primitiva), sino una combinación lineal de gaussianas (gaussianas contraídas) (Hirst, 1990). Se dice que se usa una contracción (combinación lineal) de gaussianas primitivas, que se representa como:

$$\Phi_{\mu}^{CGF}(x, y, z) = \sum_{p=1}^M d_{p\mu} g_p(\alpha_{p\mu}, x, y, z) \quad (45)$$

donde $d_{p\mu}$ y $\alpha_{p\mu}$ son los coeficientes y exponentes de la contracción, M la longitud de la contracción y g_p la gaussiana primitiva normalizada.

Algunos de los distintos tipos de bases gaussianas son:

* *Base mínima.*

En ella, tenemos el número mínimo de funciones requeridas por átomo para describir sus orbitales atómicos, o lo que es lo mismo, la dimensión del conjunto es igual al número de orbitales atómicos de todas las capas de los átomos individuales aislados. El método se denomina *STO-NG* y usa una contracción de N gaussianas primitivas para cada función de base u orbital de Slater, donde los coeficientes y exponentes de la contracción se eligen para que la contracción se aproxime al orbital de Slater. Este tipo de base requiere poco tiempo de cálculo y se puede usar para moléculas grandes, pero los resultados que se obtienen no son precisos (Hehre *et al.*, 1969).

* *Base extendida.*

Recibe este nombre porque se usa más de una función para representar un orbital atómico. El uso de dos funciones de base para cada orbital se denomina *conjunto de base doble Z*. Si se usan tres, *triple Z* y así sucesivamente. Si el desdoblamiento de la base se restringe solo a la capa de valencia, el conjunto de funciones de base se denomina capa de valencia desdoblada (*split-valence*).

La denominación de una base *split-valence* doble Z según nomenclatura de Pople (Binkley *et al.*, 1980) es *L-MNG*, que consiste en utilizar UNA contracción de *L* gaussianas primitivas para los orbitales internos o de *core* y DOS gaussianas contraídas para los orbitales de valencia, siendo la primera de *M* gaussianas primitivas y la segunda de *N* gaussianas primitivas. Algunas de las bases existentes son :

3-21G (Binkley *et al.*, 1980; Gordon *et al.*, 1982), 4-31G (Ditchfield *et al.*, 1971), 5-31G (Hehre *et al.*, 1972), 6-31G (Dill y Pople, 1975).

Otro tipo de base extendida lo constituyen las bases con *Funciones de Polarización* (Nesbet, 1960). Se trata de una mejora al *split-valence*, al añadir a la base funciones adicionales de polarización para aumentar la flexibilidad y permitir una mayor deformación de la nube electrónica de los átomos en el campo de la molécula. En concreto, se añaden funciones d a los átomos que van del Li al F, y funciones p a los hidrógenos (Hariharan y Pople, 1973).

Cuando se añaden funciones de tipo d a la base, en la nomenclatura se indica como *L-MNG(d)*, ó bien *L-MNG**. Si, además, se añaden orbitales p a los hidrógenos, se denota como *L-MNG(d,p)*, o *L-MNG***.

Las funciones d que se añaden son un conjunto simple de primitivas 3d sin contraer. Por conveniencia computacional se suelen añadir 6 funciones d por átomo: $3d_{xx}$, $3d_{yy}$, $3d_{zz}$, $3d_{xy}$, $3d_{xz}$, $3d_{yz}$. Estas 6 gaussianas cartesianas son combinaciones lineales de las usuales cinco funciones 3d: d_{xy} , $d_{x^2-y^2}$, d_{yz} , d_{zx} , d_z^2 y una función $3s(x^2+y^2+z^2)$. Los orbitales p que se añaden al hidrógeno son un conjunto de primitivas gaussianas tipo p para cada átomo. Un ejemplo de éstas bases sería la 6-31G(d,p).

Las bases con *Funciones Difusas* (Kendall *et al.*, 1992), un tercer caso de

base extendida, incluyen funciones de tipo p y s con exponentes muy pequeños. Esto permite a los orbitales ocupar una región del espacio más grande, y son útiles en sistemas donde los electrones están lejos de los núcleos, como los aniones.

En todo caso, cuanto mayor es la base, más costoso es el cálculo en cuanto a tiempo de cómputo.

* *Bases de valencia.*

Son las que se usan en los métodos semiempíricos. Sólo se usan orbitales para la capa de valencia, y típicamente, se utilizan orbitales STO.

Otro tipo de bases, desarrolladas por Dunning (Dunning, 1989), son las denominadas *correlation consistent*. Estas bases están desarrolladas con vistas a la recuperación equilibrada de la energía de correlación electrónica. La energía de correlación se considera en detalle en el apartado siguiente. Los principios en que se fundamentan estas bases son:

* Para reducir el error en la energía de correlación a 1 Kcal/mol o menos, se requiere que la base incluya funciones con alto momento angular (d, f, g,...).

* Las funciones de base se pueden agrupar en conjuntos de funciones (contracción de conjuntos de base) que dan cuenta en una cantidad aproximadamente equivalente de la energía de correlación y cuya eficacia es máxima en la agrupación establecida. Por ejemplo, la primera función d proporciona una importante cantidad de energía de correlación, pero la contribución de una segunda función d es equivalente a la de la primera función f, y una tercera función d tiene una aportación similar a la de la segunda función f y la primera función g.

En concreto, la base *correlation consistent polarized valence doble-zeta (cc-pVDZ)*, contiene la primitiva (9s4p1d/4s,1p) contraída a [3s2p1d/2s,1p], y es el ejemplo más simple de base *correlation consistent*, destinada a recuperar la energía de

correlación de los electrones de valencia. Una base más extensa sería la *correlation consistent polarized valence triple-zeta (cc-pVTZ)*, que incluye hasta orbitales f en átomos pesados y d en el hidrógeno, aunque lógicamente de mayor coste computacional.

2.10.- Correlación electrónica. Métodos post Hartree-Fock.

La denominada correlación electrónica corresponde al hecho de que el movimiento de un electrón afecta al movimiento de los otros electrones a causa de la repulsión electrónica. En particular, la energía de correlación electrónica (*E.C.E.*) se puede definir como:

$$E.C.E. = \mathcal{E}_0 - E_0 \quad (46)$$

donde \mathcal{E}_0 es la energía exacta de la molécula y E_0 es la energía obtenida si resolviéramos exactamente las ecuaciones de Hartree-Fock (en el límite de Hartree-Fock). La energía de correlación será siempre un valor negativo, ya que si calculamos la energía de una molécula incluyendo correlación, esta energía debe ser menor que la obtenida variacionalmente sin correlación.

La energía Hartree-Fock da cuenta aproximadamente del 99% de la energía del sistema, mientras que el 1% restante es la energía de correlación (Jensen, 1999). Este 1%, que es aparentemente una proporción muy pequeña, tiene la característica de estar involucrado en los fenómenos de interés químico, donde hay redistribución de electrones, como por ejemplo, en la rotura y formación de enlaces. Dado el evidente interés de la obtención de la energía de correlación, se han ido desarrollando los llamados *métodos post Hartree-Fock*, los cuales han ido aportando distintas soluciones que permiten tener en cuenta la correlación electrónica. Algunos de estos métodos son los siguientes:

* *CI (Configuration Interaction)*.

Si aceptamos que el método de Hartree-Fock es la mejor aproximación monodeterminantal, podemos tomar como punto de partida para los cálculos el determinante Hartree-Fock. A continuación, actuamos llevando electrones desde

orbitales ocupados a orbitales virtuales, con lo cual obtenemos nuevos determinantes. Promoviendo uno, dos, tres, etc. (hasta un número máximo de N) electrones a orbitales virtuales, se habla de mono, bi, tri, etc. excitaciones. Si construimos todos los posibles determinantes con todas las posibles excitaciones, tendremos todas las posibilidades de nuevos determinantes que se pueden generar con el determinante original.

A partir de aquí, se construye la función de onda como combinación lineal de éstos determinantes:

$$\Psi_{CI} = a_0 \Psi_0 + \sum_{i=1} a_i \Psi_i \quad (47)$$

Como se puede considerar que cada determinante describe una configuración electrónica, se habla de una *interacción de configuraciones* (Alcamí *et al.*, 2002). Los coeficientes a de la combinación lineal, se determinan variacionalmente, por lo cual las energías que se obtienen con éste método no pueden ser más bajas que la energía exacta.

Cuando se incluyen todos los determinantes de todas las excitaciones posibles, se habla de *full CI*, y se recupera toda la energía de correlación en la base en que se trabaja. En la práctica, es impensable trabajar en modo *full CI*, y lo normal es utilizar excitaciones simples y dobles (*single* y *double*), lo que define el nivel *CISD*, que da cuenta del 80-90% de la energía de correlación.

Dentro del método CI, existen varias metodologías.

- *MCSCF (MultiConfiguration Self Consistent Field)* (Roos, 1983).

Mientras en el CI puro sólo entran en el proceso variacional los coeficientes a de la combinación lineal, en el MCSCF también se aplican variaciones a los orbitales moleculares, lo cual es equivalente a aplicar variaciones también a los coeficientes de la combinación lineal de orbitales atómicos. En este método, el problema es escoger qué configuraciones hay que incluir.

- *CASSCF (Complete Active Space Self Consistent Field)* (Roos,

1987). Éste método, también llamado *FORS* (*Full Optimized Reaction Space*), resuelve el problema de la elección de las configuraciones realizando una partición en orbitales activos e inactivos. El espacio activo suele estar formado por algunos de los orbitales moleculares ocupados más altos y algunos de los virtuales más bajos. Se introducen en la CI sólo los orbitales activos, y se hace una *full* CI dentro del espacio activo.

* *Teoría de perturbaciones de Møller-Pleset*

Se trata de un método no variacional, en el que se aplica la teoría de perturbaciones.

Si se supone que V es una perturbación pequeña, se puede expresar la función de onda perturbada y la energía perturbada como un desarrollo en serie de Taylor alrededor del sistema sin perturbar. El Hamiltoniano total se divide en dos partes: una parte H_0 , la cual tiene funciones (Φ_i) y valores propios (E_i) conocidos y una perturbación V tal que:

$$H = H_0 + V \quad (48)$$

Se introduce un parámetro arbitrario, λ , que multiplique a la perturbación. Con $\lambda=0$ tenemos el sistema sin perturbar y con $\lambda=1$ la perturbación. Expandiendo en serie de λ :

$$\Psi = \Psi_0 + \lambda \Psi^{(1)} + \lambda^2 \Psi^{(2)} + \dots \quad (49)$$

y

$$E = E_0 + \lambda E^{(1)} + \lambda^2 E^{(2)} + \dots \quad (50)$$

Sustituyendo (48), (49) y (50) en la ecuación de Schrödinger $H\Psi = E\Psi$, tendremos:

$$\begin{aligned} (H_0 + \lambda V)(\Psi_0 + \lambda \Psi(1) + \lambda^2 \Psi(2) + \dots) = \\ (E_0 + \lambda E(1) + \lambda^2 E(2) + \dots)(\Psi_0 + \lambda \Psi(1) + \lambda^2 \Psi(2) + \dots) \end{aligned} \quad (51)$$

de modo que los términos con la misma potencia de λ son linealmente independientes y la igualdad debe satisfacerse para cada orden m :

$$\begin{aligned} \text{Orden 0: } (E_0 - H_0)\Psi_0 &= 0 \\ \text{Orden 1: } (E_0 - H_0)\Psi(1) &= (V - E^{(1)})\Psi_0 \\ \text{Orden 2: } (E_0 - H_0)\Psi(2) &= (V - E^{(1)})\Psi(1) - E^{(2)}\Psi_0 \\ &\text{etc...} \end{aligned} \quad (52)$$

Resolviendo éstas ecuaciones tendremos correcciones tanto para la energía como para la función de onda, hasta el orden elegido. Depende de donde cortemos, tendremos correcciones de primer orden, de segundo orden, etc.

En el caso de la energía de correlación se hace referencia al trabajo original de Møller y Plesset (Møller y Plesset, 1934). En éste caso, el sistema sin perturbar se toma como una suma de operadores de Fock. La perturbación será la diferencia entre el Hamiltoniano exacto no relativista (H) y el Hamiltoniano Hartree-Fock H_0 :

$$H_0 = \sum_i f(i) \quad (53)$$

siendo $f(i)$ el operador de Fock (monoelectrónico) con valor:

$$f(i) = h(i) + \sum_b j_b(i) - k_b(i) \quad (54)$$

La perturbación es $V = H - H_0$ y vale:

$$V = \sum_{i=1}^N h(i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i=1}^N f(i) = \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i=1}^N G(i) \quad (55)$$

donde:

$$G(i) = \sum_b j_b(i) - k_b(i) \quad (56)$$

Como del Hamiltoniano total restamos el operador de Fock, desaparece el término monoeléctrico, y quedará el $1/r_{ij}$ menos dos veces el promedio de la repulsión electrónica $\langle V_{ee} \rangle$.

Se considera que la función perturbada se puede expandir en la base del determinante de Slater sin perturbar y sus derivados poliexcitados, en forma parecida a una CI:

$$\Psi = \sum_i c_i \Phi_i \quad (57)$$

La corrección de primer orden sale igual a la parte bielectrónica de Hartree-Fock, luego el Møller-Plesset de orden 1 es lo mismo que un Hartree-Fock. La primera corrección nueva es la de orden 2 y se denomina Møller-Plesset de segundo orden o *MP2*. Correcciones sucesivas definen el *MP3*, *MP4*, etc... *MP1*, *MP2* y *MP3* implican el uso de determinantes de Slater biexcitados, *MP4* implica el uso de mono, bi, tri y tetraexcitaciones, y así sucesivamente.

El *MP2* es muy utilizado; da cuenta del 80-90% de la energía de correlación y utiliza más recursos computacionales que el método Hartree-Fock. El *MP3* no da buenos resultados, y el *MP4* suele dar mejores resultados que el *MP2*. De hecho, la forma en que suele variar la aproximación al valor exacto de la propiedad calculada, es: HF proporciona un valor bastante alejado; *MP2* es una buena aproximación; *MP3* vuelve a alejarse de los valores correctos, y *MP4* es una mejor aproximación que *MP2*.

Por lo demás, como el método Møller-Plesset no es variacional, hay que tener en cuenta que el resultado no tiene por qué ser un límite superior a la energía correcta del sistema.

* *Método de Coupled Cluster (CC)*.

Dentro de los métodos no variacionales, el método Coupled Cluster

incluye todas las correcciones de un tipo dado (mono, bi, tri o tetra excitaciones) hasta orden infinito del desarrollo en serie (Knowles *et al.*, 1993).

La función de onda se representa como:

$$\Psi_{CC} = e^T \Phi_0$$

$$e^T = 1 + \frac{1}{2}T^2 + \frac{1}{6}T^3 + \dots = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{1}{k!} T^k \quad (58)$$

donde el operador de Cluster, T está dado como:

$$T = T_1 + T_2 + T_3 + \dots + T_N \quad (59)$$

y está definido como una combinación lineal de determinantes de Slater i-excitados, por ejemplo:

$$T_1 \Phi_0 = \sum_i^{ocpds} \sum_a^{vir} t_i^a \Phi_i^a \quad (60)$$

La energía Coupled Cluster aparece en función de las t , amplitudes, y de integrales bielectrónicas sobre los orbitales moleculares. Se acaba obteniendo un conjunto de ecuaciones no lineales en las amplitudes.

En la práctica hay que usar Coupled Cluster truncadas. La más sencilla es la que usa $T_1 + T_2$ (CCSD), y la siguiente es la que usa $T_1 + T_2 + T_3$ (CCSDT).

Precisamente asociado con la necesidad de resolver el problema de la correlación electrónica, Dunning (Dunning, 1989), plantea claramente la importancia de la elección del conjunto de funciones de base para los cálculos, desarrollando el concepto de las bases *correlation consistent* vistas anteriormente, las cuales actúan de manera eficaz en los cálculos con correlación.

2.11.- Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

Al margen de los métodos citados, que tratan de dar cuenta de la energía de correlación, la cual no está considerada en el método de Hartree-Fock, tenemos la Teoría del Funcional de la Densidad, (Thomas, 1926; Fermi, 1928; Burke *et al.*, 2005). La teoría DFT se cimenta en la utilización de la densidad electrónica, ρ en lugar de Ψ . El punto de partida para su aplicación química son los teoremas de Hohenberg y Kohn (Hohenberg y Kohn, 1964):

* *Primer teorema de Hohenberg y Kohn:* La energía electrónica del estado fundamental queda totalmente determinada por la densidad electrónica ρ :

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad (61)$$

* *Segundo teorema de Hohenberg y Kohn:* Hay un principio variacional aplicable con ρ como parámetro:

$$E_0[\rho'] \geq E_0[\rho_0] \quad \text{si } \rho' \neq \rho_0 \quad (62)$$

En la aproximación mecanocuántica, la función de onda para N electrones depende de 3N coordenadas (4N si incluimos el spin). La densidad electrónica depende de 3 coordenadas independientemente del número de electrones. La conexión entre las dos entidades es:

$$\rho(\mathbf{r}) = N \int \cdots \int |\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N, \omega)|^2 d\omega dr_1 dr_2 \cdots dr_{N-1} \quad (63)$$

Puesto que la energía es un funcional de la densidad, podemos afirmar que también lo son sus componentes:

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{en}[\rho_0] + V_{nn} \quad (64)$$

y esta expresión se puede dividir en la parte dependiente del sistema, que es la que contempla la atracción electrón-núcleo (en la que intervienen las coordenadas específicas de los núcleos), E_{en} , y la independiente, con validez universal, que se representa como F_{HK} y define el llamado *funcional de Hohenberg-Kohn*:

$$F_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] \quad (65)$$

La forma de este funcional es universal, la misma para el átomo de Hidrógeno que para una proteína, de modo que si lo conociéramos, se podría resolver de manera exacta la ecuación de Schrödinger. El problema es que este funcional no es conocido.

En el funcional F_{HK} podemos dividir la parte de interacción electrón-electrón en un término que corresponde a la interacción clásica de Coulomb de una densidad electrónica consigo misma ($J[\rho_0]$) y otro término que describe el resto de interacciones no clásicas (canje, correlación, o corrección a la autointeracción):

$$E_{ee}[\rho_0] = J[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (66)$$

La energía total queda como:

$$E_0[\rho_0] = E_{en}[\rho_0] + V_m + J[\rho_0] + (T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0]) \quad (67)$$

Los términos dentro del paréntesis, funcional de energía cinética y funcional de intercambio-correlación, no tienen forma conocida y se evalúan de acuerdo a distintos modelos.

La clave del uso del DFT en química computacional está en la introducción del uso de orbitales por Kohn y Sham en el año 1965 (Kohn y Sham, 1965). En este formalismo el término de energía cinética se calcula de forma exacta para un conjunto de N electrones no interaccionantes descrito cada uno por un orbital Ψ_i , de forma que:

$$T = \sum_{i=1}^N \langle \Psi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \Psi_i \rangle \quad (68)$$

Se considera que la energía cinética que no se ha tenido en cuenta se incorpora en el término de intercambio-correlación.

El mayor problema en DFT es derivar fórmulas para el término E_{xc} . Es habitual considerar el término de intercambio-correlación como suma de un término de intercambio y otro de correlación:

$$E_{xc}[\rho_0] = E_x[\rho_0] + E_c[\rho_0] \quad (69)$$

Aplicando variaciones para minimizar la energía en función de los orbitales se llega a unas ecuaciones similares a las de Roothaan, las *ecuaciones de Kohn-Sham* (Kohn y Sham, 1965), que se resuelven iterativamente aplicando el método del campo autoconsistente (SCF). Es decir, en la práctica es como si tuviésemos un Hartree-Fock-Roothaan donde la parte de Coulomb y Canje se evalúa de forma distinta. El resultado es que el tiempo de cálculo de un DFT es similar al de un Hartree-Fock pero incluyendo energía de correlación.

Los métodos DFT se clasifican, según como se calcule el término de intercambio-correlación, en (Koch y Holthausen, 2000):

* *Métodos de densidad local (LSDA, Local Spin Density Approximation)*

Son aquéllos en los que se considera que a cortas distancias, los electrones se comportan como un gas electrónico uniforme no interaccionante. La correlación se sobreestima por un factor alrededor de 2, a pesar de lo cual, se obtienen resultados con precisión similar a los de Hartree-Fock.

* *Métodos corregidos por gradiente (GGA, Generalized Gradient Approximation)*

En ellos se considera el gas electrónico como no uniforme, haciendo que el término de intercambio-correlación dependa de la densidad electrónica y del gradiente de la densidad electrónica.

Existen fórmulas para la parte de intercambio que son una corrección del LSDA con gradientes de ρ , como son la *PW86* (de Perdew y Wang), o la *B* o *B88* de Becke. Existen también, no correcciones al LSDA sino funcionales enteros con ρ y su derivada como el *BR* (Becke y Rousset).

Para la parte de energía de correlación existen también funcionales corregidos por gradiente como el de Lee, Yang y Parr (*LYP*), ó el *PW91* (de Perdew y Wang).

* *Métodos híbridos.*

Esta denominación se aplica a métodos que involucran conceptos de Hartree-Fock y DFT. Se considera que se obtiene un valor exacto del término de intercambio mediante el método Hartree-Fock con un determinante de Slater si no hay interacción interelectrónica, y se trata de aproximar el valor de la correlación con una expresión adecuada.

Lo que se obtiene es una expresión para la parte de intercambio y otra para la de correlación. Las dos expresiones se suelen combinar como un conjunto de sumandos afectados por unos factores cuyo valor se determina por comparación con resultados experimentales. El funcional híbrido más utilizado en la actualidad es el *B3LYP* (Becke, 1988; Lee *et al.*, 1988), el cuál contiene tres parámetros optimizados por Becke para reproducir los valores de equilibrio del conjunto molecular G1. Los resultados para valores de equilibrio son muy buenos.

2.12.- La hipersuperficie de Energía Potencial. Puntos críticos.

El potencial para el movimiento de los núcleos queda definido por la energía total de la molécula. Como este potencial depende de las posiciones de los núcleos, lo que tenemos es una función de varias variables. Dada una función de varias variables $f(q_1, q_2, \dots, q_n)$, las derivadas primeras con respecto a cada una de las variables forman un vector que se denomina gradiente:

$$g_i = \frac{\partial f}{\partial q_i} \quad \forall i \quad \rightarrow \quad \vec{g} = (g_1, g_2, \dots, g_n) \quad (70)$$

Las segundas derivadas de la función forman una matriz llamada hessiano:

$$h_{ij} = \frac{\partial^2 f_i}{\partial q_i \partial q_j} \quad \forall i, j \rightarrow \mathbf{H} = \begin{pmatrix} h_{11} & h_{12} & \cdots & h_{1n} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ h_{n1} & h_{n2} & \cdots & h_{nn} \end{pmatrix} \quad (71)$$

Cuando las primeras derivadas con respecto a todas las variables son cero:

$$\frac{\partial g}{\partial q_i} = 0 \quad \forall i \quad (72)$$

nos encontramos ante un punto crítico o punto estacionario (si la función es un potencial, gradiente cero implica fuerza neta cero, y por el principio de inercia un sistema mecánico no modificará su estado). Éstos puntos críticos pueden ser de varios tipos:

**Mínimos*. Son puntos críticos donde el hessiano es definido positivo. Se identifican con estructuras de equilibrio de las moléculas. En una hipersuperficie pueden aparecer muchos mínimos.

**Puntos de silla de primer orden*. Se pueden corresponder con un estado de transición. En este caso hablamos de un punto crítico que es máximo respecto a una coordenada y mínimo con respecto a otras. En el hessiano aparece un valor negativo.

**Máximos*. Son puntos críticos donde el hessiano es definido negativo. Lógicamente no nos interesan especialmente.

**Puntos de silla de orden superior*. Son estructuras con varios valores propios positivos y negativos dependiendo del orden.

En estudios conformacionales y poblacionales puede tener especial interés la determinación de los puntos mínimos de la hipersuperficie de energía potencial.

En cuanto a los métodos computacionales utilizados para éstos cálculos, existen esencialmente dos tipos (Fletcher, 1987):

* *Métodos de Newton*, basados en el cálculo directo del hessiano.

* *Métodos cuasi-Newton*, en los cuales se evita el cálculo directo del hessiano. Entre estos, uno muy utilizado es el *Berny* (Schlegel, 1982) para los métodos ab-initio.

Todos estos métodos de búsqueda obtienen mínimos locales, el mínimo más cercano al punto de partida.

2.13.- Evaluación de propiedades termodinámicas.

La termodinámica estadística es el nexo entre la termodinámica clásica y la mecánica cuántica, ya que realiza un tratamiento estadístico sobre un número grande de sistemas moleculares para obtener las propiedades macroscópicas propias de la termodinámica clásica.

El punto central del trabajo en termodinámica estadística es la función de partición, q , que para una sola molécula se define como:

$$q = \sum_i e^{-\epsilon_i/kT} \quad (73)$$

donde el sumatorio está extendido a todos los niveles de energía (traslacional, rotacional, vibracional, electrónica).

Para un conjunto de N moléculas independientes, la función de partición Q , es:

$$Q = q^N / N! \quad (74)$$

A partir de la función de partición es posible derivar estadísticamente todas las

funciones termodinámicas, e.g.:

$$\begin{aligned}
 H &= kT^2 \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial T} \right)_V + kTV \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial V} \right)_T \\
 S &= kT \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial T} \right)_V + k \ln Q \\
 G &= kTV \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial V} \right)_T - kT \ln Q
 \end{aligned} \tag{75}$$

Ahora bien, como para calcular Q hacen falta todos los estados de energía, se hace uso de la separación de movimientos de Born-Oppenheimer que establece que, en primera aproximación, no hay interacción entre los distintos tipos de energía, con lo cual se puede escribir:

$$\epsilon_{tot} = \epsilon_{trasl} + \epsilon_{rot} + \epsilon_{vib} + \epsilon_{elec} \tag{76}$$

y que implica que:

$$q_{tot} = q_{trasl} \cdot q_{rot} \cdot q_{vib} \cdot q_{elec} \tag{77}$$

Así, la entalpía y la entropía pueden factorizarse como:

$$\begin{aligned}
 H_{tot} &= H_{trasl} + H_{rot} + H_{vib} + H_{elec} \\
 S_{tot} &= S_{trasl} + S_{rot} + S_{vib} + S_{elec}
 \end{aligned} \tag{78}$$

Y el problema estriba en poder obtener q_{trasl} , q_{rot} , q_{vib} y q_{elec} .

Para obtener q_{trasl} , se utiliza el modelo de partícula en una caja, obteniéndose:

$$q_{trasl} = \left(\frac{2\pi M kT}{h^2} \right)^{3/2} V \tag{79}$$

Para obtener q_{rot} , la aproximación utilizada es la del rotor rígido tridimensional,

resultando:

$$q_{rot} = \frac{\pi^{1/2}}{\sigma_r} \left(\frac{8\pi^2 kT}{h^2} \right)^{3/2} (I_A I_B I_C)^{1/2} \quad (80)$$

donde I_A , I_B , I_C son los momentos principales de inercia, y σ_r el número de simetría.

La evaluación de q_{vib} se realiza con el modelo de oscilador armónico, con lo cual:

$$q_{vib} = \prod_{i=1}^{3N-6} \frac{e^{-h\nu_i/2kT}}{1 - e^{-h\nu_i/kT}} \quad (81)$$

siendo ν_i las frecuencias fundamentales de vibración.

La función de partición electrónica, q_{elec} , se determina como el sumatorio sobre los distintos estados electrónicos. A este fin, hay que considerar que los niveles de energía electrónicos están separados normalmente por diferencias de energía mucho mayores que el factor kT , o, lo que es lo mismo, a temperaturas normales sólo el nivel fundamental estará poblado y el sumatorio de estados se limita a este término, ya que para los superiores el factor ϵ/kT (véase ecuación 73) es muy grande y la exponencial negativa de este valor es prácticamente cero. Como la función de partición es suma de estados, si tomamos el origen de energías en el valor de la energía electrónica del nivel fundamental, ϵ/kT es cero, la exponencial vale 1 y solo quedan tantos sumandos como estados de la misma energía del fundamental. Es decir:

$$q_{elec} = g \quad (82)$$

donde g es la degeneración del estado electrónico fundamental.

La flexibilidad conformacional es un factor importante cuando se modela la actividad de compuestos bioactivos. En particular, las adaptaciones tridimensionales de grupos farmacofóricos están en función de las coordenadas conformacionales que deben cambiar como consecuencia de la adopción de una disposición óptima para la interacción con el sitio activo del receptor. Generalmente, el problema conformacional se aborda realizando un análisis conformacional sobre las coordenadas consideradas. De

esta manera, sobre la base de la aproximación de Born-Oppenheimer (Born y Oppenheimer, 1927) se obtiene una hipersuperficie de energía potencial para el movimiento conformacional. Los mínimos sobre esta hipersuperficie se consideran como candidatos para la distribución farmacofórica óptima. Sin embargo, esta información carece de efectos entrópicos. Por otro lado, la conformación de interés cuando interacciona con el sitio receptor corresponde a un mínimo de la energía de Gibbs para el complejo ligando-sitio activo. Por tanto, se pueden sacar dos conclusiones: primero, además de usar el criterio energético, es necesario contar con un punto de vista termoestadístico. Segundo, para tener en cuenta la posible variación de la conformación cuando interactúa con el sitio receptor, se debe considerar el conjunto de conformaciones accesibles para una interacción dada. Desde este punto de vista, el punto clave es la evaluación de una función de partición conformacional.

La función de partición conformacional para compuestos bioactivos se obtiene normalmente de una distribución de Boltzmann que involucra solamente la energía potencial conformacional (Hinchliffe, 1989; Farnell *et al.*, 1974). Esta técnica tiene su origen en una serie de trabajos relacionados con la determinación semiclásica de una función de partición conformacional en macromoléculas (Gō *et al.*, 1968; Gō *et al.*, 1976). Desde el punto de vista físico, el uso exclusivo de la energía potencial conformacional implica dos suposiciones: primera, los momentos de inercia permanecen constantes sobre todo el espacio conformacional. Segunda, la energía cinética conformacional también permanece constante. Estrictamente hablando, estas dos suposiciones no están justificadas para un compuesto bioactivo típico, donde la variación conformacional se traslada al movimiento de grandes grupos dentro de la molécula.

El cálculo de una función de partición conformacional aproximada fue considerado por Gō y Scheraga (Gō *et al.*, 1976), usando dos modelos. El primero es el *modelo flexible clásico*, donde la energía potencial conformacional está definida por la energía potencial mínima para valores fijos de las coordenadas conformacionales. La energía cinética se describe en coordenadas cartesianas. En la función de partición semiclásica, la integración del momento (parte cinética) da un término constante. En la integración de las coordenadas (parte potencial), que se lleva a cabo en coordenadas internas, tanto el jacobiano de la transformación a coordenadas internas como las constantes de fuerza para las coordenadas no conformacionales se consideran constantes. Es decir, el

resultado depende únicamente de la energía potencial conformacional:

$$Z_f = \left[\prod_{k=1}^n \left(\frac{m_k kT}{2\pi\hbar^2} \right)^{3/2} \right] \int \exp[-\beta F(Q, Q')] \prod_{k,\alpha} dx_{k,\alpha} \quad (83)$$

donde $\beta = 1/kT$ y $F(Q, Q')$ la energía potencial conformacional.

El segundo modelo considerado es el *modelo rígido clásico*:

$$Z_r = \left(\frac{1}{2\pi\hbar} \right)^m \int \exp[-\beta\{K_r + F_0(Q)\}] dP_r dQ \quad (84)$$

siendo $\beta = 1/kT$, K_r la energía cinética y $F_0(Q)$ la energía potencial conformacional. En este modelo, el potencial depende sólo de las coordenadas conformacionales para valores fijos de las coordenadas internas. La función de partición semiclásica se obtiene usando coordenadas internas, excluyendo las coordenadas no conformacionales y la rotación total. La integración del momento produce una matriz de términos cinéticos y la energía potencial conformacional. Una comparación detallada de ambos modelos muestra que son aproximados, siendo el primero (modelo flexible) más realista y preciso que el segundo (modelo rígido).

Hasta este momento, como hemos visto, para describir la variación conformacional de una molécula donde se usan varias coordenadas internas, se genera una superficie de energía potencial para el movimiento conformacional como función de estas coordenadas en el marco de la Aproximación de Born-Oppenheimer (Born y Oppenheimer, 1927).

En el tratamiento estándar de estudios conformacionales sólo se tiene en cuenta la superficie de energía potencial, y los mínimos sobre esta superficie, especialmente el mínimo global, son considerados como candidatos para la distribución farmacofórica óptima. Sin embargo, en este método existe una carencia de efectos entrópicos. Es decir, el procedimiento establecido considera una distribución de Boltzmann que involucra sólo la energía potencial conformacional usando valores fijos para las coordenadas internas (Hinchliffe, 1989; Carloni y Alber, 2003).

El tratamiento de Farnell en 1974 (Farnell *et al.*, 1974) sobre la energía libre conformacional de la histamina es un típico ejemplo de este tipo de cálculos, aquí se calcula una función de partición para la distribución clásica de Boltzmann en cada región (zonas de baja energía en la superficie de energía potencial), dependiente de las energías internas en cada punto dado por las coordenadas internas. Posteriormente se calcula la diferencia de energía libre por molécula. Esta técnica se basa en los primeros trabajos sobre la determinación de los pesos estadísticos para conformaciones de equilibrio en macromoléculas, donde se involucran las teorías de mecánica estadística para moléculas como dipéptidos, polipéptidos, polímeros y hélices. Se propone que la contribución de una conformación dada a la función de partición pueda ser expresada como un producto de pesos estadísticos de las diferentes secuencias moleculares, para así obtener los parámetros estadísticos en función de la temperatura. En estos trabajos se presenta la función de partición, la entropía y la energía cinética para polímeros en disolución en términos de la matriz **G** rotovibracional, de momentos y coordenadas generalizadas (Gõ *et al.*, 1968; Gõ *et al.*, 1976). El uso exclusivo de la distribución de Boltzmann para la energía potencial conformacional asume que el acoplamiento rotovibracional y la energía cinética conformacional son constantes con la conformación y estrictamente hablando ésta es sólo una aproximación.

2.14.- Efecto del disolvente.

El estudio de sistemas reales exige considerar que las moléculas, en particular las bioactivas, en la mayor parte de los casos de interés se presentan en disolución, por lo cual resulta necesario conocer las interacciones que sufren con el medio. El efecto de un disolvente sobre la molécula de soluto se puede dividir en:

- * Solvatación específica o efectos de corto alcance, como los enlaces de hidrógeno o la orientación preferente de las moléculas de disolvente cerca de un ión.
- * Efectos macroscópicos o de largo alcance, implicando apantallamiento de cargas (polarización del disolvente). Esta polarización macroscópica es la responsable de la existencia de constantes dieléctricas distintas de uno.

Se puede considerar que la solvatación específica está concentrada en la primera esfera de solvatación, y la de largo alcance requiere para su estudio de un mayor número de moléculas. El momento dipolar de una molécula de soluto M inducirá un momento dipolar en las proximidades de cada molécula de disolvente, que produce un momento dipolar permanente. El resultado neto de este efecto es que el disolvente adquiere una polarización global en la región de cada molécula de soluto. El disolvente polarizado genera un campo eléctrico, llamado *campo de reacción*, para cada molécula de soluto. El campo de reacción distorsiona la función de onda electrónica molecular de soluto con respecto a la correspondiente en fase gaseosa, produciendo, por tanto, un momento dipolar inducido que se suma al momento dipolar permanente en fase gaseosa de M. El momento dipolar aumentado de M polariza posteriormente al disolvente y así sucesivamente. A causa del momento dipolar adicional inducido por el campo de reacción del disolvente, una molécula polar tendrá un momento dipolar mayor en un disolvente polar que en fase gaseosa. Además, el momento dipolar de la molécula de soluto fluctuará con el tiempo, conforme fluctúen las orientaciones de las moléculas de disolvente próximas. En definitiva, la función de onda electrónica molecular y todas las propiedades moleculares en disolución diferirán en alguna extensión de sus correspondientes en fase gaseosa. La vía rigurosa para tratar los efectos del disolvente sobre las propiedades moleculares es llevar a cabo cálculos mecanocuánticos en sistemas que constan de una molécula de soluto rodeada de muchas moléculas de disolvente, y tomar un promedio adecuado sobre las orientaciones para obtener las propiedades promedio a una temperatura y presión particulares. Un cálculo de este tipo es usualmente impracticable.

El concepto de *campo de reacción* permite plantear distintos métodos para modelizar éste último caso sin considerar explícitamente las moléculas individuales, considerando el disolvente como un medio continuo. Si bien la energía es al mismo tiempo una propiedad macroscópica y molecular, la entropía y la energía libre son propiedades macroscópicas, pero no moleculares. El modelo del continuo dieléctrico usa la propiedad macroscópica ϵ_r del disolvente, y el tratamiento macroscópico del disolvente nos permite encontrar una propiedad macroscópica. El tratamiento de solvatación usando un dieléctrico continuo es un tratamiento combinado mecano-cuántico y mecánico-estadístico.

Se han desarrollado distintos modelos teóricos que estudian el problema del efecto del disolvente mediante cálculos iterativos. Cualquier tratamiento en el que se alcance la autoconsistencia, se denomina modelo del *campo de reacción autoconsistente* (SCRF) (Tomasi y Persico, 1994). Existen muchas versiones de los modelos SCRF que difieren en cómo eligen el tamaño y la forma de la cavidad que contiene la molécula de soluto M y en cómo calculan la interacción entre M y el continuo dieléctrico que la rodea. Comentaremos algunos de ellos.

2.14.1.- Método de Onsager-cuántico SCRF.

En el método *dipolo-en-una-esfera* (también denominado *Onsager-cuántico* o *Born-Kirkwood-Onsager*) SCRF (Defranchesci y Le Bris, 2000), la cavidad molecular es una esfera de radio a , y la interacción entre la distribución de carga molecular y el campo de reacción se calcula aproximando la distribución de carga molecular como un dipolo eléctrico localizado en el centro de la cavidad, con momento eléctrico dipolar μ . En 1936, Onsager demostró que el campo eléctrico en la cavidad (el campo de reacción) producido por la polarización del disolvente por μ es:

$$\vec{E}_R = \frac{2(\epsilon_r - 1)}{(2\epsilon_r + 1)a^3} \mu \quad (85)$$

La energía potencial de la interacción electrostática entre μ y el campo de reacción \vec{E}_R es:

$$\hat{V}_{int} = -\hat{\mu} \vec{E}_R \quad (86)$$

El correspondiente operador mecanocuántico para el cálculo del momento eléctrico dipolar en unidades atómicas es:

$$\hat{\mu} = -\sum_i \vec{r}_i + \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \vec{R}_{\alpha} \quad (87)$$

En un cálculo Onsager-cuántico SCRF, se comienza usando un método como HF, DFT, MP2 o cualquier otro, para calcular una densidad de probabilidad electrónica $\rho^{(0)}(\vec{r})$ para la molécula aislada, preferentemente en una geometría optimizada. Entonces, se calcula el momento eléctrico dipolar en vacío a partir de:

$$\hat{\mu}^{(0)} = -\int \rho^{(0)}(\vec{r}) d(\vec{r}) + \sum_{\alpha} Z_{\alpha} e \vec{r}_{\alpha} \quad (88)$$

a continuación, $\hat{\mu}^{(0)}$ se usa en la ecuación (85) para dar una estimación inicial $\vec{E}_R^{(0)}$ del campo de reacción. A partir de $\vec{E}_R^{(0)}$ se calcula una estimación inicial del operador $\hat{V}_{int}^{(0)}$, se resuelven las ecuaciones del método cuántico que se esté utilizando, y se obtiene una densidad de probabilidad electrónica $\rho^{(1)}$.

Partiendo de $\rho^{(1)}$, se calcula un valor de $\hat{\mu}^{(1)}$ por medio de (88) para el momento dipolar molecular que permite calcular el efecto de $\vec{E}_R^{(0)}$. Usando $\hat{\mu}^{(1)}$ en la ecuación (85), se obtiene una estimación mejorada $\vec{E}_R^{(1)}$ para el campo de reacción. Entonces se usa un $\hat{V}_{int}^{(1)} = -\hat{\mu} \cdot \vec{E}_R^{(1)}$ mejorado, para obtener una densidad electrónica mejorada, y así sucesivamente. Se continúan las iteraciones hasta que no hay más cambios en ρ , μ , y \vec{E}_R . La geometría molecular se reoptimiza en presencia del campo de reacción, pero este paso se omite a menudo, ya que los cambios en la geometría de la fase gaseosa a la fase disolución son generalmente pequeños. Si las especies de soluto tienen carga neta Q , el término constante $-(\epsilon_r - 1)Q^2/\epsilon_r \alpha$ (calculado primero por Born) (Born, 1920), se suma al término que representa la energía potencial debida a la repulsión entre los núcleos (V_{NN}).

En el método de Onsager-cuántico, una molécula de soluto sin cargar que no tiene momento dipolar permanente no se ve afectada por el disolvente. Sin embargo, en realidad, el cuadrupolo y momentos de mayor orden del soluto interactuarán con el disolvente para dar el campo de reacción.

Con \hat{V}_{int} incluida en el hamiltoniano, se obtiene una energía electrónica molecular (incluyendo la repulsión nuclear) $U^{(f)}$ que es un valor propio de $\hat{H}_M^{(0)} + \hat{V}_{int}$.

Se tiene entonces que:

$$U^{(f)} = \langle \Psi^{(f)} | \hat{H}_M^{(0)} + \hat{V}_{int} | \Psi^{(f)} \rangle \quad (89)$$

donde $\Psi^{(f)}$ es la función de onda electrónica final de **M**, obtenida cuando se alcanza la autoconsistencia. La energía electrónica molecular en vacío es:

$$U^{(0)} = \langle \Psi^{(0)} | \hat{H}_M^{(0)} | \Psi^{(0)} \rangle \quad (90)$$

La energía $U^{(f)}$ incluye la energía de interacción del soluto con el campo de reacción producido por el disolvente, pero hay otra contribución a la energía que también debe incluirse. Se trata del cambio de energía del disolvente que resulta de la polarización existente por el soluto. El trabajo requerido para polarizar el disolvente se demuestra que es:

$$E_{pol} = -\frac{1}{2} \langle \Psi^{(f)} | \hat{V}_{int} | \Psi^{(f)} \rangle \quad (91)$$

La forma más sencilla de aproximar la *cavidad* es una *esfera*. En el método Onsager-cuántico SCRF la cavidad es esférica englobando al soluto y además se sustituye la distribución real de la carga molecular del soluto por un dipolo. El hecho de que los cálculos SCRF de dipolo-en-una-esfera a veces dan buenos resultados se atribuye a la cancelación parcial de errores por el uso de una forma molecular esférica.

Una mejora en la forma molecular esférica es una forma *elipsoidal* (Kirkwood y Westheimer, 1936). Los cálculos de Onsager cuánticos que usan una cavidad elipsoidal dan mejores resultados que los de la cavidad esférica, pero la mejora no es grande.

2.14.2.- Modelo del continuo polarizable PCM.

Los cálculos *ab-initio* precisos de los efectos del disolvente requieren el uso de formas moleculares más realistas que las formas esféricas o elipsoidales. En el *modelo del continuo polarizable (PCM)* (Cossi *et al.*, 1996; Barone *et al.*, 1997), cada núcleo atómico de la molécula de soluto, M, está rodeado por una esfera de radio 1,2 veces el radio de van der Waals del átomo. La región de la cavidad se toma como el volumen ocupado por esas esferas atómicas solapantes.

Ya que la cavidad PCM tiene una forma compleja, se usa un método numérico para obtener el término de energía potencial de interacción soluto-disolvente, \hat{V}_{int} . Se puede demostrar a partir de la electrostática clásica que el potencial eléctrico Φ_o producido por el continuo dieléctrico polarizado es igual al potencial eléctrico de una *carga superficial aparente (CSA)* distribuida sobre la superficie de la cavidad molecular. La CSA es una distribución continua de carga caracterizada por la densidad de carga superficial (carga por unidad de área de la superficie) que varía de un punto a otro de la superficie de la cavidad. En la práctica, esta CSA continua se aproxima reemplazándola por muchas cargas puntuales sobre la superficie de la cavidad. La superficie de la cavidad se divide en muchas regiones pequeñas, siendo la carga aparente Q_k la correspondiente a la región k -ésima. Si \vec{r}_k es el punto en el que está localizada Q_k , entonces el potencial eléctrico $\phi_o(\vec{r})$ debido a la polarización del dieléctrico es:

$$\phi_o(\vec{r}) = \sum_k \frac{Q_k}{|\vec{r} - \vec{r}_k|} \quad (92)$$

La electrostática clásica da las siguientes expresiones para las cargas aparentes:

$$Q_k = [(\epsilon_r - 1)4\pi\epsilon_r] A_k \nabla \phi_{int}(\vec{r}_k) \cdot \vec{n}_k \quad (93)$$

donde A_k es el área de la región k -ésima, \vec{r}_k es el punto en el que Q_k está localizada, $\nabla\phi_{int}(\vec{r}_k)$ es el gradiente del potencial eléctrico para la cavidad considerada, en el límite cuando el punto \vec{r}_k se aproxima a \vec{r} , y \vec{n}_k es un vector unitario perpendicular a la superficie de la cavidad en \vec{r}_k , apuntando hacia afuera de la misma. El potencial eléctrico en la cavidad es la suma de la contribución $\phi_{M,int}$ de la distribución de carga de la molécula de soluto M y de la contribución $\phi_{\sigma,int}$ del dieléctrico polarizado:

$$\phi_{int} = \phi_{M,int} + \phi_{\sigma,int} \quad (94)$$

Ya que ni ϕ_{int} ni Q_k se conocen inicialmente, las cargas superficiales aparentes se obtienen mediante un proceso iterativo, donde inicialmente se desprecia $\phi_{\sigma,int}$ y se toma ϕ_{int} como $\phi_{int}^{(00)} = \phi_{M,int}^{(0)}$, donde $\phi_{M,int}^{(0)}$ se calcula a partir de la densidad electrónica $\rho^{(0)}$ de una molécula M en el vacío. Entonces se usa la ecuación (93) para obtener las estimaciones iniciales de $Q_k^{(00)}$ del CSA, que se usan en la ecuación (92) para encontrar una estimación inicial $\phi_{\sigma,int}^{(00)}$ del potencial eléctrico producido por el dieléctrico polarizado. El potencial mejorado $\phi_{int}^{(01)}$ se usa en la ecuación (93) para obtener cargas mejoradas $Q_k^{(01)}$, que se usan en la ecuación (92) para obtener $\phi_{int}^{(01)}$, y así sucesivamente.

Los valores de las cargas que han alcanzado la convergencia se usan para obtener una estimación inicial de \hat{V}_{int} como:

$$\hat{V}_{int}^{(0)} = -\sum_i \phi_{\sigma}^{(0f)}(\vec{r}_i) + \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \phi_{\sigma}^{(0f)}(\vec{r}_{\alpha}) \quad (95)$$

donde las sumas se extienden a todos los electrones y núcleos, y $\phi_{\sigma}^{(0f)}$ se obtiene a partir de la ecuación (92), usando los $Q_k^{(0f)}$. Se añade $\hat{V}_{int}^{(0)}$ al hamiltoniano electrónico molecular, que se usa para obtener una densidad electrónica mejorada $\rho^{(1)}$ para M, que da $\phi_{M,int}^{(1)}$, que a su vez da el potencial mejorado $\phi_{int}^{(10)}$ que se usa en la ecuación (92) para comenzar un nuevo ciclo de iteraciones de carga y de ϕ_{σ} . Se continúa hasta que el proceso alcanza la convergencia.

El método PCM original usa esferas atómicas con un radio 1,2 veces el radio de van der Waals para definir la cavidad molecular. El *modelo del continuo polarizable de isodensidad (IPCM)* (Foresman y Frisch, 1996) es una modificación del PCM que define

la superficie de la cavidad molecular como una superficie de contorno de densidad de probabilidad electrónica constante de la molécula de soluto M. El método *PCM de isodensidad autoconsistente (SCIPCM)* (Foresman y Frisch, 1996) es un refinamiento del método IPCM que permite efectuar una optimización de la geometría, así como hacer cálculos de frecuencias vibracionales para la molécula de soluto en disolución. El *método PCM Hartree-Fock de átomos unidos (PCM UAHF)* (Barone *et al.*, 1997) usa esferas atómicas para definir la cavidad molecular, pero se centra más en la asignación de los radios de las esferas que el método PCM original. En este método, los átomos de hidrógeno no se asignan a esferas, sino que se incluyen con la esfera del átomo al que están enlazados (de aquí el nombre de átomos unidos).

El *método de solvatación tipo conductor (COSMO)* (Klamt, 1995) se parece al método PCM en el tratamiento de la solvatación en que usa una forma realista para la molécula de soluto y en que usa cargas superficiales en la superficie de la cavidad alrededor de la molécula de soluto, pero estas cargas inicialmente se calculan usando una condición adecuada para un medio disolvente que es un conductor eléctrico, en vez de un dieléctrico. El procedimiento simplificado para obtener las cargas hace a COSMO computacionalmente rápido.

En este trabajo, se utiliza el modelo PCM para el estudio de los sistemas moleculares en disolución.

2.15.- Análisis de semejanza.

El principio de semejanza establece que moléculas similares poseen las mismas propiedades. La *Teoría de Semejanza Molecular Cuántica*, proporciona un método para realizar una medida de la semejanza.

En el siglo pasado, se establecieron sistemas de medidas cuantitativas derivadas de un punto de vista topológico utilizando la *chemical graph theory* (Basak *et al.*, 1990; Trinajstić, 1992) y generando los así llamados “índices topológicos” (TI) (Basak *et al.*, 1997). La primera medida cuantitativa de Semejanza Cuántica Molecular fue formulada por Carbó (Carbó *et al.*, 1980). Aún cuando cualquier sistema cuántico se puede caracterizar completamente mediante una función de onda resultado de la ecuación de

Schrödinger, Carbó propuso una medida numérica comparativa usando la superposición de la densidad electrónica de carga de dos moléculas como fuente de comparación.

Esta definición llevó a la llamada *Molecular Quantum Similarity Measure (MQSM)*, calculada como el volumen integral entre las correspondientes *Funciones de Densidad (DF)* de los dos objetos comparados, medido por un operador no diferencial definido positivo, denominado operador de semejanza cuántica (Carbó *et al.*, 1980). Así, una medida de semejanza puede definirse mediante el cálculo computacional de una integral sobre las funciones de densidad asociadas a los sistemas moleculares en estudio. Las funciones de densidad se multiplican e integran sobre las coordenadas electrónicas en un dominio escogido convenientemente. La medida de semejanza se puede definir también como el producto escalar entre las funciones de densidad de primer orden moleculares asociadas a las moléculas comparadas, ponderado por un operador definido positivo bielectrónico no diferencial:

$$Z_{AB}(\Omega) = \langle \rho_A | \Omega | \rho_B \rangle = \iint \rho_A(r_1) \Omega(r_1, r_2) \rho_B(r_2) dr_1 dr_2 \quad (96)$$

A y B son los dos objetos cuánticos en estudio, r_1 y r_2 son los conjuntos de coordenadas electrónicas asociadas con las correspondientes funciones de onda, ρ_A y ρ_B las correspondientes funciones de densidad de primer orden o de densidad de probabilidad del electrón, y $\Omega(r_1, r_2)$ el operador definido positivo.

El índice de Carbó es equivalente a la normalización del valor de la medida de semejanza Z_{AB} en relación con los índices de autosemejanza de A, Z_{AA} , y de B, Z_{BB} . Matemáticamente, se puede expresar como:

$$C_{AB} = \frac{Z_{AB}}{\sqrt{Z_{AA} Z_{BB}}} \quad (97)$$

C_{AB} varía en el intervalo (0,1]. Cuanto más próximo a la unidad sea el valor, más

semejantes son los objetos entre sí. La unidad exacta solo se obtiene cuando los dos objetos que se comparan son el mismo. El conjunto global de medidas de semejanza cuántica, que compara todos los pares posibles de objetos cuánticos del sistema, se expresa en forma matricial. MQSM constituye una forma sencilla de obtener relaciones entre los objetos cuánticos comparados, identificando las características de densidad electrónica que varían de un sistema a otro.

2.16.- Mecánica Molecular (MM).

Muchos de los problemas que se necesita abordar en modelización molecular son demasiado grandes para ser tratados mediante métodos mecano-cuánticos. Los métodos de campos de fuerza (también conocidos como de mecánica molecular) ignoran los movimientos electrónicos y calculan la energía de un sistema, aplicando la mecánica clásica, como una función de posiciones nucleares únicamente. De ésta manera la mecánica molecular se utiliza para realizar cálculos de sistemas que contienen un número significativamente grande de átomos. En algunos casos los campos de fuerza pueden proporcionar resultados similares a los obtenidos por cálculos de mecánica cuántica de alto nivel en una fracción del tiempo de cálculo. Sin embargo, dada su intrínseca naturaleza clásica la mecánica molecular no puede proporcionar propiedades que dependen de la distribución electrónica en la molécula.

Esta aproximación de mecánica molecular funciona debido a la validez de varias suposiciones:

* *La aproximación de Born-Oppenheimer*, sin la cual sería imposible considerar la energía como una función de las coordenadas nucleares.

* *Un modelo simple de interacciones dentro del sistema* con contribuciones de procesos tales como el estiramiento de los enlaces (*stretching*), la apertura y acercamiento de ángulos y las rotaciones a través de enlaces simples. Aún cuando se usan funciones simples (como lo es la ley de Hooke) para describir estas contribuciones, si se escogen adecuadamente, pueden funcionar de

manera aceptable para reproducir resultados experimentales.

* *La capacidad de transferencia de las interacciones* de grupos específicos dentro de un campo de fuerza. Se puede establecer un grupo de parámetros desarrollados y probados en un número relativamente pequeño de casos, que será aplicable a un amplio intervalo de problemas. La capacidad de transferencia de los parámetros establecidos para moléculas pequeñas, permite utilizarlos para el estudio de moléculas mucho más grandes, tales como los polímeros (Jensen, 1999; Leach, 2001).

2.16.1.- Campos de Fuerza (FF)

Muchos de los campos de fuerza utilizados hoy en día para sistemas moleculares se pueden interpretar en términos de una imagen relativamente simple de tres componentes para las fuerzas inter- e intra-moleculares dentro del sistema:

- * Las variaciones energéticas debidas a la desviación de enlaces y ángulos con respecto a los valores de referencia o equilibrio.
- * Una función que describe como cambia la energía cuando se rotan los enlaces.
- * Términos que describen la interacción entre las partes no enlazadas del sistema.

Los campos de fuerza más sofisticados pueden contener términos adicionales, pero invariablemente contienen los tres componentes mencionados anteriormente. Una característica atractiva de esta representación es que los diferentes términos se pueden atribuir a cambios en coordenadas internas específicas, tales como longitudes de enlace, ángulos, rotación de enlaces o movimientos de átomos relativos a otros átomos (Grant y Richards, 1995). Esto hace más fácil el entendimiento de cómo los cambios del campo de fuerza afectan a su rendimiento, además de que ayuda en el proceso de parametrización. Una forma funcional para dichos campos de fuerza que puede ser utilizada para estudiar moléculas simples o conjuntos de átomos es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 V(\mathbf{r}^N) = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N (4\epsilon_{ij} [(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{12} - (\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^6] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}})
 \end{aligned} \tag{98}$$

donde $V(\mathbf{r}^N)$ denota la energía potencial como una función de las posiciones (r) de N partículas, normalmente átomos.

En la ecuación (98) el primer término considera la interacción entre pares de átomos enlazados, representados aquí por un potencial armónico que proporciona un incremento de energía en función de la diferencia entre la longitud de enlace l_i y el valor de referencia $l_{i,0}$. El segundo término es el sumatorio sobre todos los ángulos de valencia θ_i de la molécula, que también se representa utilizando un potencial armónico. El tercer término es un potencial torsional que considera los cambios de energía al rotar los enlaces ω . La cuarta contribución es el término no enlazante. Éste se calcula entre todos los pares de átomos (i y j) que están en diferentes moléculas o que se encuentran en la misma molécula pero separadas por al menos tres enlaces. En un campo de fuerza simple, los términos no enlazantes se suelen representar utilizando un término de potencial de Coulomb para las interacciones electrostáticas y un potencial de Lennard-Jones para las interacciones de van der Waals.

Los campos de fuerza utilizados en modelización molecular están diseñados principalmente para reproducir propiedades estructurales. La capacidad de transferencia de la forma funcional y de los parámetros, permite utilizar el mismo conjunto de parámetros para estudiar una serie de moléculas relacionadas, en lugar de tener que definir un nuevo conjunto de parámetros para cada molécula de manera individual (Jensen, 1999; Leach, 2001).

2.16.2.- Docking.

En el acoplamiento (*docking*) molecular se intenta predecir la estructura o

estructuras del complejo intermolecular formado entre dos o más moléculas. El acoplamiento se utiliza ampliamente para sugerir las formas de enlace de inhibidores protéicos. La mayoría de los algoritmos de *docking* son capaces de generar un gran número de estructuras posibles, por lo que el principal problema a resolver es el de evaluar las distintas estructuras de complejos intramoleculares para identificar la de mayor interés.

El proceso de *docking* involucra varios grados de libertad. Existen seis grados de libertad traslacional y rotacional de una molécula con relación a otra. El problema se puede abordar manualmente utilizando computación gráfica interactiva. Este tipo de aproximación puede ser muy efectiva si tenemos una idea muy buena del modo de enlace esperado. Sin embargo, aún en dichos casos se debe ser cauteloso; los experimentos cristalográficos de rayos-X han mostrado que aún inhibidores muy similares pueden mostrar grandes diferencias en el modo de enlace. Los algoritmos automáticos de *docking* pueden estar menos predispuestos que las modelizaciones humanas y generalmente consideran muchas más posibilidades (Jensen, 1999; Halperin *et al.*, 2002).

Se han desarrollado varios algoritmos para abordar el problema de *docking*. Estos se pueden caracterizar de acuerdo al número de grados de libertad que ignoran. De esta manera, los algoritmos más simples tratan las dos moléculas como cuerpos rígidos y exploran únicamente los seis grados de libertad traslacionales y rotacionales. Los primeros algoritmos para el acoplamiento de moléculas pequeñas como ligandos en sitios de enlace de proteínas y ADN utilizaban esta aproximación. Un ejemplo bien conocido de dicho algoritmo es el programa DOCK (Kuntz *et al.*, 1982) el cual está diseñado para encontrar moléculas con un alto grado de complementariedad al sitio de enlace.

Para realizar un acoplamiento conformacionalmente flexible se deben tener en cuenta los grados de libertad conformacionales. La mayoría de los métodos que tratan de incluir los grados de libertad conformacionales únicamente consideran el espacio conformacional del ligando; se supone al receptor invariablemente rígido. Todos los métodos comunes para la búsqueda del espacio conformacional se incorporan en algún estado del algoritmo de acoplamiento. Por ejemplo, los métodos de Monte Carlo (Cramer, 1968; Allen, 1995) se han utilizado para realizar acoplamiento molecular,

generalmente con *simulated annealing* (Kirkpatrick *et al.*, 1983). En cada iteración del procedimiento de Monte Carlo cambia la conformación interna del ligando (por medio de la rotación de un enlace) y la molécula entera es rotada o trasladada aleatoriamente. La energía del ligando dentro del sitio de enlace se calcula usando mecánica molecular y el movimiento se acepta o se rechaza utilizando el criterio estándar de Metrópolis (Métropolis *et al.*, 1953). Éste mantiene un registro de aquellas regiones en el espacio de búsqueda que ya se han visitado, asegurando que el método realiza una exploración amplia de los posibles sitios de enlace.

Los algoritmos genéticos (Goldberg, 1989) pueden utilizarse también para realizar acoplamiento molecular. Cada *cromosoma*, en la jerga de estos algoritmos, no codifica únicamente la conformación interna del ligando sino también la orientación del ligando dentro del sitio receptor. Tanto la conformación interna como la orientación variarán según la población involucrada. El registro de cada estructura acoplada dentro del sitio actúa como la función de idoneidad usada para seleccionar los individuos para la siguiente iteración.

La distancia geométrica se puede utilizar para realizar el acoplamiento molecular. El mayor problema detectado es encontrar una manera para generar conformaciones del ligando dentro del sitio de enlace. Una manera de lograr esto es utilizando una función de *castigo* modificada que obliga a la conformación del ligando a permanecer dentro del sitio de enlace. Por ejemplo, se puede agregar un término de *castigo* adicional que tenga el efecto de forzar el ligando a caer en el agregado de esferas derivado del acoplamiento que representa el sitio de enlace.

El método ideal de acoplamiento permitiría explorar los grados de libertad conformacionales del ligando y del receptor. Sin embargo, estos cálculos son computacionalmente muy demandantes y en la práctica solo son útiles para refinar las estructuras obtenidas utilizando otros métodos de acoplamiento; la dinámica molecular no explora muy bien el espacio de modos de enlace, excepto para ligandos muy pequeños y móviles. Para muchos sistemas las barreras de energía que separan un modo de enlace de otro son demasiado grandes para superarlas. Se han realizado algunos otros intentos para incorporar la flexibilidad de la proteína (por lo menos a nivel de cadena lateral), pero estos métodos están en sus comienzos y son mucho más complejos que el acoplamiento con proteína rígida (Halperin *et al.*, 2002).

2.16.3.- Funciones de scoring o idoneidad

La mayoría de los algoritmos de acoplamiento son capaces de generar un gran número de soluciones potenciales. Algunas de estas pueden ser rechazadas inmediatamente debido a que corresponden a soluciones de muy alta energía. El resto debe ser probado utilizando alguna función que dé idea de la *bondad* del resultado. Este tipo de funciones se denominan de *scoring* o idoneidad y un ejemplo típico es la energía de interacción ligando-receptor. Cuando estamos interesados únicamente en cómo un sólo ligando se enlaza a la proteína, entonces la función de *scoring* necesita ser capaz de identificar la orientación de acoplamiento más cercana que corresponda a la *verdadera* estructura del complejo intermolecular. Sin embargo, cuando se acopla una base de datos de moléculas, entonces la función de *scoring* debe además ser capaz de categorizar un ligando con respecto a otro. Además el gran número de orientaciones que puede generarse durante un cálculo de acoplamiento significa que debe ser posible calcular la función de *scoring* rápidamente (Jensen, 1999; Leach, 2001; Halperin *et al.*, 2002).

Muchas de las funciones de *scoring* intentan aproximar la energía libre de enlace para el ligando enlazado al receptor. Otros métodos tienden a considerar que la energía libre de enlace se puede describir como una función aditiva de varios componentes para reflejar las diversas contribuciones de enlace. Una función completa de este tipo tendría las siguientes contribuciones (Ajay, 1995):

$$\Delta G_{en} = \Delta G_{sol} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{tlr} + \Delta G_{vib} \quad (99)$$

donde ΔG_{sol} es la contribución debida a los efectos del disolvente que proviene del equilibrio de interacciones entre el disolvente y el ligando, la proteína y el complejo intermolecular. Se pueden utilizar diversos métodos para determinar estas contribuciones. ΔG_{conf} proviene de los cambios conformacionales en la proteína y en el ligando. En muchos casos la proteína no cambia mucho en el enlace ya que la mayoría de los métodos de acoplamiento consideran un receptor rígido. Por el contrario, el ligando cambia de conformación cuando se enlaza en disolución, por lo que

frecuentemente se considera como una conformación única en el estado de enlace. ΔG_{int} es la energía libre debida a interacciones específicas ligando-proteína. ΔG_{rot} es la energía libre perdida asociada con rotaciones internas congeladas de la proteína y el ligando. ΔG_{tr} es la pérdida de energía libre rotacional y traslacional causada por la asociación de dos cuerpos (el ligando y el receptor) para dar un único cuerpo (el complejo intermolecular). Frecuentemente se considera constante para todos los ligandos y de esta manera se ignora cuando se está interesado en las fuerzas relativas de enlace de diferentes ligandos. ΔG_{vib} es la energía libre debida a los cambios en los modos vibracionales. Esta contribución es difícil de calcular y generalmente se ignora. Cada uno de los términos en la ecuación (99) han sido objeto de discusión en la literatura, y para algunos de ellos existen diferentes aproximaciones para su estimación (Jensen, 1999).

Capítulo III

El problema biológico

3.1.- Mecanismo General de actividad farmacológica.

3.1.1.- Interacción (llave-cerradura).

Del análisis de los avances de los últimos años en farmacología, se extrae una clara conclusión: las proteínas son a menudo el objetivo molecular de los fármacos. Claramente, una afirmación tan genérica implica importantes matices. ¿Qué clase de proteínas son el objetivo de los fármacos? La respuesta a esta pregunta está basada en el hecho de que la proteína a considerar depende del mecanismo patofisiológico de la enfermedad a tratar.

En general (Leurs, 2002) ha llegado a establecerse que los fármacos actúan principalmente *vía* cuatro tipos de proteínas reguladoras:

- * Enzimas
- * Transportadores (*Carriers*)
- * Canales iónicos
- * Proteínas receptoras

Dentro de las proteínas receptoras, se distinguen cuatro super-familias:

- * Canales iónicos activados por ligando
- * Receptores de acoplamiento de proteínas G
- * Receptores de enlace de Tirosina kinasa
- * Receptores intracelulares que regulan la transcripción de genes

A la fecha se puede afirmar que los fármacos que interaccionan con los receptores están entre los más importantes en medicina, y proporcionan tratamiento para problemas tales como dolor, depresión, enfermedad de Parkinson, patologías cardíacas, etc. También se debe resaltar el hecho de que la diferencia más importante entre la actuación de una enzima y de un receptor, es que en el caso del receptor no se produce ninguna reacción química, sino un proceso físico que tiene que ver con un cambio en la *forma* del receptor.

En cuanto al objeto de estudio de este trabajo, nos centraremos en el mecanismo de actuación de un fármaco y un centro receptor. En particular nos centraremos en el sistema nervioso central (CNS) que actúa como el mecanismo principal de comunicación en todo el cuerpo humano, transportando las sensaciones que, a través de los mensajeros, activan las respuestas del organismo.

En el modelo de acción farmacológica de proteínas receptoras, las propuestas generalmente admitidas establecen que la molécula mensajera debe reunir las características fisicoquímicas adecuadas para encajar dentro del receptor. Así, en el receptor, existe un área que tiene *la forma correcta* para que el mensajero químico encaje en ella (como la llave en la cerradura), que se conoce bajo el nombre de *sitio receptor* (Patrick, 1997). Cuando el mensajero alcanza el sitio receptor, se produce la *activación* del mismo, y la transmisión del mensaje. La célula destino interpreta el mensaje recibido, y produce la acción que se le requiere (e.g. una contracción muscular, el movimiento del corazón, etc.). Evidentemente, sólo *la llave* correcta puede producir la acción esperada, que es *abrir la cerradura*, concepto que explica la especificidad de un determinado agente.

Una vez se ha producido la activación del receptor, el resto de los componentes celulares deben intervenir para completar el trabajo. Ahora bien, sabemos que la

membrana celular está compuesta fundamentalmente por moléculas lipídicas, las cuales no son polares, motivo por el cual los iones (e.g. sodio y potasio, fundamentales para la actividad nerviosa), no podrían atravesarla, aún cuando es un hecho que sí la atraviesan. Respecto a este paso de iones, se ha comprobado que existen estructuras proteínicas que atraviesan la membrana celular, que se denominan *canales iónicos* (Patrick, 1997), tales que su estructura la componen varias subunidades de proteína, y su apariencia es la de un hueco, recubierto por aminoácidos polares, que proporciona un poro hidrofílico.

El canal iónico se encuentra bloqueado por un mecanismo que se abre y cierra según los requerimientos de la acción. Así, cuando un mensajero químico interactúa con el receptor, le produce un cambio de forma, el cual induce la apertura del canal iónico y permite la entrada de los iones. Abriendo un poco el canal iónico, varios miles de iones se movilizan para cada molécula de neurotransmisor encajada en el receptor.

Aún cuando el mecanismo de acción de los receptores de canales iónicos activados por ligando parece ser el más frecuente, existe también la situación de que otros canales se activan por cambios de potencial eléctrico en la membrana celular, y su actividad puede ser modulada por receptores asociados que enlazan ligandos o directamente por los ligandos en sí mismos. En todo caso, existen paralelismos estructurales y funcionales entre los canales potencial-sensitivos (activados por voltaje), y los canales quimio-sensitivos (activados por ligando) (Leurs, 2002).

Para este trabajo, es especialmente importante el funcionamiento de los receptores de canal iónico activado por ligando, dado que todas las moléculas que se estudian son especies cargadas, activas como agonistas nicotínicos con capacidad de activar el mecanismo farmacológico del receptor nAChR.

3.1.2.- Agonista. Antagonista.

Un fármaco puede actuar bloqueando algunos receptores de la célula, evitando que los ligandos naturales ocupen estas posiciones. Este fármaco se denomina *antagonista* del ligando (*realiza una acción competitiva*) (Patrick, 1997). Por otro lado, el fármaco puede sustituir a los ligandos, suministrando una cantidad adicional de moléculas capaces de reforzar el sistema de comunicación debilitado. En este caso se denomina *agonista* del ligando (*realiza la misma acción*) (Patrick, 1997).

Basándonos en los conceptos de agonistas y antagonistas, podemos lograr una

buena comprensión de los fenómenos de tolerancia y dependencia que el organismo presenta frente a algunos fármacos.

La tolerancia es una situación en que se requieren cada vez más altos niveles de un fármaco para producir la misma respuesta biológica. Si el fármaco está actuando suprimiendo el enlace del ligando, entonces la célula puede responder incrementando el número de receptores. Esto podría requerir incrementar la dosis para obtener el mismo nivel de antagonismo.

Por otro lado, si se interrumpe bruscamente el suministro del fármaco, entonces todos los receptores quedarían de repente disponibles. Habría un exceso de receptores lo cual podría volver a la célula supersensible a niveles normales de ligandos. Esto produciría efectos equivalentes a los de ingerir una sobredosis. Los efectos biológicos resultantes, podrían inducir al individuo a tratar de ingerir una nueva dosis de fármacos, para recuperar su estado *normal* (Patrick, 1997).

3.1.3.- Concepto de farmacoforo.

Como el mecanismo de acción de los receptores implica una cuestión de forma, se define el farmacoforo como la ordenación específica tridimensional de grupos químicos esenciales comunes a las moléculas activas, que es reconocida por un receptor (Leurs, 2002). Por supuesto que, además de las características anteriores, el farmacoforo deberá reunir las condiciones adecuadas de tamaño y forma, de modo que la unión con el sitio de enlace del receptor pueda tener lugar.

En todo caso, esta definición implica muchas simplificaciones, como es hablar de un modo de enlace sencillo, o un conjunto sencillo de grupos interactivos, pero representa un importante intento de racionalizar los datos farmacológicos.

Una parte significativa de los esfuerzos de la farmacología actual se orienta a desarrollar hipótesis sobre qué grupos químicos son importantes para una actividad biológica particular y qué ordenaciones tridimensionales de estos grupos encajan con el receptor, o forman parte de la conformación activa de cada molécula. La complejidad del problema aumenta si consideramos que las conformaciones preferidas pueden no ser las mismas en estado cristalino que en vacío o en disolución.

Aún cuando no se conozca casi nada sobre las propiedades a nivel microscópico del receptor asociado con una actividad biológica dada, se puede deducir el farmacoforo

a partir de un conjunto de moléculas ligando activas e inactivas, algunas de las cuales puedan presentar flexibilidad conformacional.

3.1.4.- Actividad.

Para obtener una apreciación de la naturaleza cuantitativa de la interacción fármaco-receptor, se han realizado importantes estudios en tejidos aislados, sumergidos en baños de soluciones fisiológicas, estableciéndose un conjunto de valores farmacocinéticos que facilitan el análisis de los efectos de la administración de un determinado fármaco. Dichos estudios típicamente se han basado en la preparación de los tejidos con distintas concentraciones del agonista midiendo los efectos producidos, que a su vez se recogen en una representación gráfica conocida con el nombre de *curvas de dosis-respuesta*. En dichas representaciones, la primera conclusión que se extrae, es que al tratarse de una relación sigmoideal (Leurs, 2002), a partir de una determinada dosis del ligando, no se obtiene un incremento en la respuesta.

La clásica teoría de Clark (Leurs, 2002) explica las relaciones de dosis-respuesta en términos de ocupación de los centros receptores. Se establece que la respuesta a un fármaco es proporcional al número de receptores ocupados en el equilibrio, y que la máxima respuesta ocurre cuando todos los receptores están ocupados. Así:



Aplicando la ley de acción de masas, la constante de equilibrio , K_A , que a su vez es una medida de la afinidad de un ligando por su receptor, puede expresarse como:

$$K_A = \frac{F \cdot R}{FR} \quad (100)$$

Luego a menor valor de K_A , mayor es la afinidad del fármaco por su receptor. Si aceptamos que la proporción de receptores ocupados en el equilibrio es igual a y y entonces la proporción de receptores libres es igual a $(1 - y)$, y por tanto:

$$K_A = \frac{F(1-y)}{y} \quad (101)$$

o bien

$$y = \frac{F}{F+K_A} \quad (102)$$

Entonces, para la mitad de la respuesta máxima, la mitad de los receptores estarán ocupados, y la concentración requerida (denominada EC_{50}) podría igualar la constante de equilibrio.

Así pues, se establece la afinidad en términos de la ocupación del receptor, mientras que la eficacia es la medida de la respuesta del complejo fármaco-receptor. Se puede resumir la teoría de Clark en la ecuación:

$$efecto = E_{\max} \frac{F}{K_A + F} \quad (103)$$

donde E_{\max} es el efecto máximo.

Esta teoría se aplicó con éxito hasta que se descubrieron discrepancias entre EC_{50} y K_A debido al *agonismo parcial*. Se identifica el agonismo parcial con el hecho comprobado experimentalmente de que distintos agonistas actuando frente al mismo receptor pueden producir diferentes respuestas máximas a ocupaciones máximas del receptor, un comportamiento que no puede ser explicado por la teoría de la ocupación.

En 1954, Ariëns (Ariëns, 1954) dividió la respuesta biológica en dos parámetros separados, la afinidad y la actividad intrínseca. La afinidad describe la ligazón del fármaco con el receptor y se asume que está gobernada por la ley de acción de masas. La actividad intrínseca se relacionó con la capacidad del fármaco para inducir un efecto después del enlace. Siendo α la actividad intrínseca, cuyos valores son 1 para la máxima respuesta (*agonismo total*), y 0 para el antagonismo, se introduce el concepto de agonismo parcial con valores para α entre 0 y 1, y, a partir de la ecuación (103) se obtiene la siguiente ecuación:

$$efecto = \alpha E_{\max} \frac{F}{K_A + F} \quad (104)$$

en la cual se tiene en cuenta una actividad intrínseca para un agonista parcial menor que para un agonista total. A pesar de lo cual, seguían existiendo discrepancias al no tener en cuenta la existencia de receptores “sobrantes” (*spare receptors*)¹.

Stephenson en 1956 (Stephenson, 1956), aceptó que el complejo fármaco-receptor proporciona un estímulo S en el tejido, y el estímulo es directamente proporcional a la fracción de receptores ocupados. La respuesta, pues, se relaciona con el estímulo a través de una función. El factor de proporcionalidad entre la fracción ocupada de la población del receptor, R_t , y el estímulo se definió como la eficacia e. La eficacia de un fármaco se refiere a la acción del fármaco en un tejido particular, luego es una medida de la capacidad del fármaco para producir una respuesta en un tejido dado. Un parámetro adicional, la eficacia intrínseca ϵ , se define para describir la *actividad estimulante* del fármaco en sí mismo, independientemente del tejido. La eficacia y la eficacia intrínseca se relacionan a través de :

$$e = \epsilon R_t \quad (105)$$

El estímulo es:

$$S = e \frac{F}{F + K_A} = \frac{\epsilon R_t F}{F + K_A} \quad (106)$$

Y la respuesta puede ser definida como:

¹

Contrariamente a la teoría de Clark, se ha observado que algunos agonistas pueden generar una respuesta máxima sin alcanzar la ocupación total de los receptores. Esto significa que algunos receptores se pueden considerar como “sobrantes”. Es importante resaltar que, en todo caso, estos *spare receptors* no presentan ninguna diferencia con los que se han ocupado.

$$RESP=f(S)=f\left(\frac{\epsilon R_f F}{F+K_A}\right) \quad (107)$$

Consiguiendo una formulación que explica las discrepancias entre EC_{50} y K_A y justifica el agonismo parcial y los receptores “sobrantes”, si bien la relación exacta entre el efecto y la ocupación permanece poco clara.

3.2.- Dolor y analgesia.

La supresión del dolor es uno de los mayores retos en que se encuentra empeñada la industria farmacológica. Sólo en Estados Unidos, más de 100 millones de personas sufren episodios de dolor moderado a severo a lo largo de un año, siendo el dolor la primera razón de visitas al médico. En general, el dolor sirve como alerta sobre daños en algún tejido, o de potenciales peligros subyacentes, pero también es cierto que una anormal percepción del dolor causada por daños en el sistema nervioso central, puede producir un dolor crónico neuropático que persiste aún en ausencia del estímulo nocivo.

Para el control del dolor, se utilizan actualmente dos tipos de analgésicos: los opiáceos y los antiinflamatorios no esteroideos (*Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs, NSAIDs*). Los opiáceos, como la morfina, representan la línea estándar para luchar contra el dolor severo. Su uso se remonta a épocas en que la corteza de sauce o las adormideras del opio se aplicaban a sujetos víctimas de dolor. Estos compuestos no son efectivos en todos los tipos de dolor y el desarrollo de tolerancia y efectos secundarios limita su uso. Además, se trata de sustancias controladas, con riesgos importantes por su abuso.

Los NSAIDs son efectivos para el dolor medio y moderado con componente inflamatorio, pero no son particularmente eficaces en cuadros de dolor severo, crónico o neuropático. Además su uso se ha visto restringido por su capacidad para inducir dolor gástrico y hemorragias gástricas, efectos secundarios que causan graves problemas todos los años. Por esta razón, y ante el enorme mercado implicado, las más importantes

industrias farmacéuticas llevan décadas trabajando en la identificación de analgésicos que aporten soluciones de amplio espectro, pero sin las características asociadas a las interacciones con el receptor opiáceo y por tanto sin sus efectos secundarios, ni los problemas gástricos asociados con los NSAIDs.

Se están realizando grandes esfuerzos para identificar nuevos analgésicos, en campos tales como los antagonistas del receptor neuroquinina-1, bloqueadores del canal de sodio, antagonistas del receptor de glutamato NMDA (N-metil-D-Aspartato), agonistas muscarínicos colinérgicos, o, los que nos ocupan en éste trabajo, los analgésicos que actúan sobre el receptor nicotínico de la acetilcolina.

3.3.- Analgésicos nicotínicos.

3.3.1.- Acetilcolina y receptores.

El clásico experimento de Dale (Dale, 1914), estableció que la acción farmacológica de la acetilcolina sobre el sistema nervioso central, se ejerce vía dos tipos de receptores, designados como nicotínico y muscarínico. Estas denominaciones proceden de los agentes utilizados en el establecimiento de las diferentes características de los dos distintos mecanismos de acción, la nicotina y la muscarina.

Los trabajos realizados con ambos tipos de receptores, permiten establecer que cada uno de ellos parece interactuar con grupos químicos diferentes en la acetilcolina. En particular, en el caso de los receptores nicotínicos, se llega a proponer que la interacción de la acetilcolina con el receptor está determinada por una interacción coulombiana que implica al nitrógeno cuaternario, y por la formación de un enlace de hidrógeno, en el cuál el oxígeno carbonilo actúa como aceptor (Beers y Reich, 1970). Un reciente estudio teórico (Muñoz-Caro *et al.*, 2005), realizado sobre los compuestos acetilcolina, nicotina y muscarina, presenta, para los confórmeros más estables de la acetilcolina y la nicotina, una distribución farmacofórica similar utilizando el oxígeno del grupo éster de la acetilcolina. La comparación entre los confórmeros más estables de la acetilcolina y la muscarina, utilizando el oxígeno carbonilo de la acetilcolina, también ofrece un patrón farmacofórico similar.

En 1932, Davis y colaboradores (Davis *et al.*, 1932) encontraron que la nicotina era eficaz en el tratamiento del dolor en gatos en un modelo de dolor visceral. También se ha podido establecer que su mecanismo de acción en el sistema nervioso es a través de un receptor colinérgico, el receptor nicotínico, por lo que su actividad analgésica está mediada por un mecanismo distinto al de los opiáceos. Sin embargo, la nicotina no se ha desarrollado como un agente analgésico debido a su pobre espectro de actividad antinociceptiva, a su baja actividad intrínseca relativa a la de los opiáceos y a su perfil de efectos secundarios.

3.3.2.- Receptor nicotínico.

El receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR), es el sistema receptor mejor caracterizado. Esto se debe, por un lado, al hecho fortuito de la existencia en la naturaleza de la especie de raya eléctrica Torpedo, que dispone de una extraordinaria abundancia de receptores nicotínicos en sus órganos eléctricos (apilamientos de electrocitos). Por otro lado, se dispone de una gran cantidad de marcadores para el receptor nicotínico. De esta forma, este sistema fue aislado y purificado una década antes que otros receptores (Taylor e Insel, 1990). Aplicando técnicas de biología molecular de transcripción inversa y clonado de genes, se ha conseguido deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas del receptor.

Se sabe que este receptor se encuentra implicado en la transducción quimioeléctrica de la acción neuromuscular y de la sinapsis colinérgica del sistema nervioso central, captando la acetilcolina emitida en un breve pulso, que alcanza una concentración local de hasta 1 mM durante algo menos de un milisegundo. La acetilcolina se ancla al nAChR y abre el canal iónico de K^+ y Na^+ , provocando la acción correspondiente dependiendo del tejido implicado.

Se ha llegado a establecer que la estructura del receptor es una estructura pentamérica de cinco subunidades, siendo dos de las mismas iguales. Las subunidades diferentes identificadas, se han denominado α , β , γ , δ y ϵ , (Lukas *et al.*, 1999) de las cuales la que aparece doble es la α . Los estudios realizados han establecido la existencia de nueve subtipos de subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 9$), cuatro de β ($\beta 1$ - $\beta 4$), y una para el resto (Lukas *et al.*, 1999). En mamíferos, se han identificado ocho subunidades α ($\alpha 2$ -

$\alpha 9$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Changeux *et al.*, 1998). Las combinaciones posibles de las distintas subunidades generan como es evidente una enorme cantidad de subtipos posibles de receptores, si bien en la realidad se han identificado un número pequeño de los mismos. Farmacológicamente, los nAChRs se clasifican en dos superfamilias: los que enlazan con gran afinidad con la α -bungarotoxina (α -BTX) y los que no.

De los resultados obtenidos en lo que hoy se conoce como la primera era de los estudios de estructura-actividad de los receptores nicotínicos de la acetilcolina, se pudo concluir que el nAChR en los músculos consiste en cuatro subunidades distintas de secuencias de aminoácidos parcialmente homólogos, ordenados alrededor de un seudo eje de simetría, perpendicular al plano de la membrana celular. Una de las subunidades, la α , se expresa en dos copias, mientras que las otras tres (β , γ y δ), están presentes como copias sencillas. Así, se puede afirmar que el receptor del tejido muscular es un pentámero de masa molecular cercana a los 300 kDa (Devillers-Thiéry *et al.*, 1993). Estudios estructurales muestran que las subunidades están ordenadas alrededor de una cavidad central con la porción más larga de la proteína expuesta hacia la superficie extracelular. La cavidad central parece ser el canal iónico, el cual es impermeable a los iones en el estado de reposo, pero bajo activación se abre hasta un diámetro de alrededor de 6.5Å.

En fechas más recientes, en la segunda era, o era central, se prestó especial atención a la identificación de la estructura y los mecanismos de acción de los nAChRs en el tejido neuronal. Se identificó así el llamado subtipo $\alpha 4\beta 2$, que es el que está presente en forma mayoritaria en el sistema nervioso central (SNC), y que se ha convertido en el objetivo de la investigación de nuevos fármacos una vez probada su alta afinidad por la nicotina, la citisina y un buen número de otros alcaloides nicotínicos clásicos, al tiempo que no presenta afinidad por la α -BTX. También presente en el SNC se encuentra el subtipo $\alpha 7$, el cuál también presenta cierta afinidad con la nicotina, y sigue un patrón de distribución diferente del $\alpha 4\beta 2$, siendo claramente α -BTX .

En todo caso, el subtipo $\alpha 4\beta 2$ parece ser de importancia crítica en la atenuación del dolor térmico agudo mediado por los nAChRs. (Decker *et al.*, 2001).

3.3.3.- Epibatidina.

En 1974, John Daly y colaboradores, del *National Institute of Health* recogieron algunos ejemplares de un curioso espécimen de rana del Ecuador, el *Epipedobates Tricolor*. Ya en el laboratorio, extrajeron de la piel de la rana unas pequeñas muestras conteniendo un alcaloide. A continuación, provocando en ratones síntomas de dolor agudo, les inyectaron el alcaloide y comprobaron que producía en los animales efectos similares a los de los compuestos opiáceos. Dos años después, Daly consiguió más ranas, y obtuvo un miligramo del material activo. Desafortunadamente, la tecnología existente en aquellos años, no permitía elucidar la estructura de un compuesto con tan pequeña cantidad de material.

En la década de 1980, se dictó un tratado para la protección de la especie de ranas, que estaba al borde de la extinción, y no se pudieron obtener más individuos para la experimentación. Daly consiguió que los animales se reprodujeran en cautividad, pero, en estas condiciones, la piel de la rana no contenía el codiciado material analgésico. Se concluyó que el *Epipedobates Tricolor* sintetizaba el alcaloide a través de alguna fuente de su dieta.

Ante éstas circunstancias, Daly no pudo sino denominar al compuesto desconocido como alcaloide 208/210 y esperar a que en años siguientes se produjeran avances técnicos suficientes para poder llegar a establecer la estructura del compuesto. Este hecho sucedió unos diez años después (Spande *et al.*, 1992), en que se pudo aplicar espectroscopia de resonancia magnética nuclear, y se consiguió conocer la estructura del alcaloide desconocido, al que se renombró como epibatidina.

Las propiedades del compuesto, conocidas a partir de las nuevas técnicas, permitieron afirmar que se trataba de un exo-2-(6-cloro-3-piridin)-7-azabicyclo[2.2.1]-heptano. La epibatidina se convertía así en el cabeza de serie de una nueva clase de alcaloides, cuyo tipo estructural había sido desconocido hasta el momento.

Los trabajos de Daly y otros laboratorios, sirvieron para afirmar que las dos especies de enantiómeros de la epibatidina, el (+) y el (-), presentan una potente actividad analgésica frente a los receptores nicotínicos. Las pruebas *in vivo* en ratones, demostraron un alto poder analgésico para el (+)-enantiómero en la dosis de 2.5 µg/Kg, siendo ligeramente menor para el (-)-enantiómero, de 5 µg/Kg, obteniéndose en ambos

casos una actividad analgésica comparable a la de 10 mg/Kg de morfina. La analgesia obtenida por la (-)- epibatidina fué en todo caso eliminada por el antagonista nicotínico mecamilamina (Badio y Daly, 1994; Qian *et al.*, 1997), al tiempo que la mecamilamina no reduce de manera significativa la analgesia obtenida por la morfina. También se pudo comprobar que tanto la (+)-epibatidina como la (-)-epibatidina inhibían el enlazamiento de la [³H]-nicotina en la membrana cortical del cerebro de las ratas (nAChR $\alpha 4\beta 2$). Los valores de K_i fueron, respectivamente, de 0.045 ± 0.004 y 0.058 ± 0.007 nM, (Badio y Daly, 1994) que demuestran cómo el enantiómero (+) fué ligeramente más potente que el (-). Otros trabajos presentan valores de K_i de 20 nM y 3 nM para los subtipos $\alpha 7$ y neuromuscular ($\alpha 1\beta 1\gamma\delta$).

En estos trabajos, quedó también establecido que la epibatidina en cantidad de 10 μ M, no actuaba sobre los receptores opiáceos, muscarínicos o receptores tipo 1 de serotonina. En todas las pruebas, la epibatidina fué bloqueada por los antagonistas nicotínicos. En pruebas sobre ratones se estableció que la epibatidina presentaba una potencia analgésica 200 veces mayor que la morfina. La epibatidina continuaba ejerciendo su acción en presencia de naloxona, un antagonista opiáceo, y era inhibida por el antagonista nicotínico mecamilamina, lo que indicaba que se trataba de un nuevo tipo de analgésico que actuaba sobre el receptor nicotínico, nAChR.

En todo caso, el comportamiento agonista de la nicotina de la epibatidina, se puede justificar por las similitudes estructurales de los dos compuestos. La principal diferencia es la no estereoespecificidad de la epibatidina (Lloid y Williams, 2000), en la que los dos enantiómeros presentan factores de actividad similares, mientras que desde los trabajos de Badio y Daly se conoce que la (-)-nicotina tiene un valor de $K_i = 1.4-1.9$ nM, y la (+)-nicotina $K_i = 30-50$ nM, claramente divergentes. Así pues, al contrario que la nicotina, el enlace de la epibatidina a los receptores nicotínicos, debe ocurrir de modo que la posición relativa del anillo cloropiridínico no sea crucial para la actividad.

Las estructuras de la nicotina y la epibatidina son muy similares. Ambas contienen un anillo piridínico de seis miembros y un nitrógeno básico unido al anillo piridínico por uno o dos carbonos. Ambos nitrógenos básicos forman parte de un anillo de cinco miembros (en la epibatidina, el anillo de cinco miembros forma parte de la estructura azabicyclo-heptano). Dukat y colaboradores (Dukat *et al.*, 1994) demostraron mediante modelos tridimensionales que la epibatidina y la nicotina pueden interactuar con

receptores de apariencia similar.

Los estudios realizados con la epibatidina pusieron en evidencia las contrapartidas de este compuesto. Así, por ejemplo, junto con su acción antinociceptiva se presentaban importantes efectos secundarios, como hipertensión o parálisis neuromuscular para dosis muy próximas a las requeridas para una acción farmacológica eficaz. Además hay muy poca separación entre la dosis letal y la dosis antinociceptiva. También, al parecer, la administración consecutiva del compuesto en animales potencia su toxicidad. También se puso de manifiesto que el compuesto interactuaba con varios de los subtipos existentes de los nAChRs, en concreto los presentes en los sistemas ganglionar, neuromuscular y nervioso central, pudiendo relacionarse la variedad de efectos secundarios presentes en su administración con la baja especificidad presentada.

Estudios recientes, realizados por Lee (Lee, 2004), permiten establecer que, aunque la epibatidina no es selectiva en cuanto a los subtipos del receptor nicotínico, sí lo es en cuanto a la familia de los receptores nicotínicos, con muy pequeños efectos sobre los receptores muscarínicos.

Es pues impensable el uso clínico de la epibatidina, algo que se conoce desde los primeros trabajos realizados con el compuesto. Su estudio, en cambio, abrió el camino para la búsqueda de compuestos con estructuras similares que no presentaran su toxicidad. En la actualidad, este compuesto sigue siendo la base de muchos trabajos realizados para la búsqueda del mecanismo de acción de los receptores nicotínicos (Astles, 2002; Kanne *et al.*, 2005; Daly, 2005; Yogeewari *et al.*, 2006).

3.3.4.- Nuevos analgésicos nicotínicos.

En 1989 los laboratorios Abbott, en clara divergencia con las principales líneas de trabajo en aquellos momentos, decidieron reorientar sus esfuerzos en la búsqueda de un fármaco paliativo para la enfermedad de Alzheimer. De esta forma, los trabajos con agonistas muscarínicos se dirigieron hacia los agonistas de los receptores nicotínicos. Basándose en los conocidos efectos positivos de la nicotina sobre los enfermos de Alzheimer, se plantearon la búsqueda de compuestos que produjesen los efectos benéficos de la nicotina y no presentaran sus efectos secundarios. Para ello trabajaron produciendo diversas modificaciones de la nicotina. En concreto, en esta línea

de trabajo, se produjo la sustitución del anillo piridínico de la nicotina por otros anillos heterocíclicos.

Uno de los compuestos obtenidos en ésta fase, el ABT-418, confirmó las teorías de los científicos del programa, al presentar un perfil biológico muy similar al de la nicotina, pero con una excelente separación entre efectos benéficos e indeseados. Este compuesto presentaba un potencial terapéutico interesante frente a la nicotina. Otros muchos compuestos desarrollados durante éste programa, presentaron una innegable afinidad hacia los nAChRs. Asimismo, compuestos con los que se había trabajado durante la etapa de agonistas muscarínicos fueron contrastados en cuanto a sus perfiles de actividad frente a los receptores nicotínicos. En concreto la serie de los éteres piridílicos produjo resultados prometedores. Así nació el A-84543, que en su tiempo fué el ligando conocido de más alta afinidad para los lugares de enlace del nAChR etiquetados por la [³H]citisina.

En aquellos momentos, los laboratorios Abbott desarrollaron varias líneas de compuestos, además de los éteres piridílicos, y obtuvieron el compuesto ABT-089 (Holladay y Decker, 2000). El ABT-089 se demostró mucho más selectivo en su afinidad, indicando que su actividad se orientaba especialmente a los subtipos de receptores nicotínicos cerebrales.

Cuando en los años 1990 se produjo la elucidación de la estructura de la epibatidina, poniéndose en evidencia las coincidencias estructurales de éste compuesto con la nicotina, al tiempo que se establecía que presentaba un importante poder analgésico a través de la activación de los nAChRs neuronales, los científicos de los laboratorios Abbott comprendieron que se trataba de una excelente oportunidad para reorientar su programa en la búsqueda de nuevos analgésicos.

En esta dirección, el equipo de los laboratorios trabajó en la caracterización del compuesto ABT-089, así como en la creación de nuevos compuestos, como variantes de la serie de éteres piridílicos y en estudios in vitro del comportamiento de la epibatidina (Decker y Meyer, 1999; Holladay y Decker, 2000; Meyer *et al.*, 2000; Rueter *et al.*, 2000; Decker *et al.*, 2001). Los compuestos probados de mayor poder analgésico, presentaban como característica común la posesión de un átomo de nitrógeno secundario en un anillo acetidínico. En concreto el compuesto A-98593, representó un importante avance con respecto a la epibatidina, si bien su perfil de toxicidad cardiovascular lo hacía todavía

indeseable para el desarrollo clínico.

Los esfuerzos invertidos en la síntesis de compuestos de la serie de éteres piridílicos acetidínicos, (Bannon *et al.*, 1998) dieron como resultado un compuesto denominado ABT-594, cuyo perfil biológico poseía propiedades que lo hacían aconsejable para estudios clínicos. El compuesto, de estructura (R)-5-(2-Acetidinilmetoxi)-2-cloropiridina, presentó en los ensayos con animales una clara interacción con el subtipo de receptor del sistema nervioso central $\alpha 4\beta 2$ (Meyer *et al.*, 2000), y una potencia analgésica 200 veces superior a la de la morfina, sin sus efectos secundarios (Donnelly-Roberts *et al.*, 1998).

La actividad del ABT-594, la (-)-nicotina y la (\pm)-epibatidina para el subtipo de receptor nicotínico neuronal de la acetilcolina, el $\alpha 4\beta 2$, se determinó mediante el uso del enlace a la [3 H]citisina en la membrana del cerebro de ratas (Donnelly-Roberts *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001). Los valores de la constante de inhibición para los tres ligandos fueron $K_i = 37$ pM para el ABT-594, $K_i = 1$ nM para la (-)-nicotina, $K_i = 42$ pM para la (\pm)-epibatidina. En la interacción con receptores del tejido neuromuscular, el ABT-594 presentaba unas 4000 veces menos afinidad que la (\pm)-epibatidina. La morfina permaneció inactiva para ambos subtipos estudiados, y el ABT-594 presentó muy baja afinidad para otros receptores, incluyendo otros receptores activados por ligando como receptores opiáceos y muscarínicos (Holladay *et al.*, 1998).

La especificidad del ABT-594 en relación con los receptores nicotínicos, parece ser la causa de sus escasos efectos tóxicos, (Donnelly-Roberts *et al.*, 1998), y ha permitido realizar interesantes trabajos como el de Xin y colaboradores (Xin *et al.*, 2005) que, utilizando esta molécula como testigo, han diseñado un nuevo ensayo para identificar los moduladores de la subunidad $\alpha 4\beta 2$ del receptor nicotínico de la acetilcolina. En cambio, estudios realizados en ratas, suministrando dosis de ABT-594 de 0,2 mg/kg/día s.c. (Boyce *et al.*, 2000), ofrecen evidencias de la presencia de un síndrome de abstinencia similar al inducido por la nicotina.

La capacidad antinociceptiva del ABT-594 se presenta como igual en eficacia y mayor en potencia que la de la morfina². El ABT-594, tras los resultados positivos de las

2

Tradicionalmente, la eficacia de un fármaco (término introducido por Stephenson en 1956), describe la forma en la cual los agonistas varían en la respuesta que producen cuando ocupan el mismo número de receptores. Agonistas de alta eficacia pueden producir su respuesta máxima

pruebas en animales, entró en la fase II de evaluación clínica³ (Decker *et al.*, 2001). Tras una etapa en que se esperaban los resultados del compuesto en fase II sin que se hicieran públicos (Buccafusco, 2004), literatura actual indica que se han abandonado los trabajos farmacológicos con el ABT-594 (Arneric *et al.*, 2007).

La síntesis de isómeros posicionales del ABT-594 (Chuan-Xin *et al.*, 2006) y la experimentación llevada a efecto con los mismos en comparación con la molécula de nicotina, permite observar en estos compuestos un comportamiento antinociceptivo similar al del ABT-594.

En la misma línea, de búsqueda de analgésicos estructuralmente análogos a la epibatidina, pero con mejor perfil antinociceptivo, se produjo la síntesis del compuesto DBO-83. El DBO-83 (3-[6-Cl-piridazina-3-yl]-diabicyclo[3.2.1]octano), estudiado *in vivo* (Ghelardini *et al.*, 1997), presenta una importante acción antinociceptiva en tests con ratones y ratas (10-20 mg/kg i.p.). Tras la comparación de la curva de dosis-respuesta de este compuesto con otros conocidos analgésicos, se pudo comprobar como la eficacia del DBO-83 era superior a la de los analgésicos comparados, sin importantes efectos secundarios. En el citado trabajo (Ghelardini *et al.*, 1997), se postula que el

mientras ocupan una proporción de receptores relativamente baja. Así, un antagonista puro se define como el que tiene eficacia cero.

La potencia es una medida de la concentración de un fármaco a la cual es efectivo. Se trata de un término muy vago, que se ha tratado de definir a través de valores numéricos. Para los agonistas, se utilizan EC₅₀, IC₅₀, KA o pD₂, mientras que para los antagonistas se utilizan pA₂, KB o pKB. En todo caso, es importante resaltar que la potencia de un agonista no da una información sobre su afinidad por el receptor, ya que la respuesta farmacológica raramente mantiene una proporcionalidad directa con la ocupación del receptor.

3

El protocolo de evaluación de un fármaco para su uso comercial, se divide en tres fases:

* Fase I es una etapa en la que participan un reducido grupo de voluntarios (entre 20 y 100 normalmente). En esta etapa, se trata de determinar la seguridad del fármaco y su actuación en el cuerpo humano, cómo es absorbido, metabolizado y excretado. En fase I se trata de determinar los efectos secundarios que se pueden producir, y su variación con las distintas dosis que se administran.

* En fase II se comprueba la eficacia del fármaco, e implica varios centenares de pacientes. Los estudios de fase II son aleatorios. Un grupo de pacientes recibe el fármaco experimental, mientras un segundo grupo de control recibe un placebo. A menudo en estos estudios los pacientes no saben quienes reciben el fármaco y quienes no. Se consigue de este modo evaluar la seguridad y eficacia del fármaco. Este trabajo se realiza durante meses.

* En los estudios de fase III, el fármaco se comprueba con varios millares de pacientes. Este test a gran escala proporciona a la compañía farmacéutica una alta comprensión de la efectividad del fármaco, sus beneficios y el intervalo de las posibles reacciones adversas. Este estudio se realiza durante varios años, y se trata de pruebas aleatorias, y generalmente, los pacientes no conocen quienes reciben el fármaco y quienes un placebo.

compuesto DBO-83 ejerce una acción antinociceptiva mediante la activación del receptor nicotínico. No obstante, también se indica la baja actividad del compuesto para los nAChRs de las conexiones neuromusculares.

El compuesto DBO-83, en estudios recientes (Bunnelle y Decker, 2003; Decker *et al.*, 2004), presenta una elevada afinidad ($K_i = 4.3 \text{ nM}$) para el subtipo $\alpha 4\beta 2$ del nAChR. Los ensayos realizados *in vivo* indican que el DBO-83 puede ser bloqueado por el antagonista del nAChR mecamilamina, mientras que no lo es por la muscarina o los antagonistas de los receptores opiáceos o GABA_B. El DBO-83, aunque estructuralmente relacionado con la epibatidina, es 1000 veces menos potente, si bien presenta menos efectos secundarios para dosis antinociceptivas (Decker *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, no altera la actividad locomotriz espontánea ni la coordinación motora. Debido al buen comportamiento del compuesto en los experimentos citados, actualmente se encuentra en fase II de evaluación clínica (Arneric *et al.*, 2007).

Investigaciones realizadas sobre el DBO-83 desde el punto de vista estructural y conformacional (Barlocco *et al.*, 1998) comparado con la epibatidina, ofrecen como resultado la mayor flexibilidad de la molécula de DBO-83. La presencia en este compuesto de un anillo de piperazina, el cual puede asumir dos conformaciones, silla y bote, así como el hecho de que el grupo arilo está unido al sistema bicíclico a través de un átomo de nitrógeno en lugar de un átomo de carbono como en el caso de la epibatidina, justifican este comportamiento. Dichos estudios teóricos (Barlocco *et al.*, 1998), ofrecen como resultado la presencia de dos estructuras activas en la molécula DBO-83, la silla y la bote, aunque a causa del proceso de cálculo seguido no se puede afirmar con exactitud cuál es la conformación más estable de cara a justificar la actividad farmacológica del compuesto.

La sustitución del cloro en la epibatidina por otros halógenos o un átomo de hidrógeno, proporciona compuestos de propiedades biológicas muy semejantes a las del compuesto de partida, mientras que la sustitución del grupo donante de electrones, provoca una elevada pérdida de afinidad (Carroll, 2004).

Los últimos trabajos realizados con éstos analgésicos, sugieren en todo caso que los efectos antinociceptivos de los agonistas de nAChRs implican sistemas múltiples y muy complejos, cuyo mecanismo completo de acción está aún sin elucidar (Meyer, 2006). Los esfuerzos que se están realizando para identificar las características

estructurales de los ligandos que les confiere la selectividad sobre los subtipos, no dejan de aportar avances en el desarrollo de nuevos compuestos con mejor acción terapéutica (Bunnelle *et al.*, 2004; Glennon, 2004).

Una de las más apasionantes observaciones relativas al mecanismo de antinocicepción de los fármacos que implican los nAChRs, es la intervención de la estructura genética de los individuos, incluso del sexo, en cuanto a la duración de la acción analgésica del fármaco. Esta característica, podría ayudar a diseñar estrategias que permitirían alargar la vida media de la acción analgésica de un fármaco (Flores, 2000).

3.3.5.- Farmacoforo y sitio receptor.

Uno de los resultados conseguidos en el trabajo con los distintos agonistas de la nicotina, es el de una propuesta para el farmacoforo y para el sitio receptor nicotínico. En concreto, el primer modelo de farmacoforo se formuló en 1970, por Beers y Reich (Beers y Reich, 1970). Estos autores postularon que los ligandos nicotínicos forman un enlace de hidrógeno con el receptor y que estos agentes poseen un átomo aceptor de enlace de hidrógeno (nitrógeno u oxígeno), y un centro de carga. Se ha llegado a establecer que el átomo de nitrógeno de la nicotina está situado alrededor de 5.9 Å desde el centro de la superficie de van der Waals del aceptor de enlace de hidrógeno, siendo esta característica común a varios agonistas y antagonistas de la nicotina, como la acetilcolina, citisina, estricnina, β -eritroidina y trimetapan (Glennon *et al.*, 1994).

Más recientemente, Sheridan y colaboradores (Sheridan *et al.*, 1986), extendieron este farmacoforo a un modelo tridimensional y definieron las dimensiones moleculares usando una aproximación de distancias geométricas. En su modelo, establecieron que las características más importantes eran:

- a) Un centro catiónico (e.g., una amina cuaternaria o protonada tal como el átomo de nitrógeno pirrolidínico de la nicotina).
- b) Un átomo o centro electronegativo que puede actuar como aceptor de enlace de hidrógeno (e.g. el átomo de nitrógeno piridínico de la nicotina).
- c) Un tercer átomo en línea con el centro electronegativo definiendo la dirección

del momento dipolar local alineado con el enlace de hidrógeno que se puede formar.

d) Un punto al que denominaron punto receptor, que se corresponde con la distancia de 5.9 Å definida por Beers y Reich, y que únicamente cumple la función de mostrar consistencia entre los dos modelos.

Los estudios llevados a cabo en 2004 por Nicolotti y colaboradores (Nicolotti *et al.*, 2004) aplicando a trescientos analgésicos nicotínicos cálculos teóricos tridimensionales y con software basado en algoritmos genéticos, parecen corroborar estos postulados. El modelo clásico de farmacoforo (Beers y Reich, 1970), ha servido de punto de partida para el desarrollo de modernos modelos vectoriales (Glennon y Dukat, 2004) que ofrecen nuevas perspectivas para establecer las estructuras que justifican la selectividad de los agonistas nicotínicos por el subtipo $\alpha 4\beta 2$ de los receptores nicotínicos. Otros trabajos (Glennon *et al.*, 1994), establecen una importante relación, de tipo parabólico, entre la distancia internitrógeno y la afinidad, presentando un máximo para la distancia internitrógeno de la epibatidina, 5.51 Å.

Los estudios de Schapira y colaboradores (Schapira *et al.*, 2002), presentan una interesante propuesta para el enlazamiento de la nicotina, teniendo en cuenta los enlaces de hidrógeno, incluidos los que se generan con las moléculas de agua.

Posteriormente Celie y colaboradores (Celie *et al.*, 2004), postulan que, además de los contactos hidrofóbicos y aromáticos de la molécula de nicotina con el sitio receptor, existen dos enlaces de hidrógeno que contribuyen de manera significativa al enlace de la nicotina. El primer puente de hidrógeno se encuentra entre el nitrógeno piridínico y algunos residuos de la cadena principal de la proteína, estableciéndose a través de una molécula de agua puente. Utilizando este concepto, se sugiere que, si bien se ha establecido con anterioridad (Abreo *et al.*, 1996; Glennon y Dukat, 2004), que la distancia internitrogeno en la molécula ligando debe estar comprendida entre los valores de 4,6 y 6,3 Å, algunos ligandos con distancias N-N superiores podrían entrar en contacto directo con la cadena principal de la proteína posicionando su segundo nitrógeno en el lugar de la molécula de agua. El segundo puente de hidrógeno se establece entre el nitrógeno pirrolidínico y el grupo carbonilo de un residuo de Triptófano. Este grupo carbonilo es especialmente importante para el contacto del grupo del ligando

cargado positivamente.

Las técnicas computacionales, aplicadas al estudio de distintos conformeros de una serie de agonistas nicotínicos (Lee, 2003), aportan nuevos detalles sobre la topología del sitio receptor. Estudios de modelización molecular realizados con varios compuestos análogos a la epibatidina (Wei *et al.*, 2003), sugieren que la distribución espacial de los átomos de los ligandos alrededor de los elementos del farmacoforo, puede controlar la selectividad sobre los subtipos del receptor. Los cálculos realizados con diversos programas de simulación (Huang *et al.*, 2005), permitieron predecir las energías libres de enlace por puente de hidrógeno o las interacciones π - catiónicas que pueden existir entre el ligando y el sitio receptor (Cashin *et al.*, 2005; Bisson *et al.*, 2005). Estos resultados pueden ser de especial interés en la creación de nuevas especies de analgésicos nicotínicos.

En todo caso, los modelos planteados hasta la fecha, no son muy útiles para la predicción de interacciones de nuevos ligandos, puesto que ninguno explica la reordenación observada en la proteína (Celie *et al.*, 2004).

En cuanto al sitio de enlace, del que se puede afirmar que reside en la parte extracelular del receptor, sólo se han encontrado residuos aromáticos electronegativos, lo que puede justificar la acción sobre el grupo amonio cuaternario de la acetilcolina. Otros trabajos presentan una corona de residuos aromáticos rodeada por residuos negativos, sugiriendo que pueden existir interacciones electrostáticas de larga distancia. En todo caso, sólo se pueden hacer dos afirmaciones concretas: a) no todos los agentes se enlazan de la misma manera a los receptores nicotínicos, y b) los agentes que se enlazan en una manera similar, presentan los sustituyentes amino orientados en distintas direcciones.

3.3.6.- Problemas pendientes.

Aun cuando hay un importante camino recorrido en el establecimiento del mecanismo de acción de los agonistas de la nicotina frente a los receptores nAChRs, quedan muchos puntos oscuros. Así, por ejemplo, se puede afirmar que los efectos de los nAChRs no están producidos por el mismo mecanismo en todos los estados de dolor. De hecho, la mayor parte de los estudios de la acción antinociceptiva de los nAChRs se

han realizado con modelos de dolor agudo térmico, y prácticamente no existen datos en otros modelos de dolor, como por ejemplo en dolor patológico. En cuanto a la investigación de la implicación de los distintos subtipos del receptor en los mecanismos de acción del mismo, está todavía en sus comienzos, y los conocimientos son por lo tanto muy incompletos (Decker *et al.*, 2001).

Por otro lado, hasta la fecha, el farmacoforo nicotínico no está estructural y electrónicamente plenamente caracterizado. En la actualidad las causas electrónicas y estructurales de la mayor o menor afinidad de un agonista nicotínico sobre el nAChR del sistema nervioso central son desconocidas. También se ha trabajado extensamente en la elucidación de la estructura tridimensional del nAChR (Unwin, 2005), sin que la naturaleza tanto estructural y electrónica del sitio activo como la de las interacciones específicas que dan lugar al complejo con los analgésicos nicotínicos esté claramente determinada. Tampoco se dispone de un modelo microscópico que racionalice y explique la actividad antinociceptiva ejercida por una concentración dada de un analgésico nicotínico en medio fisiológico.

Algunos autores (Gündisch, 2005) avanzan la posibilidad de que algunos subtipos del sitio receptor, aún desconocidos, expliquen la falta de correlación entre la potencia para la activación del receptor y la afinidad de enlace para los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ que presentan algunos agonistas nicotínicos.

Este trabajo avanza en la caracterización estructural del farmacoforo de los agonistas nicotínicos de la acetilcolina, mediante el estudio individual y comparativo de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 en sus dos conformaciones, silla y bote, y nicotina. A este fin, se aplican también técnicas de mecánica molecular, para comparar los resultados del acoplamiento molecular de las distintas especies con la subunidad $\alpha 4\beta 2$ del receptor nicotínico.

Capítulo IV

Metodología

El presente trabajo aborda el estudio de los analgésicos nicotínicos: nicotina, ABT-594, epibatidina, DBO-83 en su forma bote (en adelante se identificará como DBO-83 (B)) y DBO-83 en su forma silla (DBO-83 (S)). El análisis de los mismos se realizará con las formas protonadas (activas) de todos los compuestos, y tratando los sistemas en vacío y en disolución.

En este trabajo se van a realizar:

- a) Cálculos de Energía.
- b) Cálculos de población.
- c) Cálculos de semejanza.
- d) Estudios de *molecular docking*.

A tal efecto se ha comenzado por realizar:

- a) Análisis conformacional de los compuestos.
- b) Análisis poblacional.

Además, para estudiar las analogías entre los distintos compuestos, se han utilizado las propiedades:

- a) Distancia internitrógeno.
- b) Índices de semejanza.

El estudio conformacional de las moléculas (protonadas) ABT-594, nicotina, epibatidina y DBO-83, este último en sus dos conformaciones silla y bote, se ha abordado utilizando metodología ab-initio, realizando el tratamiento de energía de correlación con *B3LYP*, usando la base *correlation consistent polarized double Z, cc-pVDZ* (Dunning, 1989).

La elección del nivel *B3LYP* es la consecuencia de un estudio previo sobre las moléculas nicotina, acetilcolina y ABT-594 (Mora *et al.*, 2005), en el que se estableció la razonable equivalencia de los datos obtenidos a nivel *MP2* y *B3LYP*.

Se ha realizado el estudio conformacional considerando tanto las moléculas en vacío como en disolución acuosa (constante dieléctrica $\epsilon = 78,39$). El efecto del disolvente se ha descrito utilizando el modelo *PCM* (Cossi *et al.*, 1996; Barone *et al.*, 1997) que utiliza como cavidad la superficie de van der Waals.

Todos los cálculos de estructura electrónica se han efectuado utilizando los paquetes *Gaussian 98* (Frisch *et al.*, 1998) y *Gaussian 03* (Frisch *et al.*, 2003). El estudio se ha realizado sobre las formas protonadas de las moléculas, que son las formas farmacológicamente activas. Los cálculos de semejanza entre conformeros, se han realizado utilizando el paquete *Hex* (Ritchie, 2003). El estudio de *molecular docking* de acoplamiento de las moléculas en estudio con el sitio receptor, se ha realizado con la suite *AutoDock* (AutoDock, 2006).

Para el estudio de las poblaciones se ha diseñado una nueva metodología que utiliza una función de partición que incluye el efecto de la interacción rotovibracional y de la energía cinética conformacional.

4.1.- Definición de geometrías, ángulos diedros y Matriz Z.

En la Figura 1 se refleja la estructura de la forma protonada de la molécula de ABT-594, así como la convención numérica adoptada en la identificación de los átomos. Para llevar a cabo el análisis conformacional, se han definido los dos ángulos diedros identificados como θ_1 y θ_2 (ver Figura 1). θ_1 mide la torsión del grupo *acetidinilmetoxi* y θ_2 la rotación del grupo *acetidinil*. Utilizando la convención numérica de la Figura 1, los

ángulos θ_1 y θ_2 corresponden a los diedros C13C12O11C5 y N14C13C12O11, respectivamente. Para los ángulos θ_1 y θ_2 el sentido positivo de la rotación es el de las agujas del reloj, con el átomo C5 (o el O11) colocado hacia el observador y mirando hacia el eje O11-C12 (o C12-C13). En la Tabla 1, se representa la definición de la matriz Z usada para la molécula de ABT-594. La hipersuperficie de energía potencial se ha construido a partir de una malla de puntos en θ_1 y θ_2 . Para obtener dicha malla, se ha considerado un intervalo de valores en ambos ángulos desde 0° hasta 360° con incrementos de 60° .

La Figura 2 presenta la estructura de la forma protonada de la molécula epibatidina, así como la convención numérica adoptada en la identificación de los átomos. El análisis conformacional se ha realizado definiendo el ángulo diedro θ (ver Figura 2), el cual mide la rotación del grupo *azabicyclo heptano*. Utilizando la convención numérica de la Figura 2, el ángulo θ corresponde al diedro C4C5C11C12. Para el ángulo θ , el sentido positivo de la rotación es el de las agujas del reloj, con el átomo C5 colocado hacia el observador y mirando hacia el eje C11-C12.

La matriz Z usada para la molécula de epibatidina, está definida en la Tabla 2. La hipersuperficie de energía potencial se ha construido a partir de una malla de puntos en θ , considerando un intervalo de valores desde 0° hasta 360° con incrementos de 30° .

La estructura de la forma protonada de la molécula DBO-83 en la conformación de bote, así como la convención numérica adoptada en la identificación de los átomos se recogen en la Figura 3. El ángulo diedro identificado como θ (ver Figura 3), el cual mide la rotación del grupo *diazabicyclooctano*, se ha utilizado para realizar el análisis conformacional. Utilizando la convención numérica de la Figura 3, el ángulo θ corresponde al diedro C4C5N10C11. Para el ángulo θ , el sentido positivo de la rotación es el de las agujas del reloj, con el átomo C5 colocado hacia el observador y mirando hacia el eje N10-C11. La Tabla 3 contiene la matriz Z usada para la molécula de DBO-83 (B). La hipersuperficie de energía potencial se ha construido a partir de una malla de puntos en θ , considerando un intervalo de valores desde 0° hasta 360° con incrementos de 30° .

En la Figura 4 se presenta la estructura de la forma protonada de la molécula de DBO-83 en la conformación de silla, así como la convención numérica adoptada en la identificación de los átomos. El análisis conformacional se ha realizado definiendo el

ángulo diedro θ (ver Figura 4), el cual mide la rotación del grupo *diazabicyclooctano*. Utilizando la convención numérica de la Figura 4, el ángulo θ corresponde al diedro C4C5N10C11. Para el ángulo θ , el sentido positivo de la rotación es el de las agujas del reloj, con el átomo C5 colocado hacia el observador y mirando hacia el eje N10-C11. Se ha definido la matriz Z usada para la molécula de DBO-83 (S) como se representa en la Tabla 4. La hipersuperficie de energía potencial se ha construido a partir de una malla de puntos en θ , considerando un intervalo de valores desde 0° hasta 360° con incrementos de 30° .

La estructura de la forma protonada de la molécula de nicotina, así como la convención numérica adoptada en la identificación de los átomos de la misma, están reflejados en la Figura 5. El ángulo diedro definido como θ (ver Figura 5), el cual mide la rotación del grupo *pirrólico*, se ha utilizado para realizar el análisis conformacional. Siguiendo la convención numérica de la Figura 5, el ángulo θ corresponde al diedro C4C5C11C15. Para el ángulo θ el sentido positivo de la rotación es el de las agujas del reloj, con el átomo C5 colocado hacia el observador y mirando hacia el eje C11-C15. Para los cálculos de optimización de la molécula de nicotina, se ha definido la matriz Z como se indica en Tabla 5. La hipersuperficie de energía potencial se ha construido a partir de una malla de puntos en θ , considerando un intervalo de valores desde 0° hasta 360° con incrementos de 30° .

Para todas las moléculas, tanto en vacío como en disolución se han optimizado completamente todos los puntos de la malla. Los mínimos locales se han identificado optimizando totalmente las estructuras más próximas previamente determinadas.

Figura 1. Estructura y convención numérica de la molécula de ABT-594 protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Rojo: Oxígeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno.

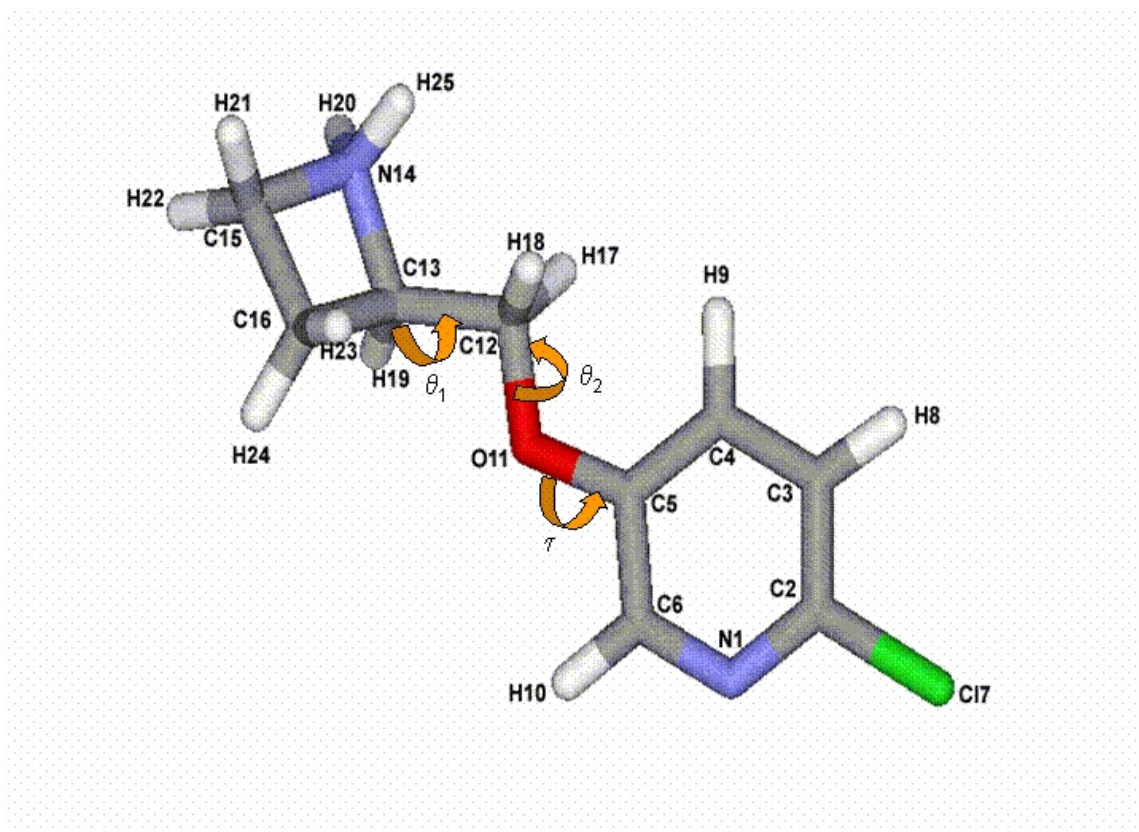


Tabla 1. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de ABT-594 utilizada en el presente estudio.

1	n						
2	c	1	cn2				
3	c	2	cc3	1	ccn3		
4	c	3	cc4	2	ccc4	1	dih4
5	c	4	cc5	3	ccc5	2	dih5
6	c	1	cn6	2	cnc6	3	dih6
7	cl	2	clc7	1	clcn7	6	dih7
8	h	3	hc8	2	hcc8	1	dih8
9	h	4	hc9	3	hcc9	2	dih9
10	h	6	hc10	1	hcn10	2	dih10
11	o	5	oc11	4	occ11	3	dih11
12	c	11	co12	5	coc12	4	dih12
13	c	12	cc13	11	cco13	5	dih13
14	n	13	nc14	12	ncc14	11	dih14
15	c	14	cn15	13	cnc15	12	dih15
16	c	15	cc16	14	ccn16	13	dih16
17	h	12	hc17	13	hcc17	11	dih17
18	h	12	hc18	13	hcc18	17	dih18
19	h	13	hc19	14	hcn19	15	dih19
20	h	14	hn20	15	hnc20	16	dih20
21	h	15	hc21	14	hcn21	13	dih21
22	h	15	hc22	14	hcn22	21	dih22
23	h	16	hc23	15	hcc23	14	dih23
24	h	16	hc24	15	hcc24	23	dih24
25	h	14	hn25	15	hnc25	20	dih25

Figura 2. Estructura y convención numérica de la molécula de epibatidina protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno.

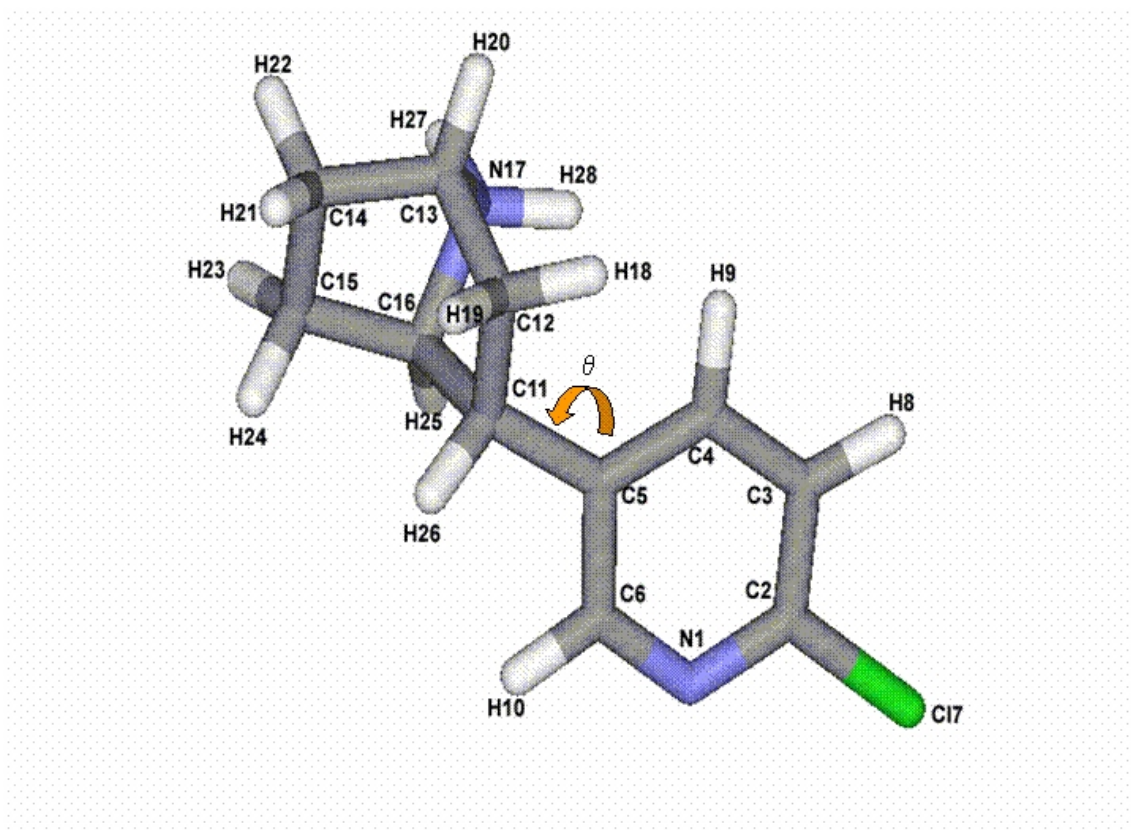


Tabla 2. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de epibatidina utilizada en el presente estudio.

1	n						
2	c	1	cn2				
3	c	2	cc3	1	ccn3		
4	c	3	cc4	2	ccc4	1	dih4
5	c	4	cc5	3	ccc5	2	dih5
6	c	5	cc6	4	ccc6	3	dih6
7	cl	2	clc7	3	clcc7	4	dih7
8	h	3	hc8	4	hcc8	5	dih8
9	h	4	hc9	5	hcc9	6	dih9
10	h	6	hc10	5	hcc10	4	dih10
11	c	5	cc11	4	ccc11	3	dih11
12	c	11	cc12	5	ccc12	4	dih12
13	c	12	cc13	11	ccc13	5	dih13
14	c	13	cc14	12	ccc14	11	dih14
15	c	14	cc15	13	ccc15	12	dih15
16	c	15	cc16	14	ccc16	13	dih16
17	n	16	nc17	15	ncc17	14	dih17
18	h	12	hc18	11	hcc18	16	dih18
19	h	12	hc19	11	hcc19	16	dih19
20	h	13	hc20	14	hcc20	15	dih20
21	h	14	hc21	15	hcc21	16	dih21
22	h	14	hc22	15	hcc22	16	dih22
23	h	15	hc23	14	hcc23	13	dih23
24	h	15	hc24	14	hcc24	13	dih24
25	h	16	hc25	15	hcc25	14	dih25
26	h	11	hc26	16	hcc26	15	dih26
27	h	17	hn27	16	hnc27	15	dih27
28	h	17	hn28	16	hnc28	27	dih28

Figura 3. Estructura y convención numérica de la molécula de DBO-83 (B) protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno.

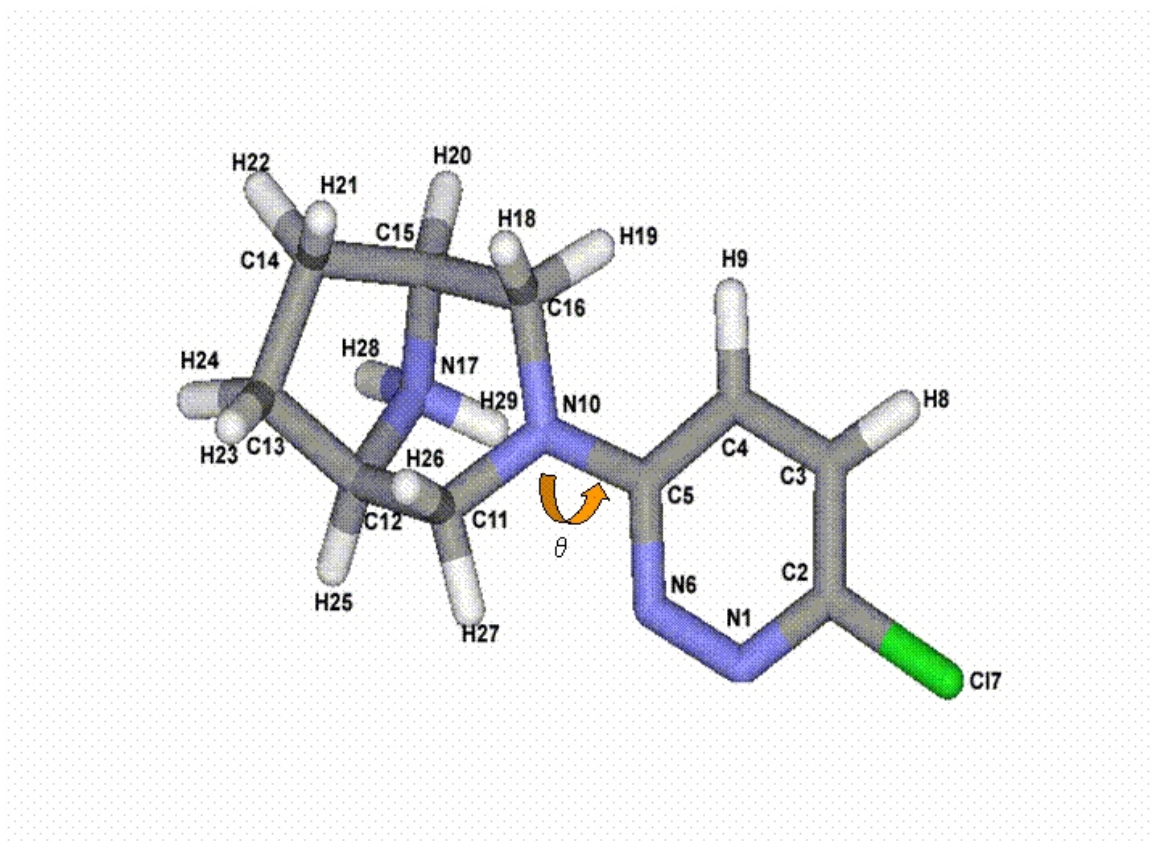


Tabla 3. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de DBO-83 (B) utilizada en el presente estudio.

1	n						
2	c	1	cn2				
3	c	2	cc3	1	ccn3		
4	c	3	cc4	2	ccc4	1	dih4
5	c	4	cc5	3	ccc5	2	dih5
6	n	1	nn6	2	nnc6	3	dih6
7	cl	2	clc7	1	clcn7	6	dih7
8	h	3	hc8	2	hcc8	1	dih8
9	h	4	hc9	3	hcc9	2	dih9
10	n	5	nc10	4	ncc10	3	dih10
11	c	10	cn11	5	cnc11	4	dih11
12	c	11	cc12	10	ccn12	5	dih12
13	c	12	cc13	11	ccc13	10	dih13
14	c	13	cc14	12	ccc14	11	dih14
15	c	14	cc15	13	ccc15	12	dih15
16	c	10	cn16	11	cnc16	15	dih16
17	n	12	nc17	13	ncc17	14	dih17
18	h	16	hc18	15	hcc18	14	dih18
19	h	16	hc19	15	hcc19	18	dih19
20	h	15	hc20	17	hcn20	12	dih20
21	h	14	hc21	13	hcc21	12	dih21
22	h	14	hc22	13	hcc22	21	dih22
23	h	13	hc23	12	hcc23	11	dih23
24	h	13	hc24	12	hcc24	23	dih24
25	h	12	hc25	17	hcn25	20	dih25
26	h	11	hc26	12	hcc26	13	dih26
27	h	11	hc27	12	hcc27	26	dih27
28	h	17	hn28	12	hnc28	15	dih28
29	h	17	hn29	12	hnc29	28	dih29

Figura 4. Estructura y convención numérica de la molécula de DBO-83 (S) protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno.

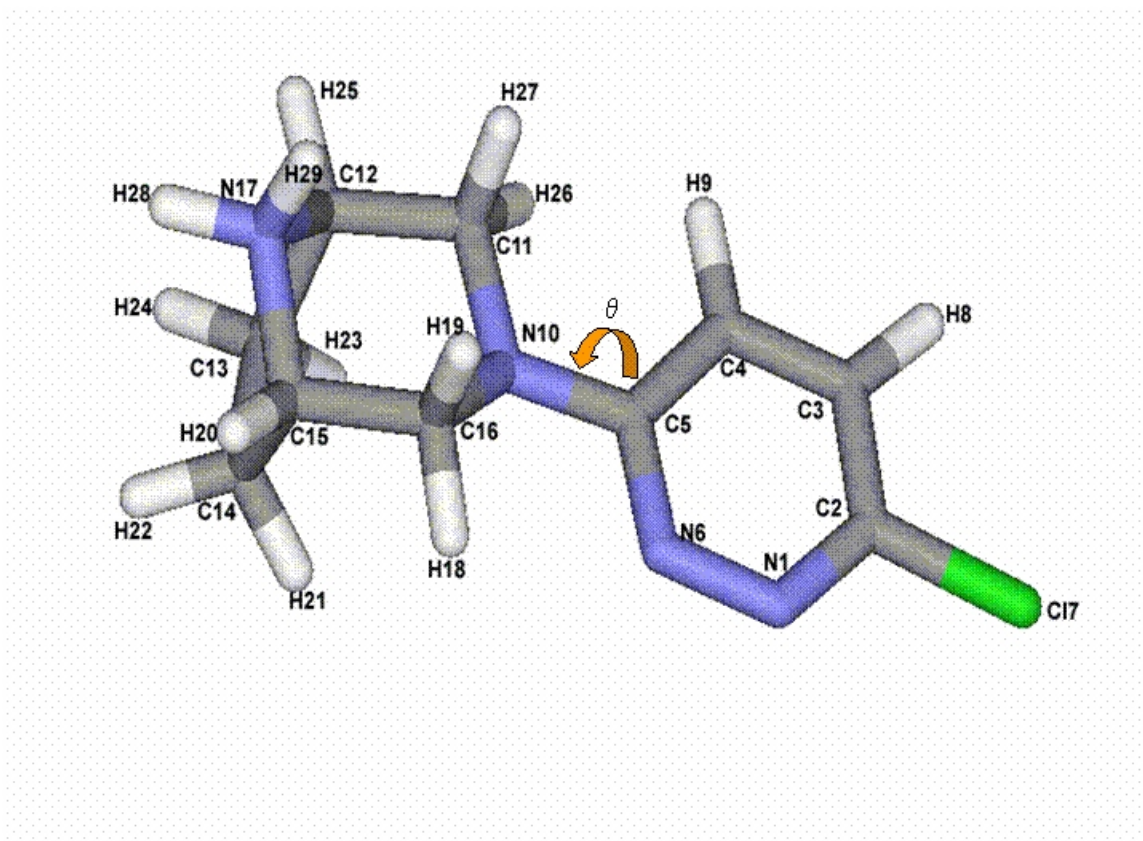


Tabla 4. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de DBO-83 (S) utilizada en el presente estudio.

1	n						
2	c	1	cn2				
3	c	2	cc3	1	ccn3		
4	c	3	cc4	2	ccc4	1	dih4
5	c	4	cc5	3	ccc5	2	dih5
6	n	1	nn6	2	nnc6	3	dih6
7	cl	2	clc7	1	clcn7	6	dih7
8	h	3	hc8	2	hcc8	1	dih8
9	h	4	hc9	3	hcc9	2	dih9
10	n	5	nc10	4	ncc10	3	dih10
11	c	10	cn11	5	cnc11	4	dih11
12	c	11	cc12	10	ccn12	5	dih12
13	c	12	cc13	11	ccc13	10	dih13
14	c	13	cc14	12	ccc14	11	dih14
15	c	14	cc15	13	ccc15	12	dih15
16	c	10	cn16	11	cnc16	15	dih16
17	n	12	nc17	13	ncc17	14	dih17
18	h	16	hc18	15	hcc18	14	dih18
19	h	16	hc19	15	hcc19	18	dih19
20	h	15	hc20	17	hcn20	12	dih20
21	h	14	hc21	13	hcc21	12	dih21
22	h	14	hc22	13	hcc22	21	dih22
23	h	13	hc23	12	hcc23	11	dih23
24	h	13	hc24	12	hcc24	23	dih24
25	h	12	hc25	17	hcn25	20	dih25
26	h	11	hc26	12	hcc26	13	dih26
27	h	11	hc27	12	hcc27	26	dih27
28	h	17	hn28	12	hnc28	15	dih28
29	h	17	hn29	12	hnc29	28	dih29

Figura 5. Estructura y convención numérica de la molécula de nicotina protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno.

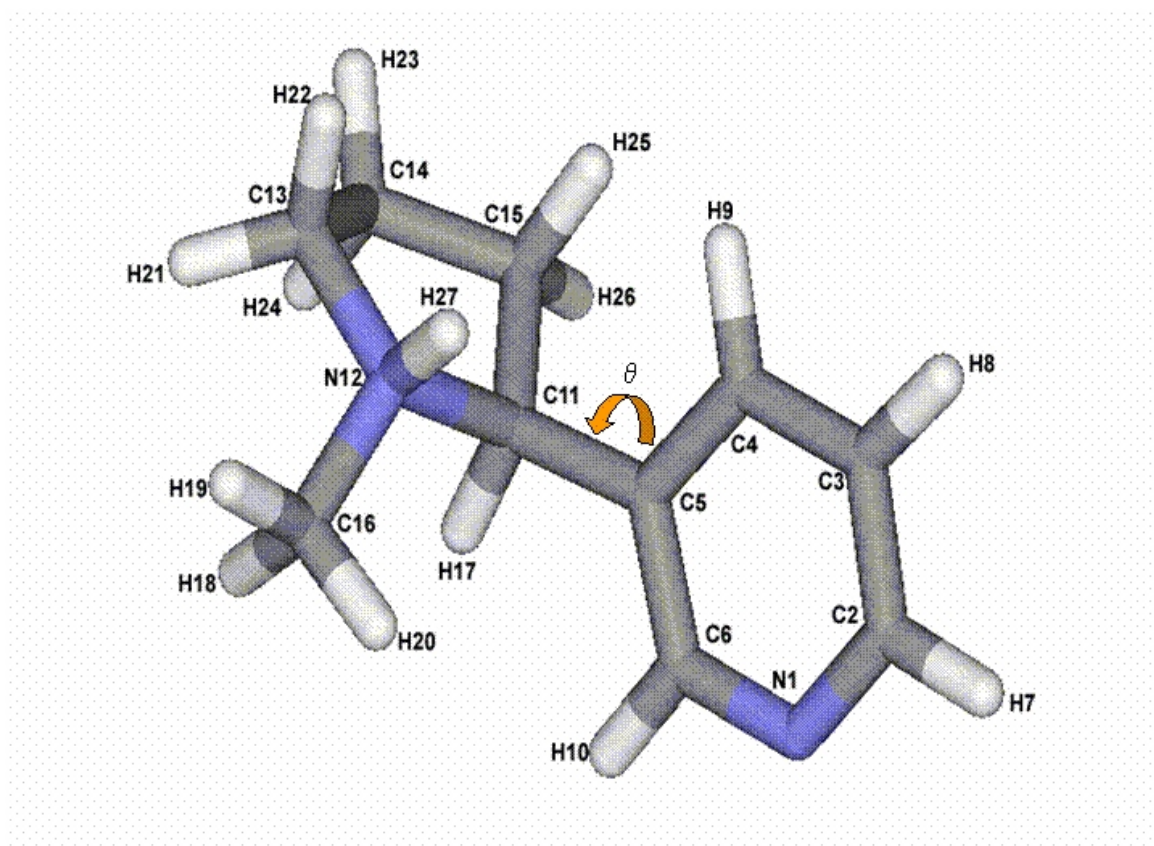


Tabla 5. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de nicotina utilizada en el presente estudio.

1	n						
2	c	1	cn2				
3	c	2	cc3	1	ccn3		
4	c	3	cc4	2	ccc4	1	dih4
5	c	4	cc5	3	ccc5	2	dih5
6	c	1	cn6	2	cnc6	3	dih6
7	h	2	hc7	1	hcn7	6	dih7
8	h	3	hc8	2	hcc8	1	dih8
9	h	4	hc9	3	hcc9	2	dih9
10	h	6	hc10	1	hcn10	2	dih10
11	c	5	cc11	4	ccc11	3	dih11
12	n	11	nc12	5	ncc12	4	dih12
13	c	12	cn13	11	cnc13	5	dih13
14	c	13	cc14	12	ccn14	11	dih14
15	c	14	cc15	13	ccc15	12	dih15
16	c	12	cn16	13	cnc16	14	dih16
17	h	11	hc17	15	hcc17	14	dih17
18	h	16	hc18	12	hcn18	11	dih18
19	h	16	hc19	12	hcn19	18	dih19
20	h	16	hc20	12	hcn20	18	dih20
21	h	13	hc21	12	hcn21	11	dih21
22	h	13	hc22	12	hcn22	21	dih22
23	h	14	hc23	13	hcc23	12	dih23
24	h	14	hc24	13	hcc24	23	dih24
25	h	15	hc25	14	hcc25	13	dih25
26	h	15	hc26	14	hcc26	25	dih26
27	h	12	hn27	13	hnc27	16	dih27

4.2.- Desarrollo de la función de partición rotovibracional.

El problema de la construcción de un modelo molecular menos aproximado para los movimientos conformacionales se puede abordar desde el punto de vista de un estudio teórico de vibraciones de gran amplitud, que son las responsables de la flexibilidad conformacional. El ejemplo clásico de tales vibraciones es el *movimiento torsional* (rotación interna) de grupos metilos. Estos estudios empiezan por resolver la ecuación vibracional de Schrödinger para la parte anarmónica, que corresponde a variaciones de gran amplitud de coordenadas internas (Pickett, 1972; Niño y Muñoz-Caro, 1995a).

Hoy en día se utiliza metodología *ab-initio*, y la energía potencial para el movimiento considerado se obtiene por relajación total de la geometría molecular para valores fijos de las coordenadas de gran amplitud (conformacionales) (Ozkabak y Goodman, 1992; Smeyers *et al.*, 1993; Niño *et al.*, 1998). Los términos de energía cinética se obtienen de los elementos de la matriz **G** rotovibracional (Niño y Muñoz-Caro, 1994b), considerando la rotación total y las coordenadas conformacionales. Estos términos cinéticos se derivan de las estructuras moleculares relajadas (Ozkabak y Goodman, 1992; Niño *et al.*, 1998). De esta forma se calculan los niveles de energía vibracional. Los resultados muestran que los niveles de energía vibracional teóricos difieren en pocos cm^{-1} de los niveles experimentalmente observados (Smeyers *et al.*, 1993; Niño *et al.*, 1994a; Niño *et al.*, 1995b). Estos estudios indican que el efecto de la variación del acoplamiento rotovibracional y la energía cinética conformacional es relevante. Desde el punto de vista del potencial, los datos muestran que los potenciales obtenidos por relajación de las geometrías moleculares para valores fijos de las coordenadas conformacionales representan fielmente el potencial para el movimiento conformacional. Estos potenciales son formalmente muy parecidos, pero no idénticos, al potencial usado en el *modelo flexible clásico* para el cálculo de la función de partición (Gõ *et al.*, 1976). Además, la fiabilidad de los resultados depende significativamente de la calidad de la función de energía potencial (Niño *et al.*, 1995c).

En este trabajo, el tratamiento teórico de la función de partición para sistemas moleculares considera sistemas con el tamaño de los compuestos bioactivos comunes, donde la metodología *ab-initio* es aplicable. En este contexto y formando parte de este

trabajo, se desarrolla y propone una función de partición rotovibracional semiclásica para moléculas con varios grados de libertad conformacional, considerando la rotación total y las coordenadas conformacionales, con un potencial relajado completamente para coordenadas conformacionales fijas (Niño *et al.*, 2003). De este modo, el modelo incluye el efecto de la energía cinética conformacional y el acoplamiento rotovibracional. Dicho modelo se ha desarrollado de la manera siguiente:

Si se considera una molécula con m grados de libertad conformacional, usando coordenadas internas, la función de partición semiclásica para los movimientos rotovibracionales, z_{rv} , se obtiene como:

$$z_{rv} = h^{-(m+3)} \int_Q \int_P \exp [-H(P,Q)/kT] \prod_i^{m+3} dp_i dq_i \quad (108)$$

donde $H(P,Q)=T(P) + V(Q)$ es el hamiltoniano clásico definido en términos de pares conjugados de momentos, P , y coordenadas, Q , para la rotación total y los movimientos vibracionales. Para N átomos, la energía cinética, $T(P)$, se obtiene en términos de la velocidad como:

$$T(V) = \frac{1}{2} \sum_{\alpha}^N m_{\alpha} V_{\alpha} \cdot V_{\alpha} \quad (109)$$

donde

$$V_{\alpha} = V + (\omega \times r_{\alpha}) + \sum_{i=6}^{3N} \frac{\partial r_{\alpha}}{\partial q_i} \dot{q}_i \quad (110)$$

En la ecuación (110), V representa la velocidad del centro de masas, ω es la velocidad angular, r_{α} es el vector posición del átomo α y q_i son las coordenadas internas. Usando las coordenadas del centro de masas, notación matricial y derivando $T(V)$ con respecto a las velocidades, se obtiene la energía cinética en término de momentos:

$$T(P) = \frac{1}{2} P^T G P \quad (111)$$

donde P es la matriz columna de momentos, P^T su traspuesta y G es la matriz

rotovibracional definida como:

$$\mathbf{G} = \begin{bmatrix} \mathbf{I} & \mathbf{X} \\ \mathbf{X}^T & \mathbf{Y} \end{bmatrix}^{-1} \quad (112)$$

En la ec. (112) \mathbf{I} representa el tensor de inercia, es decir, la contribución de la rotación pura, \mathbf{Y} corresponde a la contribución de la vibración pura y \mathbf{X} es la interacción rotación-vibración (término de Coriolis). Los elementos de estas matrices se obtienen de la geometría molecular como:

$$\begin{aligned} I_{ij} &= -\sum_{\alpha}^n m_{\alpha} r_{\alpha i} r_{\alpha j} \\ I_{ii} &= \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} [(r_{\alpha})^2 - r_{\alpha i}^2] \\ X_{ij} &= \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} \left[\mathbf{r}_{\alpha} \times \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_i} \right]_j \\ Y_{ij} &= \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_i} \cdot \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_j} \end{aligned} \quad (113)$$

La ecuación (108) se define dentro del marco de la formulación hamiltoniana de la mecánica clásica. De esta manera, se debe trabajar con sistemas holonómicos, es decir, con sistemas donde las coordenadas generalizadas son independientes unas de otras. Sin embargo, usando la velocidad angular ω se tiene una restricción (ω constante) entre los componentes de la velocidad, pero no entre las coordenadas. Así, la constante no puede ser expresada como una relación entre las coordenadas en la forma $f(r_1, r_2, \dots, r_n) = 0$. Esta es otra manera de decir que las coordenadas son no-holonómicas. Por tanto, la ecuación (111) no puede ser introducida directamente en la ecuación (108). Para usar la ecuación (108) se debe comenzar con un conjunto holonómico de coordenadas rotacionales, por ejemplo, los ángulos de Euler (θ, ϕ, ψ). De esta forma la ecuación (108) queda como:

$$z_{rv} = h^{-(m+3)} \int_Q \int_P \exp[-T_E(P)/kT] \exp[-V(Q)/kT] dP_\theta d\theta dP_\phi d\phi dP_\psi d\psi \prod_{i=4}^{m+3} dp_i dq_i \quad (114)$$

donde T_E indica que la energía cinética está expresada en términos de ángulos de Euler. De esta manera, la ecuación (111) puede ser introducida en la ecuación (114) usando los ejes principales como ejes internos. En esta forma, es posible cambiar el diferencial de los momentos de Euler a un diferencial de momentos angulares usando el jacobiano de la transformación: $\sin(\theta)$. Integrando el Jacobiano y sustituyendo la ecuación (111) en la ecuación (114) se obtiene:

$$z_{rv} = 8\pi^2 h^{-(m+3)} \int_Q \int_P \exp[-\mathbf{P}^T \mathbf{G} \mathbf{P} / 2kT] \prod_{i=1}^{m+3} dp_i \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (115)$$

En la ecuación (115), la parte de energía cinética, es decir, la matriz \mathbf{G} , depende de las coordenadas y las coordenadas consideradas se reducen a coordenadas conformacionales.

El término de energía cinética se puede integrar reduciendo la matriz \mathbf{G} rotovibracional a una forma diagonal, \mathbf{D} , usando una transformación ortogonal,

$$\mathbf{D} = \mathbf{W}^T \mathbf{G} \mathbf{W} \quad (116)$$

donde \mathbf{W} es la matriz de transformación. La matriz \mathbf{D} representa la matriz de energía cinética en un sistema de coordenadas donde \mathbf{D} es diagonal. Así, el efecto de la matriz \mathbf{W} es efectuar una rotación de coordenadas desde el sistema de ejes principales. La matriz de transformación al nuevo sistema de momentos es \mathbf{W} . Dado que \mathbf{W} es ortogonal, su determinante (el jacobiano de la transformación) es unitario. Por tanto,

$$z_{rv} = 8\pi^2 h^{-(m+3)} \int_Q \prod_{i=1}^{m+3} \left[\int_P \exp[-d_{ii}/2kT] dp_i \right] \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (117)$$

donde d_{ii} son los elementos de la diagonal de la matriz \mathbf{D} . Como

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \exp(-ax^2) dx = (\pi/a)^{1/2} \quad (118)$$

se obtiene,

$$z_{rv} = 8\pi^2 \left(\frac{2\pi kT}{h^2} \right)^{(m+3)/2} \int_Q |G(Q)|^{-1/2} \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (119)$$

donde $|G(Q)|$ es el determinante de la matriz \mathbf{G} . La ecuación (119) recuerda a la función de partición rotovibracional semiclásica para el *modelo clásico rígido* de la referencia (Gö *et al.*, 1976). Sin embargo, aquí el acoplamiento rotovibracional está incluido en la matriz \mathbf{G} . El modelo es completamente flexible, ya que todas las coordenadas internas pueden variar cuando se obtiene el potencial.

De la ecuación (119), la población de un conformero definido por un intervalo ΔQ con valores límite de las m coordenadas conformacionales Q_1 y Q_2 es

$$p(\Delta Q) = \left[\int_{Q_1}^{Q_2} |G(Q)|^{-1/2} \exp[-V(Q)/kT] \prod_i^m dq_i \right] / z_{rv} \quad (120)$$

En este punto, es interesante analizar la naturaleza física del potencial usado en la ecuación (120) en relación al potencial usado en modelos moleculares previos (Gö *et al.*, 1976). Se considera el potencial en cualquiera de los puntos, a , donde las coordenadas no-conformacionales están completamente relajadas. Para una molécula de N átomos y m coordenadas conformacionales, expandiendo en serie de Taylor hasta segundo orden y considerando la condición de equilibrio respecto a las coordenadas no-conformacionales, se obtiene:

$$\begin{aligned}
V_a = V_a^0 + \sum_i^m \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_a \Delta q_i + \frac{1}{2} \sum_i^m \sum_j^m \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_a \Delta q_i \Delta q_j \\
+ \sum_i^m \sum_{j=m+1}^{3N-6} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_a \Delta q_i \Delta q_j + \frac{1}{2} \sum_{i=m+1}^{3N-6} \sum_{j=m+1}^{3N-6} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_a \Delta q_i \Delta q_j
\end{aligned} \tag{121}$$

La ecuación (121) muestra que, para una aproximación lineal, el potencial es exactamente una función de m coordenadas conformacionales. El segundo, tercero y cuarto término exhiben una dependencia directa de las coordenadas conformacionales. El cuarto y el quinto término involucran coordenadas internas no-conformacionales. En particular, el quinto término representa el efecto de las constantes de fuerza no-conformacionales. En la referencia (Gõ *et al.*, 1976), el “modelo flexible” asume que estas constantes de fuerza son independientes de las coordenadas conformacionales. De esta forma, salen del signo integral. Sin embargo, las constantes de fuerza dependen paramétricamente de las coordenadas conformacionales. Por tanto, deberían estar dentro de la integral. Usando un potencial relajado, como el que se define en este trabajo, se tiene en cuenta este efecto.

Para el cálculo de la matriz \mathbf{G} se ha utilizado la técnica descrita por (Niño y Muñoz-Caro, 1994b) aplicada a las geometrías relajadas obtenidas de cada punto de la malla. La integral en las ecuaciones (119) y (120) se calcula numéricamente. Para los casos unidimensionales se aplica una extrapolación de Rombert usando la regla trapezoidal (Press *et al.*, 1992). La integración numérica bidimensional del ABT-594 se realiza usando *splines* bicúbicos (Engeln-Müllges y Uhlig, 1996).

Las poblaciones se evalúan utilizando *software* desarrollado en este trabajo, que incorpora las rutinas numéricas proporcionadas por Engeln-Mülges y Uhlig (Engeln-Müllges y Uhlig, 1996). Este programa está desarrollado en lenguaje FORTRAN y corre bajo los sistemas operativos MS-DOS y UNIX.

Se ha realizado un estudio comparativo para contrastar la variación de resultados de población que se obtienen mediante el método propuesto y los usados con anterioridad, aplicándolo al tratamiento de la función de partición conformacional de los

compuestos bioactivos nicotina y ABT-594, incluyendo los efectos del acoplamiento rotovibracional y la energía cinética conformacional (Niño *et al.*, 2003). Los datos obtenidos en el tratamiento de la nicotina se comparan favorablemente con resultados previos obtenidos por métodos de mecánica molecular y *ab-initio* (Elmore y Dougherty, 2000; Takeshima *et al.*, 2002). De igual forma, la superficie de energía potencial para el ABT-594 muestra la existencia de dos mínimos, de los cuales el mínimo global se ha determinado que aparece en disolución acuosa (Mora *et al.*, 2003). Para calcular la dependencia de las coordenadas conformacionales de la función de partición conformacional y el determinante de la matriz **G** para ambos compuestos bioactivos se calculó la matriz **G** (Pickett, 1972; Niño y Muñoz-Caro, 1995a) para cada punto del mapa correspondiente a una geometría relajada. De los estudios realizados se concluye que para un compuesto bioactivo típico los elementos de la matriz **G** rotovibracional no se pueden considerar constantes con la conformación.

En el presente trabajo en particular, es de interés contar con un panorama claro de la distribución conformacional, incluyendo los efectos entrópicos de las formas biológicamente activas (catiónicas) de los sistemas moleculares en estudio. Por lo tanto, utilizaremos la nueva metodología descrita previamente.

La información que debe ser especificada en el archivo de entrada de nuestro programa para el cálculo de la distribución poblacional se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Estructura semántica de un archivo de entrada del programa utilizado para calcular la distribución poblacional.

Sección de Entrada	Contenido
Sección de título	Se describe el trabajo realizado
Especificación de parámetros	Se especifican el número de átomos del sistema en estudio, el número de coordenadas conformacionales, número de conformaciones, temperatura, clave para el tipo de archivo utilizado (Gaussian, Gamess, Molpro, etc.)
Especificación de coordenadas de torsión	Número de coordenada en la matriz Z y tipo de coordenada
Especificación molecular	Especifica la estructura de la molécula en formato de matriz Z
Especificación molecular de cada conformación	Especifica la estructura de la molécula en formato de coordenadas cartesianas en orientación estándar para cada conformación optimizada, además de especificar el valor de la(s) coordenada(s) conformacional(es) y la energía relativa de la conformación

Para este trabajo, se realizaron los cálculos de las distribuciones poblacionales para todas las moléculas en estudio tanto en vacío como en disolución acuosa.

La representación gráfica de las curvas de las distribuciones poblacionales de los casos unidimensionales, se realizó con el *software Grapher 5.01* (Grapher, 2000) y los mapas en el caso bidimensional con el *software Surfer 8.0* (Surfer, 2002).

4.3.- Distancias internitrógeno.

La distancia entre los dos nitrógenos, r_{NN} , es de especial interés puesto que es

uno de los factores que definen el farmacoforo nicotínico tridimensional (Beers y Earl, 1970; Sheridan *et al.*, 1986; Glennon *et al.*, 1994; Abreo *et al.*, 1996). En distintos estudios utilizando diferentes agonistas nicotínicos, se han obtenido una serie de valores para r_{NN} (Beers y Reich, 1970; Sheridan *et al.*, 1986; Glennon *et al.*, 1994; Abreo *et al.*, 1996). Sin embargo todos los datos están en el intervalo entre 4,8 Å (Sheridan *et al.*, 1986) y 6,1 Å (Abreo *et al.*, 1996).

4.4.- Índices de semejanza.

A fin de determinar la semejanza estructural de las moléculas en estudio, se han realizado en este trabajo cálculos de semejanza molecular usando el índice de semejanza molecular, tipo-Carbó, definido en el paquete Hex (Ritchie, 2003). En éste, cada molécula se representa usando funciones paramétricas en tres dimensiones (basadas en expansiones de funciones de base polares esféricas ortogonales reales), codificando la superficie, la carga electrostática y las distribuciones de potencial. Esto permite que cada propiedad pueda ser representada por un vector de coeficientes. Hex aplica un proceso de acoplamiento molecular (*molecular docking*) y busca el solapamiento máximo de las funciones paramétricas moleculares (Ritchie y Kemp, 1999; Ritchie, 2003). La semejanza se determina en función de los resultados de solapamiento, usando un volumen de solapamiento normalizado en el intervalo [-1000, 0]. El más cercano a -1000 tendría la semejanza más alta.

4.5.- Acoplamiento Molecular.

Para llevar a cabo el estudio de acoplamiento molecular utilizamos la *suite* de herramientas (AutoDock, 2006). Este conjunto de programas cuenta con características muy interesantes para el desarrollo de este trabajo, en comparación con otros programas de acoplamiento que previamente fueron revisados en otros trabajos (Caballero, 2007),

AutoDock tiene implementada una función de idoneidad de energía libre, obtenida de un ajuste con un grupo de calibración formado por 30 constantes de enlace de

complejos ligando-proteína ya conocidas (Morris *et al.*, 1998). La función de energía de enlace incluye términos para la energía generada por los efectos de dispersión/repulsión, enlaces de hidrógeno, electrostáticos, desviación de la geometría covalente, rotación interna y global, traslación, y efectos de solvatación e hidrofóbicos (Goodsell y Olson, 1990). El modelo de energía de enlace implementado en Autodock muestra un error estándar residual de 2,177 kcal/mol para el grupo de calibración. Esto es suficiente para discriminar entre compuestos con constantes de inhibición mili-, micro- y nano- molares. En general, Autodock es muy rápido, provee predicciones de alta calidad de conformaciones del ligando, y presenta una buena correlación entre las constantes de inhibición predichas y las experimentales.

La *suite* Autodock consiste en tres programas separados:

- a) Autodock, que realiza el acoplamiento del ligando a un conjunto de *grids* o celdas de energía potencial de interacción proteína-ligando, los cuales describen la proteína objetivo. Un mapa de *grid* consiste en una red tridimensional de puntos espaciados regularmente y centrados sobre alguna región de interés de la macromolécula en estudio.
- b) Autogrid, que calcula los *grids* antes mencionados.
- c) Autotors, que define los enlaces capaces de girar en un ligando.

Autodock tiene implementados tres algoritmos para obtener la estructura tridimensional del complejo ligando-macromolécula a partir de la energía óptima de enlace entre las moléculas de estudio: *Simulated annealing* (Kirkpatrick *et al.*, 1983), *algoritmo genético* (Holland, 1992) y una variante de este último llamado *algoritmo genético lamarckiano* (Morris *et al.*, 1998). Este último algoritmo es una variación del algoritmo genético, siendo ambos métodos más eficientes que el *simulated annealing*. En este trabajo se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano (AGL).

Autodock requiere que la macromolécula y el ligando sean preparados de manera especial antes de comenzar el acoplamiento. Para ello utilizamos las Autodock tools (ADT) que están construidas en un entorno de visualización molecular bajo Python (PMW). Para preparar el proceso de acoplamiento molecular partimos de las estructuras de ligando y receptor en formato PDB. Los archivos del banco de datos PDB pueden presentar problemas que es necesario corregir. Estos problemas son generalmente: pérdida de átomos, moléculas adicionales a la molécula de interés (moléculas de agua,

ligandos, etc.), rotura de cadenas, etc. ADT contiene varias herramientas útiles que permiten agregar o eliminar hidrógenos, reparar residuos agregando átomos perdidos, etc. Mediante ADT se agregan cargas de Kollman (Singh y Kollman, 1984; Besler *et al.*, 1990) para el receptor y de Gasteiger (Morris *et al.*, 1998) para el ligando para calcular los *grids* y parámetros de solvatación.

Autodock realiza la interacción de la macromolécula con el ligando mediante la definición de un *grid* de puntos espaciados regularmente sobre la macromolécula rodeando la región de interés de la misma. Cada punto del *grid* almacena valores de energía potencial, obtenida de la interacción de toda la macromolécula con cada tipo de átomo en el ligando.

En nuestro caso, el análisis de acoplamiento molecular se ha realizado en la zona de la subunidad $\alpha 4\beta 2$ del nAChR (10ED.PDB). El *grid* lo establecemos con valores de coordenadas en referencia a la estructura PDB citada de : 52 Å, 94 Å y 64 Å para los ejes **x**, **y** y **z** respectivamente.

El algoritmo genético comienza creando una población de individuos al azar, donde el usuario define el número de individuos en la población. Para cada individuo de la población inicial se asigna a cada uno de los tres genes de traslación *x*, *y* y *z* un valor aleatorio, distribuido uniformemente entre los valores mínimo y máximo del *grid*. Los cuatro genes que definen la orientación rotacional están dados por un cuaternión aleatorio, que consiste en un vector unidad y tres ángulos de rotación entre -180° y $+180^\circ$, escogidos todos al azar. Tras la creación de una población aleatoria inicial, se realiza una iteración sobre generaciones, repitiendo hasta que se alcance un número máximo de generaciones (*runs*) o de evaluaciones de energía. Adicionalmente, el algoritmo genético lamarckiano realiza una búsqueda local (*local search*) en cada generación. En este trabajo, para incrementar el número inicial de orientaciones al azar, con el fin de realizar una exploración más profunda del espacio rotacional y traslacional, se ha utilizado un tamaño de población inicial de 100 individuos. Los parámetros restantes se han ajustado a los valores por defecto. El número de ejecuciones del algoritmo genético ha sido de 20.

Capítulo V

Resultados y Discusión

Este capítulo se encuentra dividido en siete partes, lo que permite una agrupación homogénea de los resultados obtenidos en el presente estudio. Los cinco primeros apartados recogen los valores obtenidos en los cálculos realizados sobre cada una de las moléculas de forma individual. El apartado número 6 presenta un estudio comparativo de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 (B), DBO-83 (S) y nicotina, incluyendo las tablas de semejanza elaboradas a partir de la comparación de los conformeros más estables de las moléculas. En el último apartado, se presentan y comparan los datos obtenidos mediante las técnicas de *molecular docking*.

5.1.- Estudio de la forma protonada de la molécula de ABT-594.

La molécula seleccionada para comenzar este estudio, el ABT-594, lo ha sido por lo que supone de continuación de otros trabajos que se habían realizado previamente sobre ella (Mora, 2003) los cuales ya habían aportado algunas conclusiones interesantes.

5.1.1.- Valores de energía.

En el estudio de la forma protonada de la molécula de ABT-594, parece tener especial importancia la disposición relativa de los electrones del átomo de oxígeno. Como se muestra en la Figura 1 (Capítulo IV, Página 81), el par de electrones solitarios del oxígeno está colocado hacia arriba y abajo del plano del anillo piridínico, maximizando el solapamiento con el sistema π piridínico.

Para establecer la incidencia de este efecto en los valores energéticos calculados, se realizó un estudio (Mora et al., 2003), en el que se optimizaron totalmente las conformaciones que parten de valores de 180° para θ_1 y θ_2 (estructura más abierta) y valores de τ de 0° (electrones del oxígeno en disposición eclipsada) y 180° (electrones del oxígeno en disposición antieclipsada). Tras el análisis de los datos reflejados en la Tabla 7, se observó que los valores iniciales de θ_1 , θ_2 y τ cambian ligeramente durante la optimización. La diferencia de energía entre los conformeros con valores iniciales de $\tau = 0^\circ$ y 180° , es de $3,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, siendo el conformero más estable el que corresponde al valor de $\tau = 180^\circ$. Esta es una conformación en la cual los electrones del O11 y N1 están colocados en forma antieclipsada. Así, se minimiza la repulsión electrónica, aunque la diferencia en los valores de energía (menos de 1 kcal mol^{-1}) es demasiado pequeña para definir una conformación significativamente preferida a temperatura ambiente.

Tabla 7. Valores de los diedros θ_1 , θ_2 y τ y diferencias energéticas, ΔE , para la estructura más abierta de la forma protonada del ABT-594. Geometrías completamente optimizadas. Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

Conformación	θ_1	θ_2	τ	ΔE
Antieclipsada	180,3	168,1	180,9	0,0
Eclipsada	180,2	167,5	0,1	3,7

Los resultados anteriores sugieren que desde el punto de vista energético no hay conformaciones claramente preferidas respecto del ángulo τ . La comparación con otros agonistas nicotínicos puede ser de utilidad para clarificar esta cuestión. Así, el DBO-83,

exhibe la misma potencia analgésica y eficacia que la morfina y muestra selectividad por el nAChR neuronal (Barlocco *et al.*, 1998), al igual que el ABT-594. En el DBO-83, hay un grupo azo formando parte del anillo aromático. Por tanto, existe un nitrógeno adicional en hibridación sp^2 próximo al que podría ser considerado el nitrógeno piridínico en el ABT-594. O lo que es lo mismo, los dos electrones se encuentran eclipsando los nitrógenos. También el compuesto conocido como RJR-2403 [(E)-N-metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-amino] muestra especificidad por el nAChR neuronal (Papke *et al.*, 2000). Este compuesto tiene un doble enlace entre los dos átomos de carbono, en una posición relativa al anillo piridínico equivalente a la del átomo de oxígeno en el ABT-594.

Estos datos sugieren que la selectividad por el nAChR neuronal está asociada a la presencia de una zona electronegativa orientada en la misma dirección que el par de electrones del átomo electronegativo implicado en el posible enlace de hidrógeno con el sitio receptor. Así pues, se asigna un valor inicial de $\tau = 0^\circ$ (con el par de electrones del O11 y del N1 eclipsándose mutuamente), realizando el análisis conformacional sobre θ_1 y θ_2 .

El procedimiento seguido para obtener la hipersuperficie de energía potencial de la molécula ha consistido en obtener en primer lugar una geometría totalmente optimizada de la misma, relajándola completamente. A continuación se han calculado los datos de energía de los puntos de una malla de valores en θ_1 y θ_2 . Para cada punto, se ha construido la matriz Z partiendo de la obtenida al relajar completamente la molécula, dejando constantes, en los datos de entrada, los valores de los ángulos diedros correspondientes al punto calculado. En este caso, dichos ángulos son dih13 y dih14 (ver Tabla de matriz Z de la molécula de ABT-594 en el capítulo anterior). El método de actuación ha consistido en calcular, para un valor dado de dih13 en el intervalo de 0° a 300° con incrementos de 60° , los seis puntos correspondientes a la variación de dih14 en el mismo intervalo e idéntico incremento. Los valores correspondientes a 360° no se han calculado, puesto que por simetría coinciden con los de los puntos a 0° . La representación gráfica de la hipersuperficie de energía potencial a partir de los datos obtenidos, permite apreciar la presencia de seis mínimos locales en la hipersuperficie, situados alrededor de los valores de 90° , 180° y 300° para θ_1 y 60° , 180° y 300° para θ_2 . A continuación, se procedió a la localización exacta de dichos mínimos. Para ello, se definieron los confórmeros de mínima energía como: I (90° , 300°), II (90° , 180°), III (180° ,

60°), IV (180°, 180°), V (180°, 300°) y VI (300°, 300°). Para alcanzar los valores exactos de los ángulos correspondientes a los mínimos, partiendo de las geometrías finales alcanzadas al optimizar los correspondientes puntos de la malla, y utilizándolas como geometrías de entrada, se relajaron completamente las estructuras moleculares. Estos cálculos proporcionaron seis mínimos locales de energía.

Incorporando los nuevos cálculos a los que ya se habían obtenido, se completó la malla de las conformaciones estudiadas.

Como se cita en el capítulo IV, la elección del nivel B3LYP para realizar los cálculos, se justifica por un trabajo previo de comparación de los valores energéticos obtenidos aplicando dicho método de cálculo y el nivel MP2, en vacío (Mora *et al.*, 2005). Los valores proporcionados por ambos métodos se presentan en la Tabla 8. El procedimiento seguido para la obtención de los datos de la Tabla 8, tanto a nivel B3LYP como MP2 es el descrito anteriormente. Los valores de los ángulos del mínimo global obtenido con B3LYP fueron $\theta_1 = 177,3^\circ$ y $\theta_2 = 42,7^\circ$, y la energía correspondiente fue -994,877021 u.a. En cuanto a los valores de los ángulos del mínimo obtenidos con MP2 fueron $\theta_1 = 178,7^\circ$ y $\theta_2 = 43,8^\circ$ y la energía -992,686130 u.a.. En las columnas correspondientes a cada método, los valores de energía se refieren al del mínimo global.

Tras el análisis de los resultados presentados en la Tabla 8, se puede comprobar que los valores de los mínimos de energía difieren muy poco por lo que todos los cálculos posteriores se realizaron utilizando la metodología B3LYP.

Los valores de energía resultado de los cálculos realizados con la forma protonada de la molécula de ABT-594 en disolución, se presentan en la Tabla 9. En la misma, se incluyen los valores correspondientes a los cálculos en vacío presentados en la Tabla 8 para poder comparar. Tras optimizar todos los conformeros de la malla y relajar completamente la molécula en las conformaciones correspondientes a los mínimos de energía, se obtuvo el mínimo global. Los valores de los ángulos calculados para el mínimo global en disolución fueron de $\theta_1 = 179,6^\circ$ y $\theta_2 = 52,8^\circ$, y el dato de energía fue de -994,984213 u.a.. Los datos de incremento de energía de la columna correspondiente a los cálculos en disolución se refieren a este dato de energía. Los valores que aparecen en la columna de vacío se refieren al mínimo global con valores $\theta_1 = 177,3^\circ$ y $\theta_2 = 42,7^\circ$ y energía -994,877021 u.a.

Tabla 8. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del ABT-594, en la malla de valores de θ_1 y θ_2 desde 0° hasta 360° , calculados con B3LYP y MP2, en vacío.

θ_1	θ_2	B 3 L Y P	M P 2
		Energía	Energía
360	0	81,97	74,77
360	60	54,80	103,72
360	120	91,55	86,48
360	180	60,73	55,35
360	240	67,46	69,34
360	300	46,47	39,02
360	360	81,97	74,77
300	0	42,55	33,67
300	60	27,62	17,70
300	120	64,40	57,89
300	180	43,99	36,56
300	240	47,49	47,44
300	300	23,14	19,22
300	360	42,55	33,67
240	0	22,99	29,76
240	60	16,44	14,45
240	120	49,21	51,33
240	180	37,47	39,86
240	240	43,89	52,40
240	300	20,05	25,35
240	360	22,99	29,76
180	0	16,91	20,86
180	60	4,82	5,25
180	120	38,67	42,45
180	180	31,18	35,17
180	240	37,85	44,10
180	300	13,35	17,58
180	360	16,91	20,86
120	0	31,06	33,26
120	60	18,29	17,18
120	120	42,00	48,64
120	180	37,57	41,87
120	240	46,18	52,52

Tabla 8 (Continuación). Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del ABT-594, en la malla de valores de θ_1 y θ_2 desde 0° hasta 360° , calculados con B3LYP y MP2, en vacío.

θ_1	θ_2	B 3 L Y P	M P 2
		Energía	Energía
120	300	24,30	25,52
120	360	31,06	33,26
60	0	46,13	38,79
60	60	34,51	27,53
60	120	49,85	43,10
60	180	40,42	38,40
60	240	45,34	43,53
60	300	30,92	22,33
60	360	46,13	38,79
0	0	81,97	74,77
0	60	54,80	103,72
0	120	91,55	86,48
0	180	60,73	55,35
0	240	67,46	69,34
0	300	46,47	39,02
0	360	81,97	74,77
185,8	309,5	12,23	
177,3	42,7	0,00	
180,8	170,9	30,78	
269,3	310,3	18,01	
88,9	168,3	35,18	
82,2	287,0	23,94	
181,8	309,0		16,71
178,7	43,8		0,00
288,2	184,8		34,93
281,2	308,4		16,12
78,4	167,3		34,75
64,4	283,7		16,99
180,2	167,5		34,03
271,2	58,2		11,63

Tabla 9. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del ABT-594, en la malla de valores de θ_1 y θ_2 desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.

θ_1	θ_2	VACÍO	DISOLUCIÓN
		Energía	Energía
360	0	81,97	99,55
360	60	54,80	64,30
360	120	91,56	75,85
360	180	60,73	45,12
360	240	67,46	55,09
360	300	46,47	45,13
360	360	81,97	99,55
300	0	42,55	47,75
300	60	27,62	41,56
300	120	64,40	49,13
300	180	43,99	28,00
300	240	47,49	29,29
300	300	23,14	16,69
300	360	42,55	47,75
240	0	22,99	31,64
240	60	16,44	19,38
240	120	49,21	35,45
240	180	37,47	20,71
240	240	43,89	31,19
240	300	20,05	14,64
240	360	22,99	31,64
180	0	16,91	21,26
180	60	4,82	0,70
180	120	38,67	22,43
180	180	31,18	11,40
180	240	37,85	18,73
180	300	13,35	5,20
180	360	16,91	21,26
120	0	31,06	37,04
120	60	18,29	13,28
120	120	42,00	30,40
120	180	37,57	21,44
120	240	46,18	30,35
120	300	24,30	19,99
120	360	31,06	37,04

Tabla 9 (Continuación). Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del ABT-594, en la malla de valores de θ_1 y θ_2 desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.

θ_1	θ_2	VACÍO	DISOLUCIÓN
		Energía	Energía
120	360	31,06	37,04
60	0	46,13	60,28
60	60	34,51	29,58
60	120	49,85	30,12
60	180	40,43	23,17
60	240	45,34	31,00
60	300	30,92	36,99
60	360	46,13	60,28
0	0	81,97	99,55
0	60	54,80	64,30
0	120	91,56	75,85
0	180	60,73	45,12
0	240	67,46	55,09
0	300	46,47	45,13
0	360	81,97	99,55
269,3	310,3	18,01	
185,8	309,5	12,23	
180,8	170,9	30,78	
177,3	42,7	0,00	
88,9	168,3	35,18	
82,2	287,0	23,94	
274,1	296,7		11,29
180,1	176,5		11,25
179,9	291,2		4,50
179,6	52,8		0,00
87,2	167,9		17,39
80,0	273,5		22,92

Una vez obtenidos los valores de energía, en vacío y en disolución, de la molécula de ABT-594, se elaboraron los mapas conformacionales. Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7.

Figura 6. Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de ABT-594 para el movimiento de torsión alrededor de los ángulos diedros θ_1 y θ_2 . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

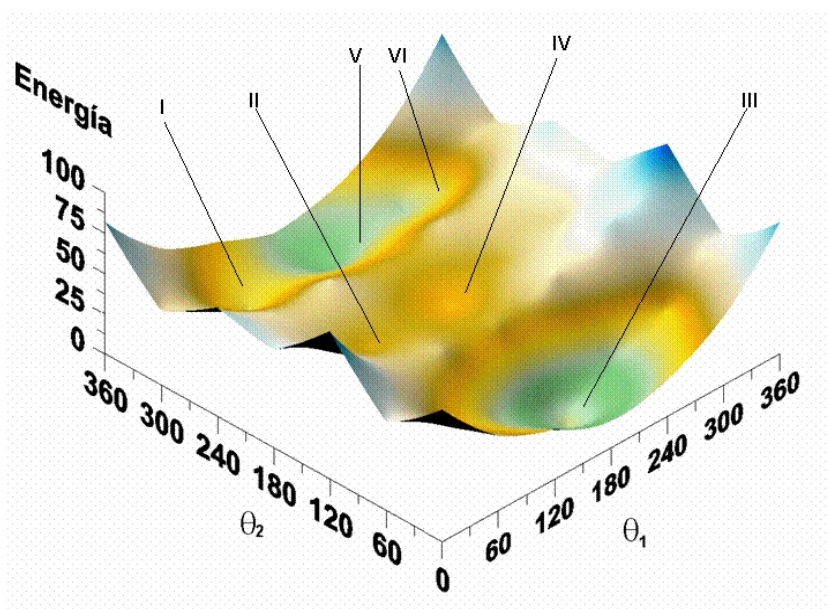
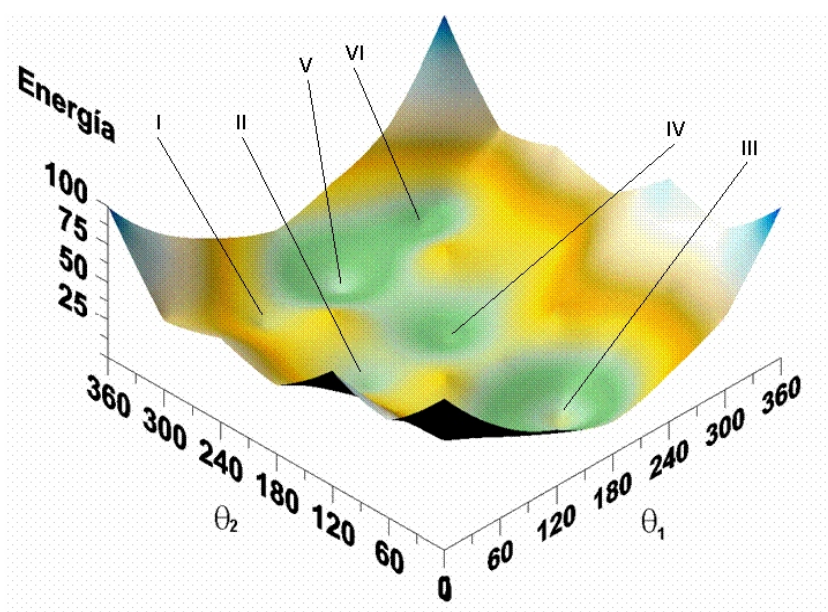


Figura 7. Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de ABT-594 para el movimiento de torsión alrededor de los ángulos diedros θ_1 y θ_2 . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .



A partir de los resultados anteriores, se identificó como mínimo global para los cálculos en vacío del ABT-594 ($\theta_1 = 177,3^\circ$ y $\theta_2 = 42,7^\circ$), el que se había denominado confórmero III. El mínimo global en disolución, es el de los valores $\theta_1 = 179,6^\circ$ y $\theta_2 = 52,8^\circ$, que corresponden al mismo confórmero. En la Tabla 10, se presentan los valores de la matriz Z del mínimo global en vacío. La matriz Z del mínimo global de los cálculos en disolución, que aparece para los valores $\theta_1 = 179,6^\circ$ y $\theta_2 = 52,8^\circ$, se presenta en la Tabla 11.

Tabla 10. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío del ABT-594. En negrita se han marcado los valores de θ_1 y θ_2 .

1	n							
2	c	1	1,327					
3	c	2	1,399	1	123,9			
4	c	3	1,395	2	118,2	1	0,0	
5	c	4	1,397	3	118,0	2	0,0	
6	c	1	1,333	2	117,9	3	0,1	
7	cl	2	1,749	1	117,0	6	180,1	
8	h	3	1,089	2	120,8	1	-180,0	
9	h	4	1,091	3	119,4	2	-179,9	
10	h	6	1,095	1	117,1	2	-180,3	
11	o	5	1,392	4	124,8	3	-179,9	
12	c	11	1,418	5	119,0	4	-0,4	
13	c	12	1,518	11	105,5	5	177,3	
14	n	13	1,542	12	111,4	11	42,7	
15	c	14	1,529	13	89,6	12	-134,6	
16	c	15	1,543	14	89,7	13	13,1	
17	h	12	1,105	13	108,4	11	120,4	
18	h	12	1,106	13	111,1	17	119,0	
19	h	13	1,098	14	109,1	15	101,8	
20	h	14	1,027	15	118,0	16	135,6	
21	h	15	1,096	14	112,1	13	134,4	
22	h	15	1,097	14	108,9	21	122,5	
23	h	16	1,097	15	112,7	14	100,6	
24	h	16	1,096	15	116,0	23	128,1	
25	h	14	1,033	15	112,1	20	128,7	

Tabla 11. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución del ABT-594. En negrita se han marcado los valores de θ_1 y θ_2 .

1	n							
2	c	1	1,325					
3	c	2	1,394	1	124,8			
4	c	3	1,397	2	117,8	1	0,0	
5	c	4	1,400	3	118,4	2	0,1	
6	c	1	1,338	2	117,4	3	0,0	
7	cl	2	1,776	1	116,3	6	179,9	
8	h	3	1,093	2	121,3	1	180,0	
9	h	4	1,093	3	119,2	2	-180,0	
10	h	6	1,097	1	117,5	2	180,0	
11	o	5	1,365	4	125,5	3	179,9	
12	c	11	1,428	5	118,8	4	0,0	
13	c	12	1,510	11	107,1	5	179,6	
14	n	13	1,532	12	114,1	11	52,8	
15	c	14	1,524	13	89,7	12	-134,5	
16	c	15	1,543	14	90,1	13	11,4	
17	h	12	1,106	13	108,5	11	120,4	
18	h	12	1,106	13	110,5	17	119,2	
19	h	13	1,102	14	108,2	15	103,1	
20	h	14	1,040	15	116,6	16	130,8	
21	h	15	1,097	14	111,7	13	132,0	
22	h	15	1,097	14	109,1	21	122,9	
23	h	16	1,098	15	113,0	14	102,7	
24	h	16	1,097	15	115,9	23	128,6	
25	h	14	1,039	15	113,0	20	125,7	

En la Tabla 12 se presentan las conformaciones de los mínimos locales. En ella se recogen los valores de los ángulos de dichos mínimos calculados en vacío y en disolución, y los incrementos de energía de los distintos conformeros respecto del mínimo global de cada especie. Analizando la Tabla 12, se encuentra que, para los cálculos en vacío, aparece el conformero VI a unos 18 kJ mol⁻¹ del mínimo global. El conformero V es el más próximo al mínimo absoluto, situado a 12,2 kJ mol⁻¹. En cuanto a los cálculos en disolución, en que el mínimo global es también el conformero III, la Tabla 12 muestra que el mínimo local más próximo, a 4,5 kJ mol⁻¹, corresponde al

confórmero V.

De los valores de energía obtenidos, se puede concluir también que, en vacío, la máxima diferencia de energía entre los confórmeros III y II es de alrededor de 35 kJ mol⁻¹. Para la molécula en disolución, las diferencias de energía entre los mínimos, para valores de θ_2 de 273,5° y 167,9°, son del orden de 20 kJ mol⁻¹. Por lo tanto, en ambos casos (vacío y disolución), las preferencias conformacionales del ABT-594 son similares, aunque con una ligera variación en la energía.

Tabla 12. Valores de θ_1 y θ_2 (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol⁻¹) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada del ABT-594. Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.

Confórmero	θ_1^a	θ_2^a	ΔE^a	θ_1^b	θ_2^b	ΔE^b
I	82,2	287,0	23,9	80,0	273,5	22,9
II	88,9	168,3	35,2	87,2	167,9	17,4
III	177,3	42,7	0,0	179,6	52,8	0,0
IV	180,8	170,9	30,8	180,1	176,5	11,2
V	185,8	309,5	12,2	179,9	291,2	4,5
VI	269,3	310,3	18,0	274,1	296,7	11,3

a) Cálculos en vacío

b) Cálculos en disolución

La Tabla 12 muestra que en disolución todos los confórmeros experimentan un decrecimiento de la diferencia de energía. El mínimo global, (confórmero III), se encuentra para valores de θ_1 y θ_2 de 179,6° y 52,8°, respectivamente. Así, el mínimo está ligeramente desplazado desde el lugar que ocupa en vacío. La comparación de las Figuras 6 y 7 muestra que la hipersuperficie de energía, en disolución, es más plana que en vacío. Todos estos datos indican que la forma molecular es más flexible en disolución, en términos energéticos, que en vacío. Las estructuras más estables en vacío y en disolución, se recogen en las figuras 8 y 9.

Figura 8. Estructura del conformero III de la molécula de ABT-594. Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Rojo: Oxígeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno.

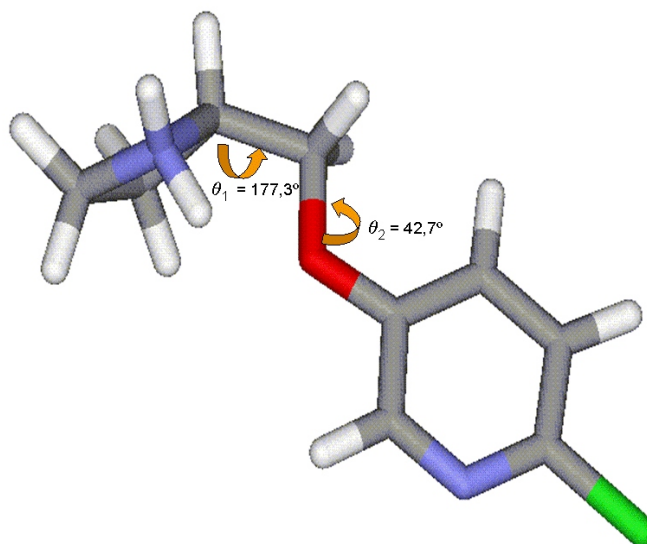
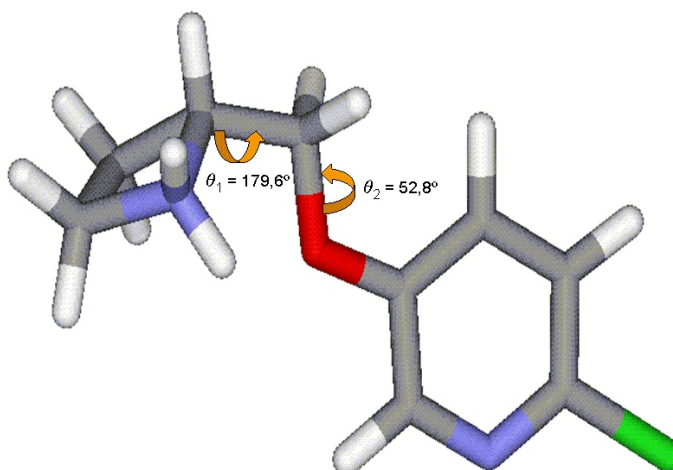


Figura 9. Estructura del conformero III de la molécula de ABT-594. Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Rojo: Oxígeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno.



5.1.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.

Para cuantificar la población relativa de los diferentes conformeros a temperatura fisiológica (37 °C), se ha calculado la función de partición conformacional y realizado un análisis poblacional como se indica en el capítulo IV.

Los cálculos realizados en vacío, proporcionan los datos de poblaciones que se representan en la Figura 10. En la Figura 11 se presentan los resultados para las poblaciones calculadas en disolución. Observando dichas figuras, se comprueba como prácticamente el 100% de la población, tanto en vacío como en disolución, lo alcanza el conformero III. La diferencia fundamental entre las dos estructuras en vacío y disolución (Figuras 8 y 9), es que el nitrógeno en disolución está mas próximo al par de electrones del oxígeno, orientado hacia el nitrógeno piridinico.

Figura 10. Mapa tridimensional de poblaciones conformacionales del ABT-594, en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. El eje Z corresponde a la población.

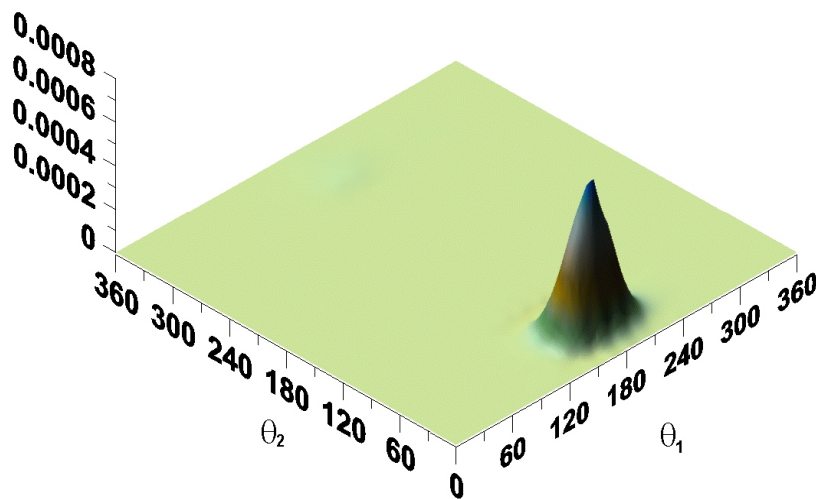
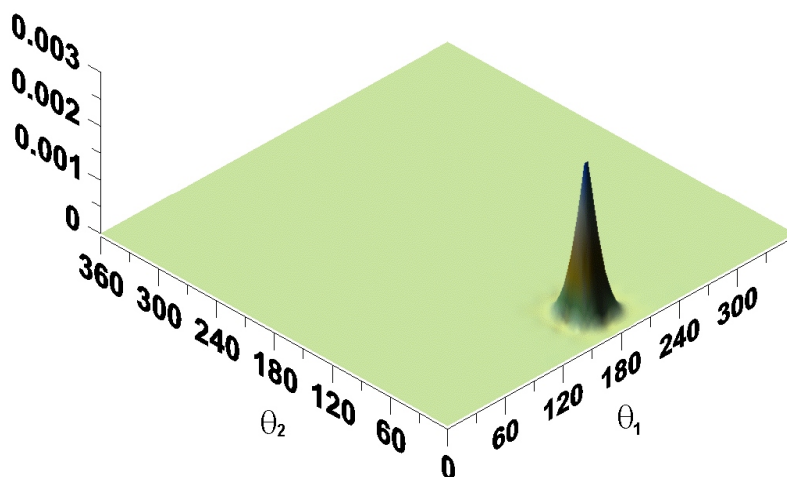


Figura 11. Mapa tridimensional de poblaciones conformacionales del ABT-594, en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. El eje Z corresponde a la población.



5.1.3.- Distancia internitrógeno.

Como se indica en el capítulo IV, el valor de la distancia internitrógeno r_{NN} es un índice de actividad farmacológica. La Tabla 13 recoge el valor de la distancia r_{NN} para todos los conformeros de la forma protonada del ABT-594. Los datos de distancia internitrógeno se han medido para todas las conformaciones calculadas tanto en vacío como en disolución.

Examinando los valores de la columna de datos en vacío, se comprueba que los conformeros III y V, con $r_{NN} = 6,0 \text{ \AA}$ y el conformero VI, con $r_{NN} = 5,2 \text{ \AA}$, están dentro del intervalo de valores de r_{NN} encontrados para los agonistas nicotínicos :4,8 \AA (Sheridan *et al.*, 1986) y 6,1 \AA (Abreo *et al.*, 1996). Por otro lado, el conformero IV con $r_{NN} = 7,3 \text{ \AA}$ está fuera del intervalo por más de 1 \AA . Así, los conformeros III y V son candidatos a ser conformaciones activas para enlazarse con el receptor nicotínico. Sin embargo, según el cálculo poblacional realizado en la sección anterior, el conformero III, que es el único poblado, es el candidato inicial a especie activa. El estudio de los valores de la columna

de datos en disolución, indica que el confórmero VI, con $r_{NN} = 6,0 \text{ \AA}$, está dentro del intervalo, si bien en el cálculo poblacional previo no aparece poblado. En cambio, el confórmero III, el único poblado, presenta un valor $r_{NN} = 6,2 \text{ \AA}$, ligeramente por encima del límite máximo del intervalo.

La Figura 12 muestra la distancia r_{NN} como una función de los ángulos θ_1 y θ_2 para los confórmeros optimizados en vacío. Los valores obtenidos para los cálculos realizados en disolución se representan en la Figura 13.

Tabla 13. Distancias internitrógeno r_{NN} en \AA para todos los confórmeros de la molécula de ABT-594. Valores en vacío y en disolución

θ_1	θ_2	Vacío	Disolución
0,0	0,0	4,1	4,0
0,0	60,0	3,9	4,2
0,0	120,0	5,5	5,8
0,0	180,0	5,8	6,2
0,0	240,0	5,5	5,8
0,0	300,0	3,9	4,4
0,0	360,0	4,1	4,0
60,0	0,0	4,2	4,5
60,0	60,0	5,1	5,4
60,0	120,0	6,4	6,5
60,0	180,0	5,9	6,5
60,0	240,0	5,0	5,8
60,0	300,0	3,9	4,4
60,0	360,0	4,2	4,5
120,0	0,0	5,7	5,7
120,0	60,0	6,4	6,3
120,0	120,0	6,6	7,2
120,0	180,0	6,7	7,2
120,0	240,0	5,8	6,6
120,0	300,0	4,8	5,2
120,0	360,0	5,7	5,7
180,0	0,0	5,9	6,0
180,0	60,0	6,2	6,3
180,0	120,0	7,0	7,0
180,0	180,0	7,3	7,3
180,0	240,0	7,0	70,0

Tabla 13 (Continuación). Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para todos los conformeros de la molécula de ABT-594. Valores en vacío y en disolución

θ_1	θ_2	Vacío	Disolución
180,0	300,0	6,1	6,2
180,0	360,0	5,9	6,0
240,0	0,0	5,1	5,8
240,0	60,0	4,8	5,7
240,0	120,0	6,0	6,7
240,0	180,0	6,7	6,9
240,0	240,0	6,6	6,7
240,0	300,0	6,0	6,2
240,0	360,0	5,1	5,8
300,0	0,0	4,3	4,7
300,0	60,0	4,2	4,5
300,0	120,0	5,7	5,9
300,0	180,0	5,9	6,3
300,0	240,0	5,9	6,5
300,0	300,0	4,8	5,4
300,0	360,0	4,3	4,7
360,0	0,0	4,1	4,0
360,0	60,0	3,9	4,2
360,0	120,0	5,5	5,8
360,0	180,0	5,8	6,2
360,0	240,0	5,5	5,8
360,0	300,0	3,9	4,4
360,0	360,0	4,1	4,0
82,2	287,0	4,1	
88,9	168,3	6,2	
177,3	42,7	6,0	
180,8	170,9	7,3	
185,8	309,5	6,0	
269,3	310,3	5,2	
80,0	273,5		4,7
87,2	167,9		7,0
179,6	52,8		6,2
179,9	291,2		6,4
180,1	176,5		7,3
274,1	296,7		6,0

Figura 12 . Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función de los ángulos diedros θ_1 y θ_1 en la forma protonada de la molécula de ABT-594. Geometrías optimizadas en vacío. Se incluye e indica el conformero III. Las líneas discontinuas marcan los límites superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.

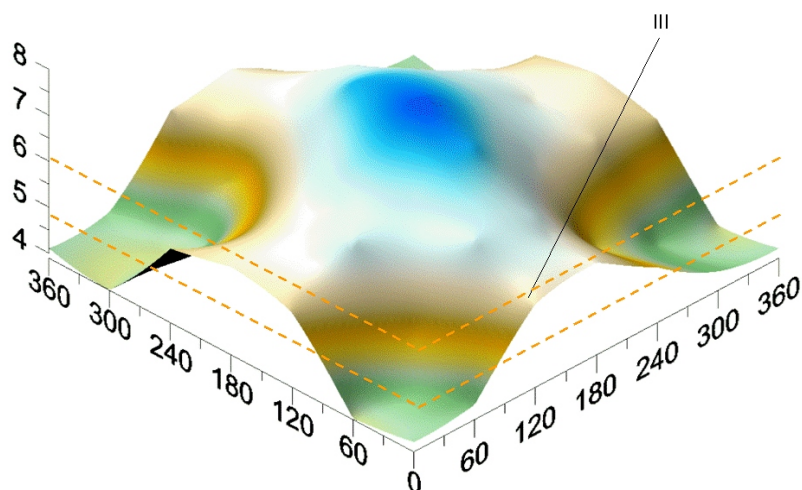
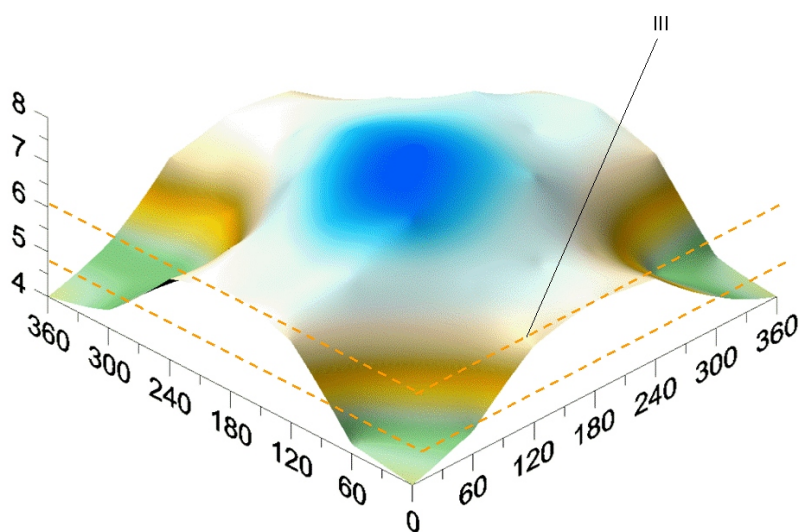


Figura 13 . Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función de los ángulos diedros θ_1 y θ_1 en la forma protonada de la molécula de ABT-594. Geometrías optimizadas en disolución. Se incluye e indica el conformero III. Las líneas discontinuas marcan los límites superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.



El estudio a que se ha sometido la forma protonada de la molécula de ABT-594, presenta como conclusión que sólo el confórmero III: mínimo global tanto en vacío como en disolución, el único poblado en ambos medios y con un valor de distancia internitrógeno compatible con los datos teóricos, puede ser considerado como especie activa, candidato a enlazarse con el sitio receptor.

5.2.- Estudio de la forma protonada de la molécula de epibatidina.

La molécula de epibatidina se ha incluido en este estudio debido a las singulares características que reúne. Su elevado poder analgésico resulta inutilizable por los importantes efectos secundarios que causa. Sin embargo, la elucidación de su estructura permitió crear toda una nueva línea de analgésicos que, manteniendo algunas características estructurales comunes, actúan con efectos secundarios mucho menores.

5.2.1.- Valores de energía.

El estudio de la molécula de epibatidina, se ha realizado obteniendo previamente la geometría completamente optimizada de la misma. La matriz Z usada se presentó en el capítulo anterior. El ángulo diedro que se fija para obtener la malla de valores de 0° a 300° con incrementos de 30° es el que se identifica en la matriz Z como dih12. Para calcular la energía de los distintos puntos de la malla, tanto en vacío como en disolución, se ha partido de la matriz Z de la molécula totalmente optimizada, dejando fijo el valor del diedro en estudio. Finalizadas las optimizaciones de los puntos de la malla, y tras representar las hipersuperficies de energía potencial se observan, en vacío, dos zonas de mínima energía situadas en torno a los valores de θ de 150° y 330° . En la hipersuperficie de energía potencial de los cálculos en disolución se observan dos mínimos locales con θ alrededor de 120° y 300° .

El siguiente paso del procedimiento seguido ha sido la localización exacta de los mínimos locales y el mínimo global, en vacío y en disolución. Se definen los confórmeros de mínima energía como: I (120°), II (150°), III (300°) y IV (330°). Para obtener los

mínimos locales en vacío, se utilizaron como geometrías de entrada las geometrías finales obtenidas al optimizar los conformeros II y IV y se relajaron completamente las estructuras. Para los cálculos en disolución, se utilizaron los conformeros I y III.

La Tabla 14 presenta los resultados de los cálculos realizados con la forma protonada de la molécula de epibatidina en vacío y en disolución. En ella, el valor del ángulo del mínimo al que se refiere la columna de energía de datos en vacío es $\theta = 150,8^\circ$, siendo la energía obtenida de -997,108710 u.a. En cuanto a la columna de energía de datos en disolución, los valores se refieren al mínimo definido por el ángulo $\theta = 305,1^\circ$, en que el dato de energía que se obtuvo fue de -997,213108 u.a.

Tabla 14. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada de la epibatidina, en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.

θ	VACÍO	DISOLUCIÓN
	Energía	Energía
360	6,14	4,52
330	3,95	3,07
300	7,93	1,34
270	9,13	3,25
240	9,03	3,75
210	8,41	4,80
180	4,50	4,40
150	0,01	3,35
120	3,81	2,60
90	4,34	3,03
60	4,45	3,35
30	6,78	4,16
0	6,14	4,52
150,8	0,00	
120,5		3,03
305,1		0,00

Una vez obtenidos los valores de energía, en vacío y en disolución, de la molécula de epibatidina, se elaboraron los mapas conformacionales. Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15.

Figura 14. Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de epibatidina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

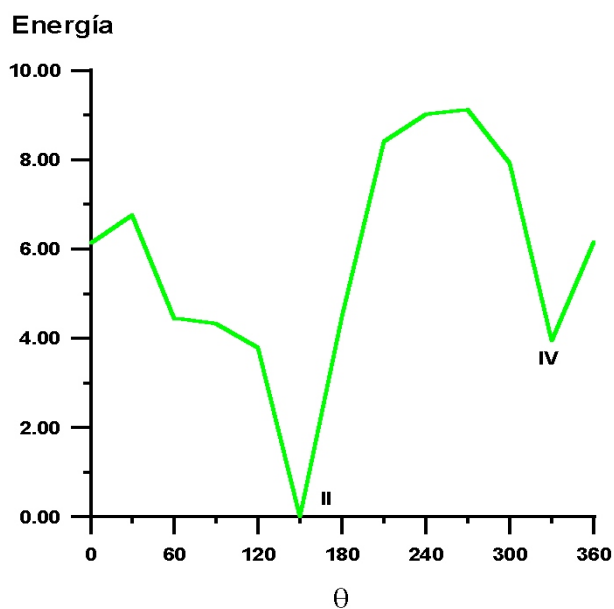
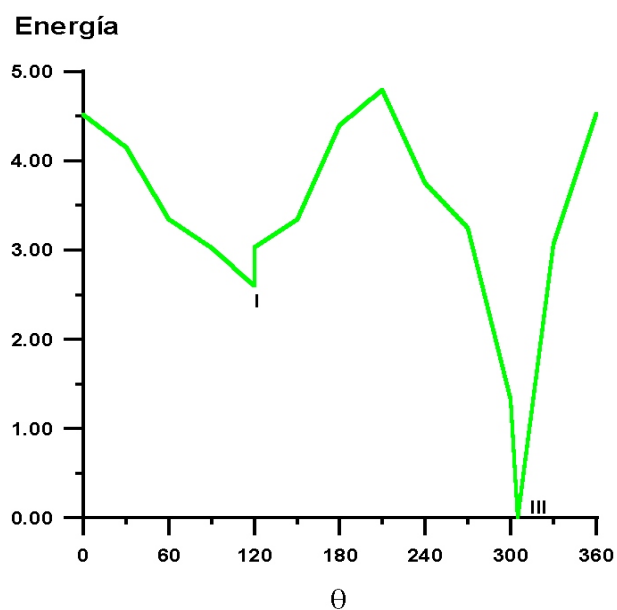


Figura 15. Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de epibatidina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .



A partir de los resultados anteriores, se identificó como mínimo global para los cálculos en vacío de la epibatidina el de $\theta = 150,8^\circ$, que es el que se había denominado confórmero II. El mínimo global en disolución, es el de valor $\theta = 305,1^\circ$, que se corresponde con el confórmero III. En la Tabla 15, se presentan los valores de la matriz Z del mínimo global en vacío. La matriz Z del mínimo global de los cálculos en disolución, que aparece para el valor $\theta = 305,1^\circ$, se presenta en la Tabla 16.

Tabla 15. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío de la epibatidina. En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,323					
3	c	2	1,405	1	123,9			
4	c	3	1,388	2	117,6	1	1,1	
5	c	4	1,408	3	120,1	2	-0,6	
6	c	5	1,401	4	116,3	3	-0,6	
7	cl	2	1,745	3	119,0	4	-179,1	
8	h	3	1,090	4	121,7	5	179,3	
9	h	4	1,093	5	120,4	6	-181,2	
10	h	6	1,098	5	121,5	4	183,3	
11	c	5	1,520	4	120,0	3	176,9	
12	c	11	1,570	5	115,9	4	150,8	
13	c	12	1,539	11	104,2	5	118,7	
14	c	13	1,536	12	110,8	11	72,6	
15	c	14	1,562	13	103,0	12	-68,2	
16	c	15	1,538	14	103,5	13	-2,5	
17	n	16	1,528	15	100,7	14	-33,3	
18	h	12	1,098	11	111,9	16	-124,5	
19	h	12	1,097	11	112,1	16	115,3	
20	h	13	1,096	14	116,2	15	156,7	
21	h	14	1,098	15	113,4	16	-121,9	
22	h	14	1,100	15	111,6	16	116,9	
23	h	15	1,100	14	111,6	13	-122,1	
24	h	15	1,098	14	113,1	13	116,9	
25	h	16	1,096	15	116,2	14	-153,4	
26	h	11	1,099	16	107,5	15	49,0	
27	h	17	1,027	16	113,6	15	-62,7	
28	h	17	1,030	16	112,1	27	-123,1	

Tabla 16. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución de la epibatidina. En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,321					
3	c	2	1,397	1	125,1			
4	c	3	1,393	2	117,0	1	0,1	
5	c	4	1,406	3	120,0	2	-0,3	
6	c	5	1,401	4	116,6	3	0,3	
7	cl	2	1,774	3	118,6	4	-179,7	
8	h	3	1,093	4	121,6	5	179,9	
9	h	4	1,097	5	121,8	6	-179,3	
10	h	6	1,098	5	119,9	4	179,9	
11	c	5	1,515	4	124,0	3	180,6	
12	c	11	1,570	5	115,3	4	305,1	
13	c	12	1,534	11	103,5	5	133,0	
14	c	13	1,540	12	111,0	11	65,5	
15	c	14	1,563	13	103,2	12	-72,6	
16	c	15	1,538	14	102,9	13	3,5	
17	n	16	1,521	15	99,5	14	-38,0	
18	h	12	1,101	11	111,2	16	-111,8	
19	h	12	1,098	11	112,5	16	127,0	
20	h	13	1,099	14	116,1	15	152,5	
21	h	14	1,099	15	113,1	16	-115,7	
22	h	14	1,100	15	111,4	16	122,5	
23	h	15	1,101	14	111,3	13	-114,8	
24	h	15	1,098	14	113,4	13	123,1	
25	h	16	1,099	15	116,3	14	-157,8	
26	h	11	1,101	16	106,7	15	39,5	
27	h	17	1,041	16	112,5	15	-60,0	
28	h	17	1,039	16	115,4	27	-122,0	

Los valores de los ángulos de los mínimos locales calculados en vacío y en disolución, se reflejan en la Tabla 17. Los valores recogidos en las columnas de incremento de energía, están calculados respecto del mínimo global obtenido con cada tipo de cálculo. En vacío, aparece como más estable el confórmero II, y la diferencia de energía con el confórmero IV es de 4,0 kJ mol⁻¹. En disolución aparece el confórmero III como el más estable, con una diferencia de energía con el confórmero I de 3,0 kJ mol⁻¹

La Figura 16 se corresponde con la estructura del mínimo global en vacío. En la Figura 17 se recoge la estructura del mínimo global calculado en disolución.

Tabla 17. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada de la epibatidina. Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.

Confórmero	θ^a	ΔE^a	θ^b	ΔE^b
I			120,5	3,0
II	150,8	0,0		
III			305,1	0,0
IV	330	4,0		

a) Cálculos en vacío

b) Cálculos en disolución

Figura 16. Estructura del confórmero II de la epibatidina. Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.

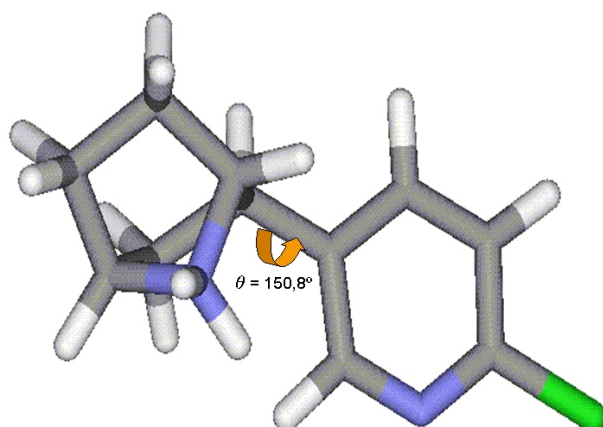
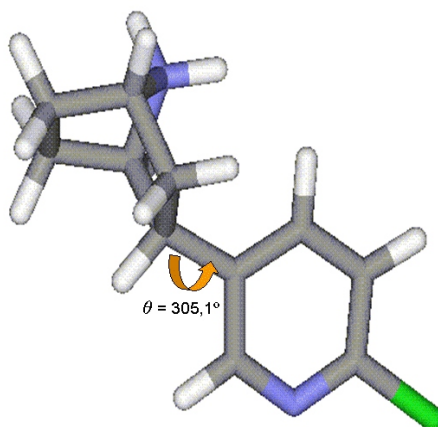


Figura 17. Estructura del conformero III de la epibatidina. Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.



5.2.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.

Se realizó el cálculo de la función de partición poblacional utilizando la metodología que se indica en el capítulo IV, obteniéndose la población relativa de los distintos conformeros de la molécula de epibatidina, a temperatura fisiológica (37°C).

La Figura 18 representa los datos de poblaciones calculados en vacío. En la Figura 19 se presentan los resultados para las poblaciones calculadas en disolución. Observando dichas figuras, se comprueba como la población en vacío se concentra significativamente en el conformero II, con una pequeña aportación correspondiente al conformero IV. En disolución, aun cuando la máxima población aparece en el conformero I, el conformero III presenta una aportación apreciable.

En la Figura 16 se representa la estructura del conformero termodinámicamente más estable en vacío.

Figura 18. Mapa de población conformacional de la epibatidina, en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.

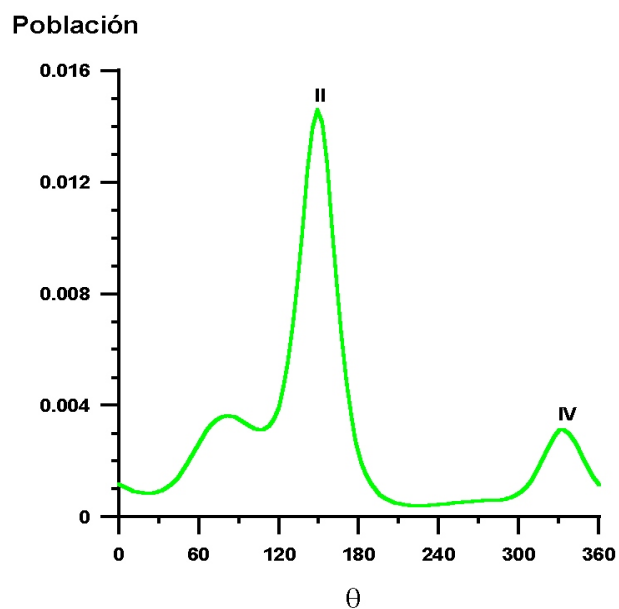
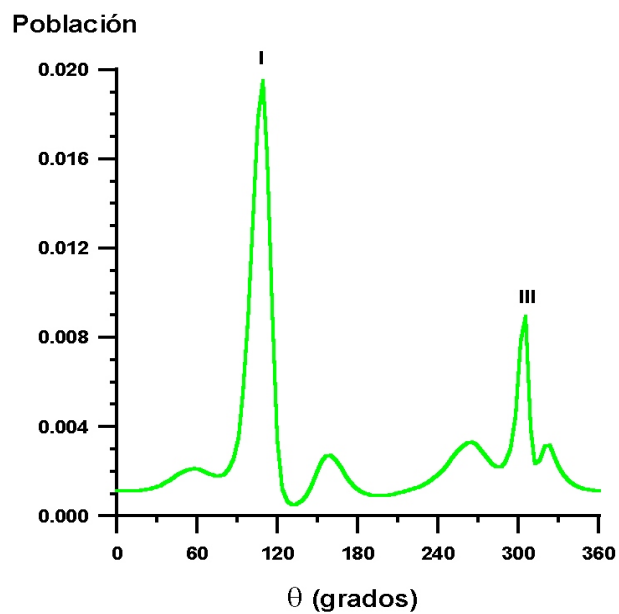


Figura 19. Mapa de poblaciones conformacionales de la epibatidina, en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.



5.2.3.- Distancia internitrógeno.

Se utiliza el análisis de la distancia internitrógeno en todos los conformeros de la epibatidina para identificar cuales de ellos se encuentran dentro de los límites de los valores establecidos para los agonistas nicotínicos (4,8 - 6,1 Å) (Sheridan *et al.*, 1986; Abreo *et al.*, 1996). En la Tabla 18 se presentan los valores de la distancia r_{NN} de todas las conformaciones de esta molécula calculadas en vacío y en disolución. La Figura 20 muestra la representación de la distancia r_{NN} medida sobre los conformeros optimizados en vacío como una función del ángulo θ . Se observa como, aún siendo el conformero II el más poblado, su valor de $r_{NN} = 4,5$ Å le sitúa fuera del intervalo de valores de r_{NN} encontrados para los agonistas nicotínicos. En cambio, el conformero IV, menos poblado, sí que podría comportarse como especie activa. Para los cálculos en disolución, representados en la Figura 21, se puede ver como prácticamente todas las conformaciones están dentro del intervalo de valores de r_{NN} antes citado. Por lo tanto, en mayor o menor medida, todas las conformaciones son candidatas a ser conformaciones activas para enlazarse con el receptor nicotínico. Se puede observar que los conformeros I y III, los más poblados en disolución, presentan valores de distancia r_{NN} compatibles con el farmacoforo nicotínico.

Tabla 18. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ en la molécula de epibatidina.

θ	Vacío	Disolución
0,0	5,1	5,3
30,0	4,9	5,1
60,0	4,6	4,8
90,0	4,6	4,7
120,0	4,6	4,8
120,5		4,8
150,0	4,5	4,8
150,8	4,5	
180,0	4,7	5,1
210,0	5,2	5,4
240,0	5,4	5,5
270,0	5,6	5,7
300,0	5,7	5,7
305,1		5,7
330,0	5,3	5,5
360,0	5,1	5,3

Figura 20. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la epibatidina. Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los conformeros II y IV. Las líneas discontinuas marcan los límites superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.

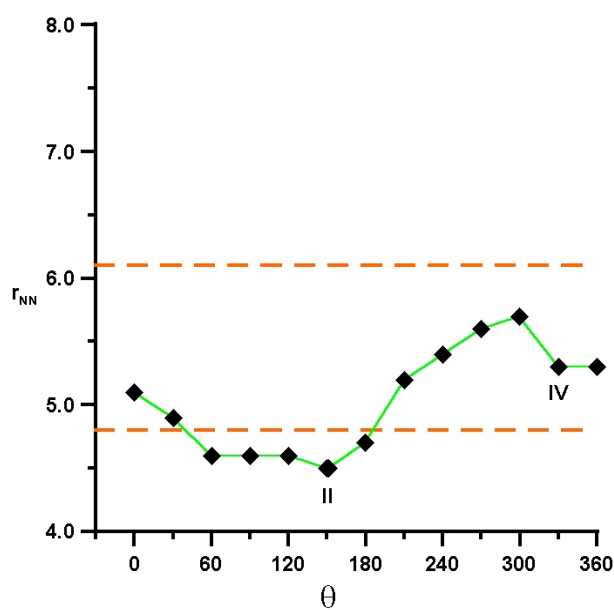
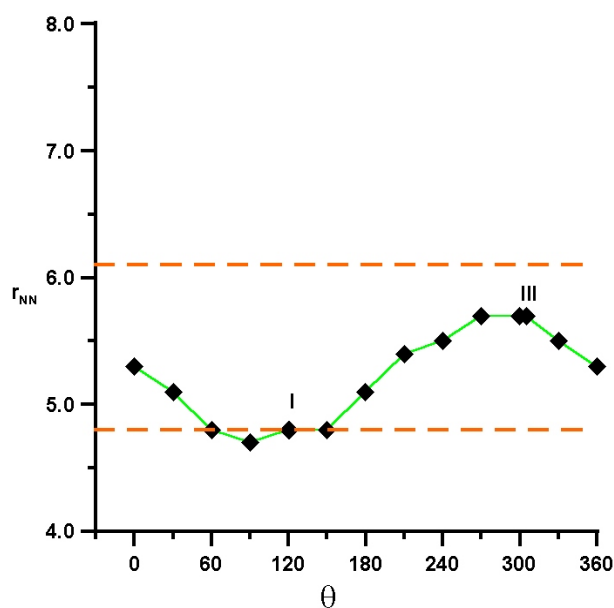


Figura 21. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la epibatidina. Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los conformeros I y III. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.



Con los datos obtenidos y relacionados en los subapartados anteriores, se comprueba que la molécula de epibatidina no presenta una forma de actuación tan clara como la de ABT-594: los mínimos globales son distintos en vacío (confórmero II) y en disolución (confórmero III). El análisis poblacional ofrece a su vez resultados distintos del estudio conformacional, presentando como confórmero más poblado en vacío el confórmero II, que coincide con el mínimo global en este medio, pero no así en disolución. El confórmero más poblado en disolución es el confórmero I, si bien el confórmero III, mínimo global en disolución, presenta una población significativa.

Se puede pensar que el confórmero II en vacío, y el confórmero III en disolución, pueden enlazarse con el sitio activo en términos de valores energéticos y poblacionales, aún cuando la distancia internitrógeno del confórmero II en vacío está por debajo de los límites teóricos establecidos.

5.3.- Estudio de la forma protonada de la molécula de DBO-83 (Bote).

La elección de la molécula de DBO-83 para formar parte de este estudio, se basó en los esperanzadores resultados que se están obteniendo con ella en los experimentos *in vivo*. Aporta también un interés especial el hecho de conocerse que dicha molécula tiene dos especies activas, basadas en la disposición espacial que adopta el anillo diazabicyclooctano, silla y bote. Éstas dos especies pueden utilizarse para realizar dos estudios energéticos y poblacionales separados, como si se tratase de moléculas diferentes.

5.3.1.- Valores de energía.

Utilizando la metodología descrita con anterioridad, se ha realizado el estudio de la molécula de DBO-83 en su configuración bote (DBO-83 (B)). Para la obtención de los valores de energía con los que elaborar los mapas conformacionales tanto en vacío como en disolución, se optimizó completamente la molécula. La matriz Z que representa la geometría totalmente optimizada, se describe en el capítulo IV. A continuación, se ha

definido una malla de conformaciones obtenidas variando el ángulo diedro descrito como dih11, desde 0° hasta 300° incrementando en 30° y dejando fijo su valor en la optimización.

La representación de los mapas conformacionales permite observar la presencia de dos mínimos locales en la representación en vacío y otros dos distintos en la hypersuperficie en disolución. En vacío, los mínimos locales se sitúan en las zonas correspondientes a valores de θ de 240° y 300°. Los mínimos locales en disolución aparecen para valores de θ de 0° y 180°. Para conocer con mayor precisión los valores de θ de estas zonas de mínima energía, se definieron los confórmeros: I (0°), II (180°), III (240°) y IV (300°). A continuación, se optimizaron las geometrías finales de las conformaciones correspondientes a los mínimos locales, relajando completamente las moléculas. Estos cálculos se realizaron para los confórmeros III y IV en vacío y I y II en disolución.

Los nuevos cálculos, incorporados a aquellos de los que ya disponíamos, se representan en la Tabla 19. Los datos reflejados en la columna de cálculos en vacío, se refieren a la energía correspondiente al mínimo global, $\theta = 248,3^\circ$, que presenta un valor de -1068,478936 u.a. La columna de energía de datos en disolución contiene los valores de la malla referidos al mínimo definido por el ángulo $\theta = 190,7^\circ$, en que el dato de energía que se obtuvo fue de -1068,583430 u.a.

Los mapas conformacionales elaborados con los datos de energía contenidos en la tabla 19 se representan en la Figura 22 que contiene los datos en vacío y la Figura 23 con los valores obtenidos con los cálculos en disolución.

La Tabla 20, contiene los valores de la matriz Z del mínimo global calculado en vacío, correspondiente al valor $\theta = 248,3^\circ$ (confórmero III). La matriz Z presentada en la Tabla 21 corresponde al mínimo global de los cálculos en disolución, que aparece para $\theta = 190,7^\circ$. En los cálculos en disolución, el mínimo se alcanza en el denominado confórmero II.

Los cálculos realizados con las conformaciones de los mínimos locales, se representan en la Tabla 22. Se reflejan los valores de los mínimos locales calculados en vacío y en disolución, y los incrementos de energía de cada confórmero respecto del mínimo global de cada tipo de cálculo. El análisis de la Tabla 22 indica que, en vacío, el confórmero III es el más estable. La diferencia de energía entre el confórmero IV y el

mínimo global es importante, de $17,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ lo cual indica que la preferencia conformacional del DBO-83 (B) en vacío es para el conformero III. En disolución, el comportamiento es análogo. La diferencia de energía entre el conformero I y el conformero II, que es el más estable, es tan elevada, de $25,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, que la preferencia conformacional es para el conformero II.

En las Figuras 24 y 25 se presentan las estructuras más estables en vacío y en disolución.

Tabla 19. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del DBO-83 (B), en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.

θ	VACÍO	DISOLUCIÓN
	Energía	Energía
360	34,50	27,08
330	36,60	33,73
300	17,00	44,44
270	50,29	54,63
240	39,81	40,20
210	34,49	28,55
180	35,75	
150	40,56	37,05
120	44,38	53,06
90	42,64	47,98
60	36,58	34,15
30	35,87	27,76
0	34,50	27,08
3,9	34,43	
206,5	34,43	
248,3	0,00	
11,5		25,82
167		0,51
190,7		0,00

Figura 22. Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de DBO-83 (B) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

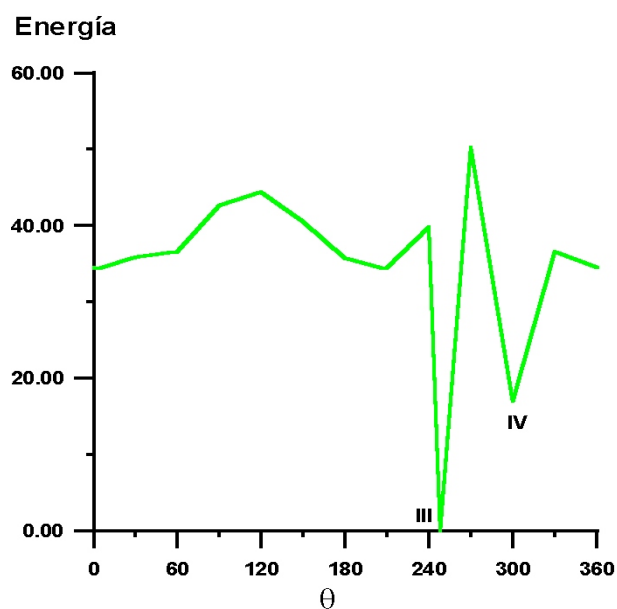


Figura 23. Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de DBO-83 (B) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

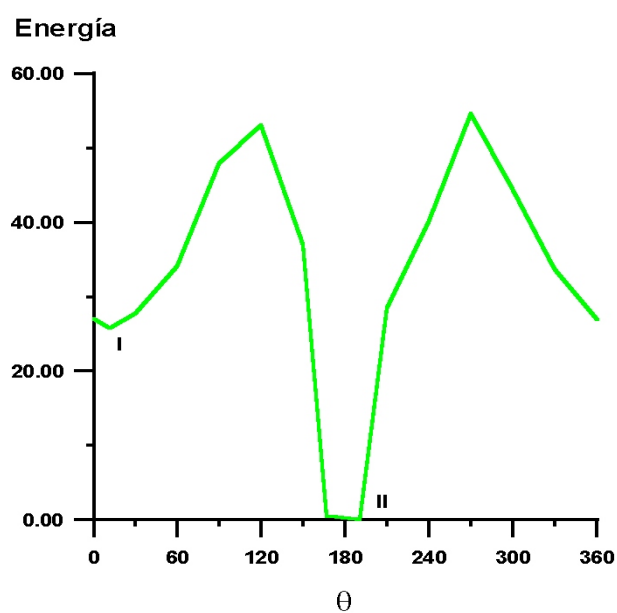


Tabla 20. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío del DBO-83 (B). En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,328					
3	c	2	1,409	1	123,9			
4	c	3	1,383	2	117,1	1	0,0	
5	c	4	1,405	3	117,3	2	0,0	
6	n	1	1,328	2	117,8	3	0,0	
7	cl	2	1,733	1	116,3	6	-180,0	
8	h	3	1,090	2	120,6	1	180,0	
9	h	4	1,090	3	122,4	2	180,0	
10	n	5	1,429	4	121,2	3	-179,9	
11	c	10	1,468	5	116,0	4	248,3	
12	c	11	1,570	10	113,3	5	-93,8	
13	c	12	1,541	11	113,9	10	-97,3	
14	c	13	1,557	12	104,8	11	85,2	
15	c	14	1,541	13	104,8	12	0,3	
16	c	10	1,468	11	113,2	15	23,2	
17	n	12	1,514	13	102,2	14	-29,0	
18	h	16	1,102	15	108,3	14	-24,3	
19	h	16	1,098	15	110,3	18	-116,9	
20	h	15	1,097	17	109,1	12	-167,6	
21	h	14	1,099	13	113,1	12	-120,4	
22	h	14	1,100	13	110,8	21	-120,0	
23	h	13	1,099	12	110,7	11	-37,0	
24	h	13	1,100	12	110,5	23	-118,3	
25	h	12	1,097	17	109,1	20	160,0	
26	h	11	1,102	12	108,3	13	23,8	
27	h	11	1,098	12	110,3	26	117,0	
28	h	17	1,026	12	111,0	15	-118,1	
29	h	17	1,082	12	111,8	28	-122,5	

Tabla 21. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución del DBO-83 (B). En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,348					
3	c	2	1,423	1	121,2			
4	c	3	1,376	2	117,7	1	1,7	
5	c	4	1,405	3	116,8	2	-0,3	
6	n	5	1,316	4	124,0	3	-0,7	
7	n	2	1,384	3	122,7	4	-177,4	
8	c	7	1,463	2	121,0	3	-16,1	
9	c	8	1,531	7	110,7	2	158,4	
10	n	9	1,512	8	107,4	7	60,1	
11	c	10	1,514	9	101,8	8	-71,5	
12	c	11	1,528	10	107,3	9	71,5	
13	c	11	1,54	10	101,6	9	-47,8	
14	c	13	1,556	11	104,9	10	29	
15	cl	5	1,763	4	119,6	3	179,9	
16	h	4	1,094	3	121,7	2	179,9	
17	h	3	1,092	2	122,7	7	2,6	
18	h	12	1,096	7	108,9	8	167,2	
19	h	12	1,109	7	111,1	8	-74,8	
20	h	11	1,1	10	109,0	9	190,7	
21	h	13	1,099	11	110,2	10	150,5	
22	h	13	1,1	11	110,1	10	-90,5	
23	h	14	1,099	9	110,3	10	-150,4	
24	h	14	1,1	9	110,0	10	90,7	
25	h	9	1,1	10	109,1	11	169,3	
26	h	8	1,098	9	106,7	10	-179,8	
27	h	8	1,11	9	109,7	10	-63,5	
28	h	10	1,042	9	110,9	8	170,3	
29	h	10	1,042	9	113,5	8	50,7	

Tabla 22. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada del DBO-83 (B). Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.

Confórmero	θ^a	ΔE^a	θ^b	ΔE^b
I			11,5	25,8
II			190,7	0,0
III	248,3	0,0		
IV	300,0	17,0		

a) Cálculos en vacío

b) Cálculos en disolución

Figura 24. Estructura del confórmero III del DBO-83 (B). Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.

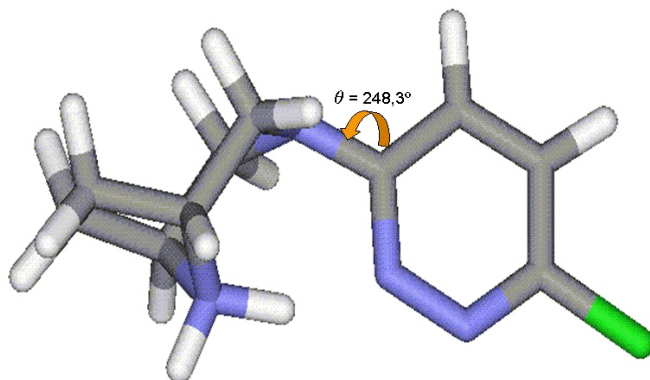
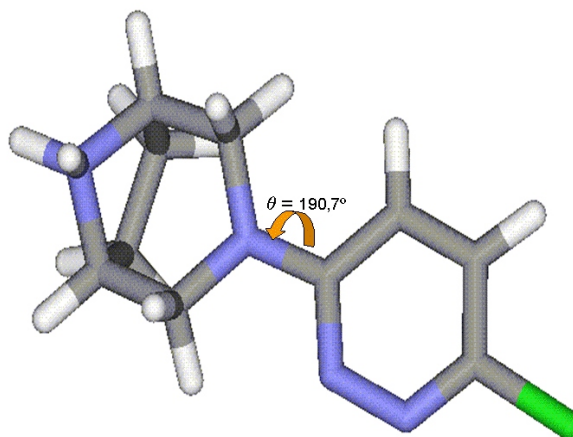


Figura 25. Estructura del conformero II del DBO-83 (B). Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.



5.3.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.

El cálculo de la función de partición conformacional y la aplicación del análisis poblacional realizados con la metodología presentada en el capítulo IV, permiten evaluar la población relativa de los diferentes conformeros. Los cálculos se han realizado en vacío y disolución y a temperatura fisiológica (37° C).

Los datos de poblaciones calculadas en vacío, se representan en la Figura 26. La Figura 27 es la representación correspondiente a los cálculos realizados en disolución. Tanto para los cálculos en vacío como para los cálculos en disolución, la población se concentra en un solo conformero. En vacío, el conformero III es el único poblado, mientras que en disolución el conformero II recoge la máxima población.

Las estructuras tridimensionales de los conformeros termodinámicamente más estables para el DBO-83 (B) tanto en vacío como en disolución, se recogen en las Figuras 24 y 25 respectivamente.

Figura 26. Mapa de población conformacional del DBO-83 (B), en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.

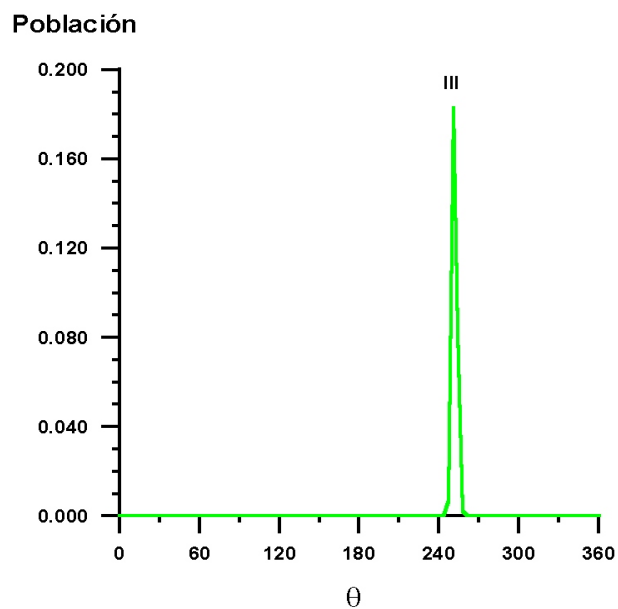
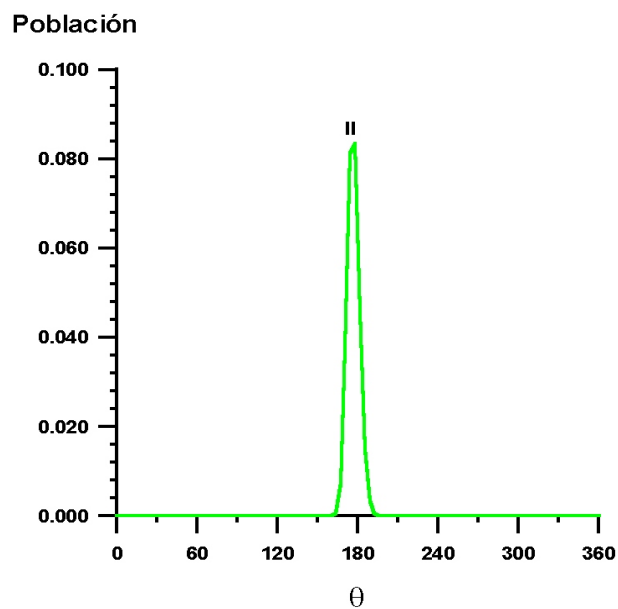


Figura 27. Mapa de población conformacional del DBO-83 (B), en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.



5.3.3.- Distancia internitrógeno.

Se han medido las distancias internitrógeno, r_{NN} , en todas las conformaciones del DBO-83 (B), tanto en vacío como en disolución, a fin de establecer cuales de ellas son aspirantes a ser activas. La Tabla 23 recoge las distancias obtenidas para cada valor del ángulo θ . En las figuras 28 y 29 se representan respectivamente, la distancia r_{NN} como una función del ángulo θ en vacío y en disolución. También se establece la comparación con los límites de distancias internitrógeno fijados en 6,1 Å (Abreo *et al.*, 1996) el máximo y 4,8 Å (Sheridan *et al.*, 1986) el mínimo para los agonistas nicotínicos. En vacío, el conformero III, que es el más poblado, presenta un valor de $r_{NN} = 3,8$ Å, fuera de dichos límites. Análogamente, en disolución, el conformero II con un valor de $r_{NN} = 6,3$, está por encima del límite superior.

Tabla 23. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ de la molécula de DBO-83 (B).

θ	Vacío	Disolución
0,0	5,6	5,7
3,9	5,6	
11,5		5,9
30,0	5,8	5,9
60,0	5,9	6,0
90,0	6,0	6,1
120,0	6,0	6,1
150,0	6,0	5,9
167,0		6,3
180,0	5,9	
190,7		6,3
206,5	5,6	
210,0	5,6	5,7
240,0	5,5	5,7
248,3	3,8	
270,0	5,3	5,7
300,0	4,0	4,3
330,0	4,9	5,2
360,0	5,6	5,7

Figura 28. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (B). Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los conformeros III y IV. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.

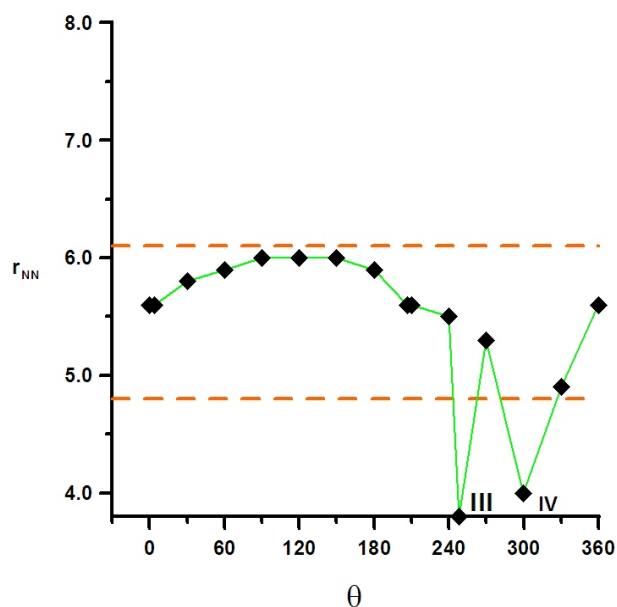
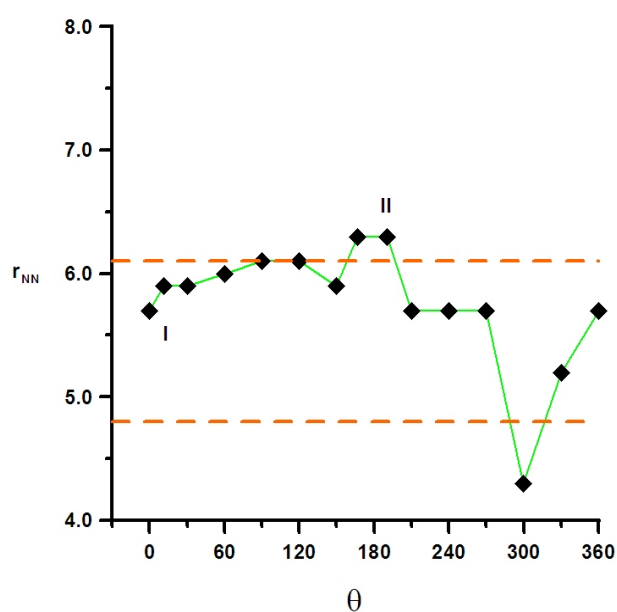


Figura 29. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (B). Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.



Tras la aplicación de la metodología de estudio que se sigue en este trabajo a la conformación bote de la molécula de DBO-83, se pueden analizar los resultados obtenidos. Se comprueba que solo dos de los conformeros reúnen condiciones para acoplarse con el receptor. Sin embargo, esos dos conformeros son distintos en vacío, donde el conformero III es el mínimo global de energía y el más poblado, y en disolución. El conformero II es el que, tras los cálculos realizados en disolución, aparece como el mínimo global y el más poblado. En todo caso, ambos conformeros, que podrían ser especies activas desde el punto de vista energético y poblacional, presentan valores para sus distancias internitrógeno que están fuera de los límites del intervalo de los valores teóricos.

5.4.- Estudio de la forma protonada de la molécula de DBO-83 (Silla).

Como se ha visto en el apartado anterior, el estudio de la molécula de DBO-83 en su conformación bote, ofrece comportamientos desiguales en vacío y en disolución, y parece estar impedida para activar el sitio receptor por las distancias internitrógeno que presentan las conformaciones activas. Aún así, es conocido el buen comportamiento de la molécula como analgésico nicotínico. Teniendo en cuenta que no disponemos de información *in vivo* relativa a diferencias de actividad de las dos formas moleculares, el estudio teórico de la molécula de DBO-83 en su conformación silla puede ofrecer más información acerca de las estructuras activas.

5.4.1.- Valores de energía.

La molécula de DBO-83 con la cabeza diazabicyclooctano dispuesta en conformación silla (DBO-83 (S) en este estudio), presenta características farmacológicas diferentes de la misma molécula con la cabeza diazabicyclooctano en conformación bote.

El análisis conformacional para esta forma molecular, se ha abordado utilizando la misma metodología que en el resto de las moléculas. Para el ángulo diedro identificado como dih11 en la matriz Z de la molécula de DBO-83 (S) que se refleja en el capítulo IV,

se ha considerado una malla de valores desde 0° hasta 360° , con incrementos de 30° . Tanto en vacío como en disolución, la geometría de entrada para todos los puntos de la malla se ha obtenido mediante una optimización completa de la molécula. Desde esta geometría de entrada, dejando fijo el valor de $\text{dih}11$, se han optimizado todos los puntos de la malla.

Con los valores de energía obtenidos, se representaron las hipersuperficies de energía potencial. En estas representaciones se observaron, tanto en vacío como en disolución, dos zonas de mínima energía, alrededor de los valores de θ de 180° y 330° . Para una mejor caracterización de estos mínimos locales, se definieron los confórmeros I para 180° y II para 330° . Tanto en vacío como en disolución, se optimizaron completamente los confórmeros, utilizando como geometrías de entrada las geometrías finales obtenidas tras la optimización de los correspondientes puntos de la malla y relajando completamente la molécula.

Los datos obtenidos para los mínimos locales, se incorporaron a los calculados previamente para realizar el análisis conformacional. En la Tabla 24 se representan todos los valores. La columna de datos en vacío, presenta los datos de energía referidos al mínimo global con valores de $\theta = 163,8^\circ$ y energía de $-1068,473012$ u.a. En la columna de energía de datos en disolución, los valores se refieren al mínimo global calculado cuyo valor se encontró para $\theta = 167,1^\circ$, que presentaba un valor de energía de $-1068,583481$ u.a..

Tabla 24. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del DBO-83 (S), en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.

θ	VACÍO	DISOLUCIÓN
	Energía	Energía
360	0,53	2,03
330	0,02	1,19
300	2,20	8,46
270	9,28	23,40
240	10,60	28,22
210	6,54	12,22
180	0,11	0,79
150	0,77	2,32
120	9,91	14,01
90	25,53	30,54
60	4,88	36,28
30	1,89	7,36
0	0,53	2,03
163,8	0,00	
328,5	0,02	
167,1		0,00
342,9		0,13

Los mapas conformacionales obtenidos con estos datos se reflejan en la Figura 30, que se ha elaborado con los valores calculados en vacío y la Figura 31 para cuya representación se han utilizado los valores calculados en disolución.

Tanto para los cálculos en vacío como en disolución, el mínimo global se alcanza en el confórmero I. La Tabla 25 presenta los valores de la matriz Z del mínimo global en vacío, que se alcanza para $\theta = 163,8^\circ$. El mínimo global en disolución se presenta para $\theta = 167,1^\circ$. La Tabla 26 contiene la matriz Z del mínimo global de los cálculos en disolución.

Figura 30. Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de DBO-83 (S) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

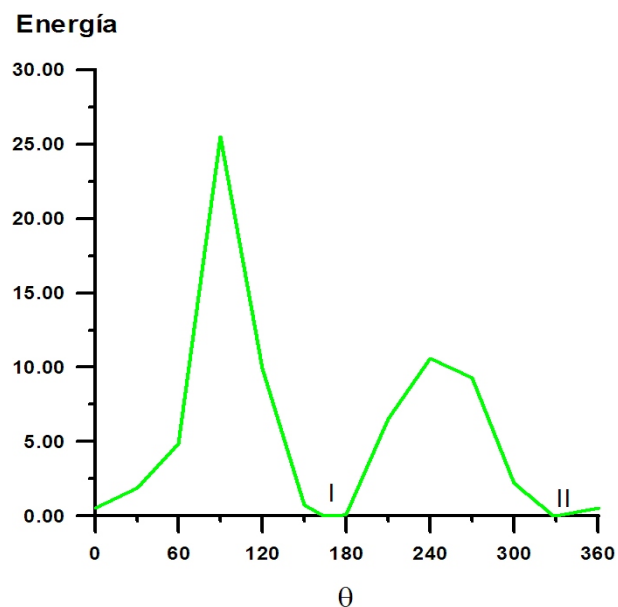


Figura 31. Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de DBO-83 (S) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

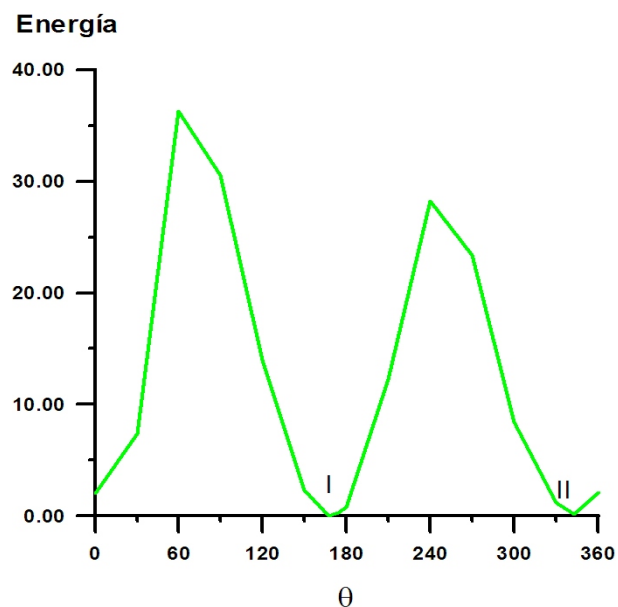


Tabla 25. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío del DBO-83 (S). En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,324					
3	c	2	1,406	1	123,5			
4	c	3	1,380	2	117,3	1	0,7	
5	c	4	1,413	3	117,0	2	0,3	
6	n	1	1,328	2	119,2	3	-0,5	
7	cl	2	1,741	1	116,8	6	179,9	
8	h	3	1,090	2	120,9	1	181,1	
9	h	4	1,090	3	119,9	2	180,6	
10	n	5	1,410	4	123,4	3	177,2	
11	c	10	1,462	5	117,2	4	163,8	
12	c	11	1,526	10	110,4	5	-200,9	
13	c	12	1,538	11	114,0	10	-49,1	
14	c	13	1,557	12	105,2	11	84,6	
15	c	14	1,540	13	105,3	12	0,2	
16	c	10	1,452	11	114,7	15	-27,0	
17	n	12	1,533	13	101,3	14	-29,3	
18	h	16	1,098	15	106,6	14	-70,4	
19	h	16	1,113	15	109,6	18	-115,2	
20	h	15	1,098	17	108,8	12	-169,2	
21	h	14	1,098	13	112,3	12	-119,4	
22	h	14	1,100	13	111,3	21	-120,6	
23	h	13	1,098	12	109,8	11	-36,5	
24	h	13	1,100	12	110,6	23	-118,6	
25	h	12	1,098	17	108,6	20	162,6	
26	h	11	1,097	12	109,7	13	70,4	
27	h	11	1,112	12	109,9	26	116,4	
28	h	17	1,028	12	111,5	15	-118,4	
29	h	17	1,029	12	112,6	28	239,3	

Tabla 26. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución del DBO-83 (S). En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n						
2	c	1	1,316				
3	c	2	1,405	1	124,1		
4	c	3	1,376	2	116,8	1	0,8
5	c	4	1,423	3	117,7	2	0,3
6	n	1	1,335	2	119,6	3	-0,5
7	cl	2	1,763	1	116,3	6	180,1
8	h	3	1,094	2	121,5	1	181,1
9	h	4	1,092	3	119,5	2	180,5
10	n	5	1,384	4	122,7	3	177,4
11	c	10	1,468	5	118,8	4	167,1
12	c	11	1,527	10	110,9	5	-202,1
13	c	12	1,539	11	113,5	10	-51,5
14	c	13	1,556	12	104,9	11	85,6
15	c	14	1,540	13	105,0	12	0,4
16	c	10	1,463	11	115,1	15	-25,3
17	n	12	1,514	13	101,6	14	-29,2
18	h	16	1,098	15	106,6	14	-68,6
19	h	16	1,110	15	109,7	18	-116,4
20	h	15	1,100	17	109,1	12	-169,2
21	h	14	1,099	13	112,6	12	-119,6
22	h	14	1,100	13	111,1	21	-121,2
23	h	13	1,099	12	110,2	11	-35,9
24	h	13	1,100	12	110,1	23	-119,0
25	h	12	1,100	17	109,0	20	162,5
26	h	11	1,096	12	108,8	13	68,2
27	h	11	1,109	12	109,8	26	117,2
28	h	17	1,042	12	111,0	15	-118,2
29	h	17	1,042	12	113,4	28	240,4

La Tabla 27, que contiene los valores de los ángulos de los mínimos locales calculados en vacío y en disolución y los incrementos de energía de los distintos cónfómeros respecto del mínimo global de cada cálculo, ofrece información acerca de la interconversión de los cónfómeros. En dicha tabla, se encuentra que tanto para vacío como para disolución las diferencias energéticas entre los cónfómeros son

despreciables. Aún cuando esto podría indicar la interconversión permanente de ambas estructuras conformacionales, la barrera del doble pozo de energía es alta (ver Figuras 30 y 31), lo que obstaculiza dicha interconversión.

Tabla 27. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada del DBO-83 (S). Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.

Confórmero	θ^a	ΔE^a	θ^b	ΔE^b
I	163,8	0,0	167,1	0,0
II	328,5	0,02	342,9	0,13

- a) Cálculos en vacío
- b) Cálculos en disolución

Las estructuras más estables en vacío y en disolución, se recogen en las figuras 32 y 33.

Figura 32. Estructura del confórmero I del DBO-83 (S). Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.

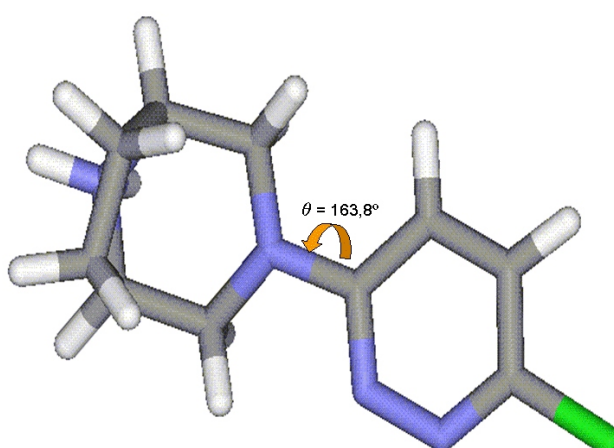
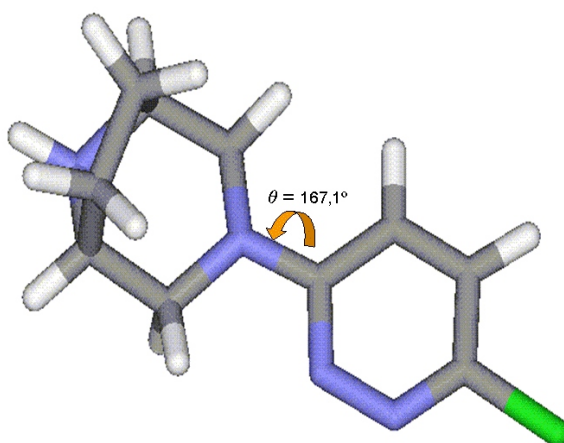


Figura 33. Estructura del conformero I del DBO-83 (S). Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.



5.4.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.

Utilizando la metodología indicada en el capítulo IV, se ha realizado el análisis poblacional para la molécula de DBO-83 (S) a temperatura fisiológica (37°).

Las poblaciones relativas calculadas en vacío, se representan en la Figura 34. Con las obtenidas mediante los valores calculados en disolución, se ha realizado la Figura 35. El estudio de ambas figuras permite comprobar como la molécula presenta poblaciones muy similares tanto en vacío como en disolución. En ambos casos, la población se reparte entre los conformeros I y II de manera prácticamente equivalente.

Los conformeros termodinámicamente más estables para el DBO-83(S), se representan en las Figuras 32 (vacío) y 33 (disolución).

Figura 34. Mapa de poblaciones conformacionales del DBO-83 (S), en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.

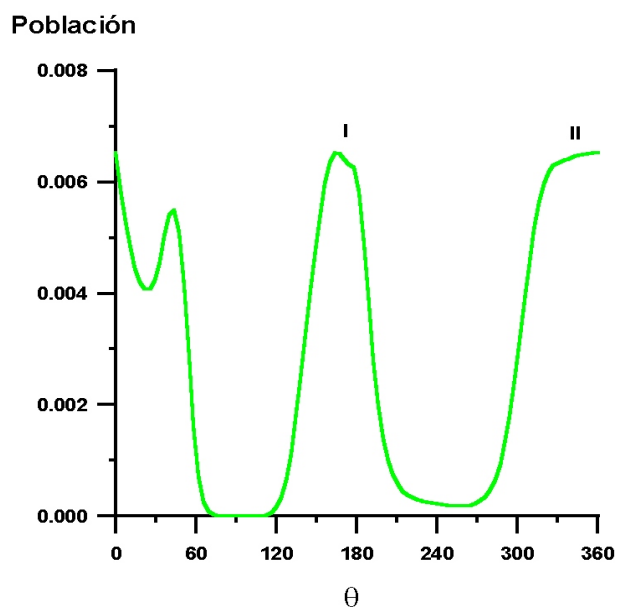
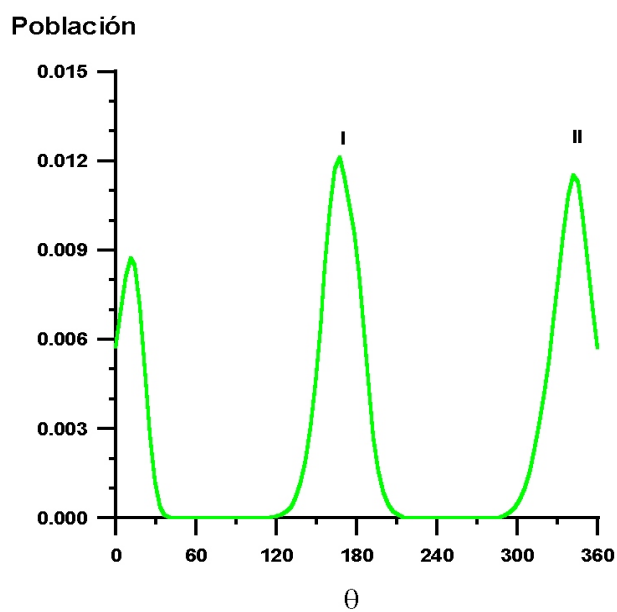


Figura 35. Mapa de poblaciones conformacionales del DBO-83 (S), en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.



5.4.3.- Distancia internitrógeno.

Los valores de la distancia internitrógeno r_{NN} en la molécula de DBO-83 (S), para todos los conformeros en vacío y en disolución, se recogen en la Tabla 28. Con los datos contenidos en la columna de vacío, y como función del ángulo θ , se ha elaborado la Figura 36. La representación correspondiente a los valores de la columna de disolución, se presenta en la Figura 37.

En ambas figuras, se puede comprobar como los conformeros I y II, que son los únicos poblados, presentan valores de r_{NN} por encima del límite superior de 6,1 Å (Abreo *et al.*, 1996) establecido para los agonistas nicotínicos.

Tabla 28. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ en la molécula de DBO-83 (S).

θ	Vacío	Disolución
0,0	6,3	6,3
30,0	6,1	6,1
60,0	5,8	6,3
90,0	6,4	6,4
120,0	6,3	6,3
150,0	6,3	6,3
163,8	6,3	
167,1		6,3
174,2		6,3
174,8	6,2	
180,0	6,2	6,3
210,0	6,1	6,3
240,0	5,9	6,0
270,0	6,0	6,1
300,0	6,1	6,2
328,5	6,2	
330,0	6,2	6,3
342,9		6,3
360,0	6,3	6,3

Figura 36. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (S). Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.

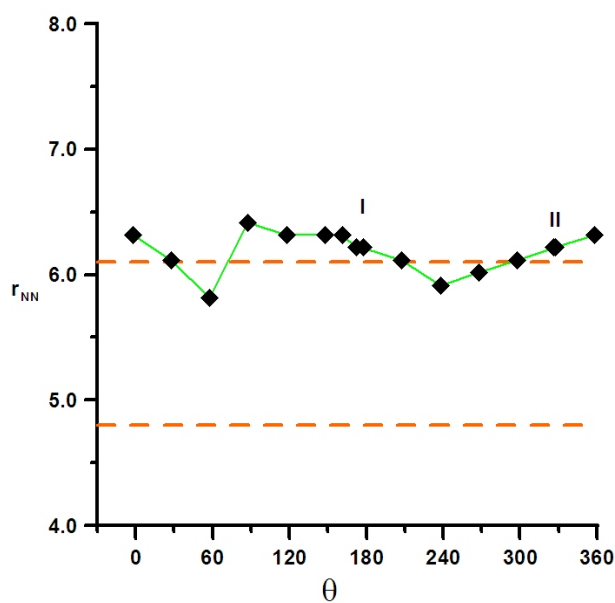
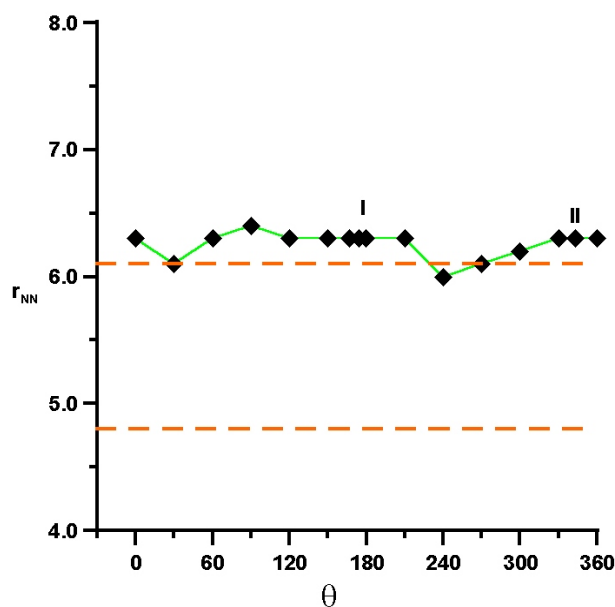


Figura 37. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (S). Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.



El comportamiento de la molécula de DBO-83 en su conformación silla, al contrario que el de la misma molécula en disposición bote, es completamente homogéneo. El conformero I es el mínimo global tanto para cálculos de energía en vacío como en disolución. En cuanto al análisis poblacional, dicho conformero aparece poblado tanto en vacío como en disolución. Sin embargo, resulta notable el hecho de que el conformero II presente incrementos energéticos prácticamente despreciables respecto del conformero I, tanto en vacío como en disolución. En el análisis poblacional, también el conformero II está bastante poblado. Teniendo en cuenta las barreras energéticas que los separan, que hacen improbable su interconversión, se podría hablar de dos especies potencialmente activas en la molécula de DBO-83 (S). Éstas dos especies presentan valores de las distancias internitrógeno ligeramente por encima del límite superior admitido para los agonistas nicotínicos.

5.5.- Estudio de la forma protonada de la molécula de nicotina.

La última molécula analizada en este estudio, lo es por una cuestión evidente: todos los estudios relacionados con el comportamiento de agonistas nicotínicos tienen su origen en los trabajos realizados con la nicotina. El análisis conformacional y poblacional de la molécula de nicotina, completa la parte del estudio individual de las moléculas elegidas para identificar el mecanismo de interacción estructural de éstos agonistas nicotínicos con la subunidad $\alpha 4\beta 2$ del nAChR.

5.5.1.- Valores de energía.

La molécula de nicotina es el referente de los estudios realizados en relación con el establecimiento del farmacoforo nicotínico. En este trabajo, se ha aplicado la metodología expuesta en el capítulo IV para su estudio. Para la obtención de los datos de energía con los que elaborar los mapas conformacionales, se ha utilizado el ángulo diedro denominado dih11 en la matriz Z de la molécula de nicotina reflejada en el capítulo IV. Para dicho ángulo, se ha definido una malla de valores que lo hacen variar desde

0° hasta 360° en incrementos de 30°. Partiendo de la geometría final obtenida optimizando totalmente la molécula, se ha calculado la energía para cada uno de los puntos de la malla, tanto en vacío como en disolución.

Tanto la hipersuperficie de energía potencial en vacío, como la de disolución, presentan dos zonas de mínima energía, próximas a los 120° y 300°. Para identificar con más exactitud estos mínimos locales, se han definido el confórmero I como el próximo al valor 120° de θ y el confórmero II el de la zona de 300° de θ . El cálculo realizado sobre dichos confórmeros relajando completamente la molécula a partir de la geometría final alcanzada al optimizar el correspondiente punto de la malla, ha proporcionado dos mínimos locales, tanto en vacío como en disolución. El mínimo global, en vacío, se alcanza para $\theta = 287,3^\circ$ con una energía calculada de -499,387302 u.a. En disolución, el mínimo global se alcanza para $\theta = 300,0^\circ$ y la energía obtenida es de -499,477825 u.a..

En la Tabla 29 se reflejan los resultados de todos los cálculos realizados. Las columnas de datos en vacío y en disolución, recogen los incrementos de energía respecto del mínimo global obtenido con cada tipo de cálculo.

Con la información contenida en la Tabla 29, que incluye todos los puntos de la malla y los mínimos locales, se han elaborado los mapas conformacionales. La Figura 38 representa la hipersuperficie de energía potencial de las conformaciones calculadas en vacío. La Figura 39 contiene la hipersuperficie de energía potencial obtenida con los cálculos en disolución.

Tabla 29. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada de la nicotina, en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.

θ	VACÍO	DISOLUCIÓN
	Energía	Energía
360	16,81	15,04
330	10,29	5,61
300	1,12	0,00
270	1,96	2,32
240	10,71	13,40
210	12,42	17,23
180	12,52	14,42
150	6,41	5,21
120	0,34	1,49
90	3,43	3,85
60	13,70	15,73
30	16,30	17,40
0	16,81	15,04
113,9	0,09	
287,3	0,00	
119,8		1,50
296,1		0,23

Tanto la optimización en vacío ($\theta = 287,3^\circ$), como la realizada en disolución ($\theta = 300,0^\circ$), proporcionan el dato de que el confórmero II es el más estable. La Tabla 30 contiene la matriz Z del mínimo global en vacío. En la Tabla 31 se refleja la matriz Z del mínimo global obtenido para los cálculos en disolución.

Figura 38. Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de nicotina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

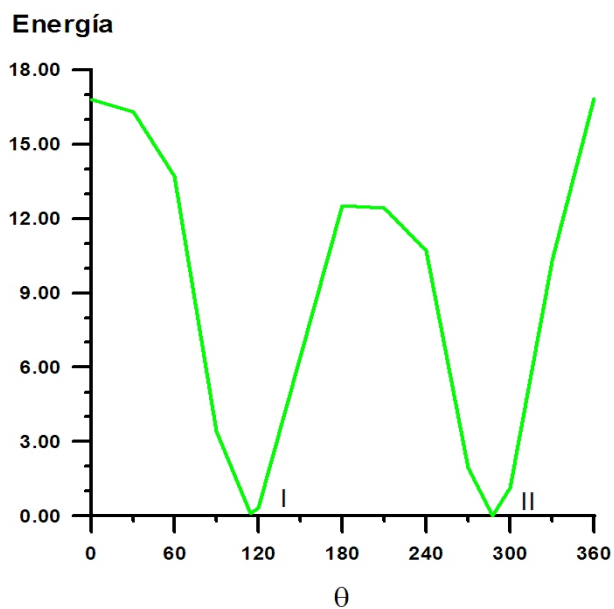


Figura 39 Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de nicotina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .

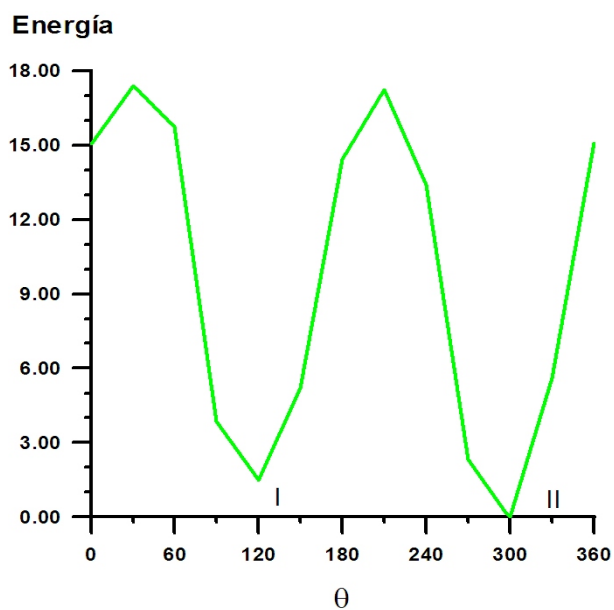


Tabla 30. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío de la nicotina. En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,339					
3	c	2	1,401	1	123,5			
4	c	3	1,392	2	118,6	1	-0,1	
5	c	4	1,406	3	118,9	2	0,4	
6	c	1	1,335	2	117,3	3	-0,1	
7	h	2	1,094	1	116,1	6	180,0	
8	h	3	1,091	2	120,4	1	-179,4	
9	h	4	1,094	3	119,6	2	-178,9	
10	h	6	1,097	1	115,8	2	179,2	
11	c	5	1,506	4	122,8	3	179,8	
12	n	11	1,563	5	111,2	4	287,3	
13	c	12	1,534	11	107,3	5	148,6	
14	c	13	1,532	12	105,2	11	5,2	
15	c	14	1,532	13	103,7	12	-28,8	
16	c	12	1,495	13	114,5	14	-121,7	
17	h	11	1,100	15	109,4	14	72,0	
18	h	16	1,098	12	108,6	11	-65,9	
19	h	16	1,098	12	109,2	18	-120,0	
20	h	16	1,098	12	108,8	18	119,9	
21	h	13	1,097	12	108,6	11	128,3	
22	h	13	1,098	12	107,1	21	117,2	
23	h	14	1,098	13	111,3	12	-151,1	
24	h	14	1,101	13	110,4	23	-119,4	
25	h	15	1,102	14	111,1	13	-77,0	
26	h	15	1,099	14	113,3	25	-121,1	
27	h	12	1,026	13	108,1	16	-119,3	

Tabla 31. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución de la nicotina. En negrita se ha marcado el valor de θ .

1	n							
2	c	1	1,343					
3	c	2	1,400	1	123,5			
4	c	3	1,394	2	118,7	1	0,0	
5	c	4	1,403	3	118,8	2	0,5	
6	c	1	1,341	2	117,1	3	-0,6	
7	h	2	1,098	1	116,3	6	179,6	
8	h	3	1,094	2	120,3	1	-179,8	
9	h	4	1,098	3	119,9	2	-179,5	
10	h	6	1,099	1	116,3	2	-179,7	
11	c	5	1,508	4	123,0	3	-178,7	
12	n	11	1,535	5	113,3	4	300(-60,0)	
13	c	12	1,525	11	105,4	5	166,2	
14	c	13	1,543	12	105,8	11	21,1	
15	c	14	1,539	13	105,4	12	-5,3	
16	c	12	1,491	13	113,9	14	-147,5	
17	h	11	1,105	15	109,6	14	68,1	
18	h	16	1,098	12	108,5	11	-59,6	
19	h	16	1,098	12	108,7	18	-119,9	
20	h	16	1,097	12	109,0	18	120,2	
21	h	13	1,098	12	107,4	11	99,6	
22	h	13	1,098	12	107,2	21	117,0	
23	h	14	1,099	13	111,5	12	-127,3	
24	h	14	1,100	13	109,5	23	-119,4	
25	h	15	1,103	14	111,3	13	-88,3	
26	h	15	1,099	14	113,1	25	-121,7	
27	h	12	1,047	13	106,5	16	-119,1	

La Tabla 32 contiene los valores del ángulo θ obtenidos para los confórmeros I y II tras la optimización total tanto en vacío como en disolución. En las correspondientes columnas de energía se anotan los incrementos de energía de cada uno de los confórmeros respecto del mínimo global. El confórmero II es el más estable, tanto en vacío como en disolución, si bien en ambos casos las diferencias energéticas son despreciables. Aún así, en las Figuras 38 y 39 se puede observar que la barrera de

energía entre ambos conformeros es suficientemente alta para suponer que la interconversión entre los dos conformeros no está favorecida.

La figura 40 se corresponde con la geometría del conformero II obtenida calculando en vacío, y la Figura 41 con la geometría del conformero II optimizado en disolución.

Tabla 32. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada de la nicotina. Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.

Conformero	θ^a	ΔE^a	θ^b	ΔE^b
I	113,9	0,1	119,8	1,5
II	287,3	0,0	300,0	0,0

- a) Cálculos en vacío
- b) Cálculos en disolución

Figura 40. Estructura del conformero II de la nicotina. Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno.

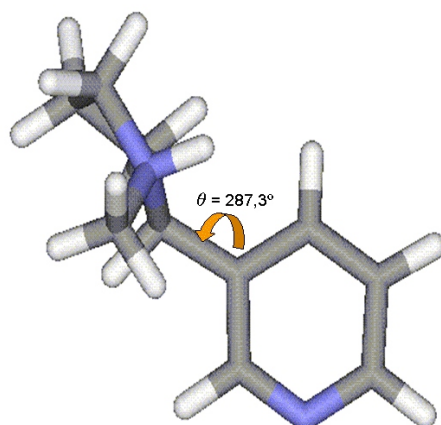
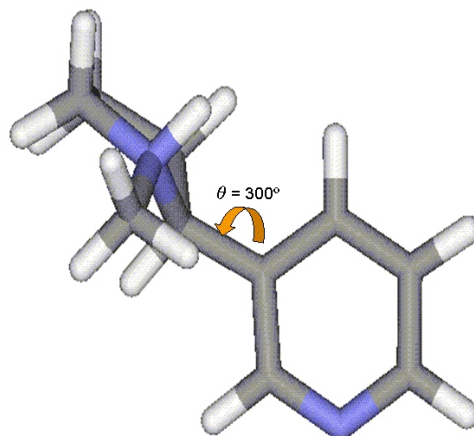


Figura 41. Estructura del conformero II de la nicotina. Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno.



5.5.2.- Estabilidad termodinámica de los conformeros.

La población relativa de los conformeros se ha calculado a temperatura fisiológica (37 °C) con el procedimiento que se describe en el capítulo IV, con todas las conformaciones de la molécula de nicotina calculadas en vacío y en disolución.

Con los valores de poblaciones relativas obtenidos mediante los cálculos en vacío, se obtiene la representación contenida en la Figura 42. En la Figura 43 se representan las poblaciones obtenidas a partir de los cálculos en disolución. Se puede comprobar como, en vacío, ambos conformeros aparecen poblados de manera significativa. También en disolución tanto el conformero I como el conformero II aparecen poblados. En disolución el conformero II parece presentar un incremento de población respecto del conformero I.

El conformero II, que es el mínimo global de la molécula de nicotina, tanto en vacío como en disolución, aparece también como más poblado, termodinámicamente más estable. La Figura 40 representa la estructura del conformero II en vacío. En la Figura 41 está representada la estructura del conformero II en disolución.

Figura 42. Mapa de población conformacional de la nicotina, en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.

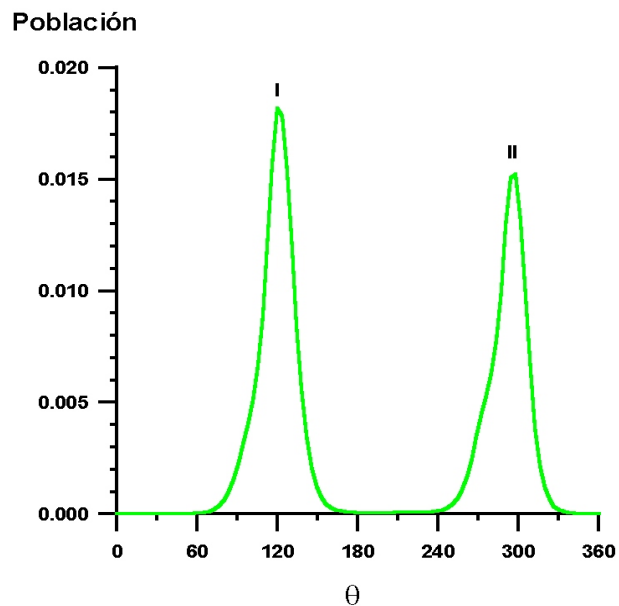
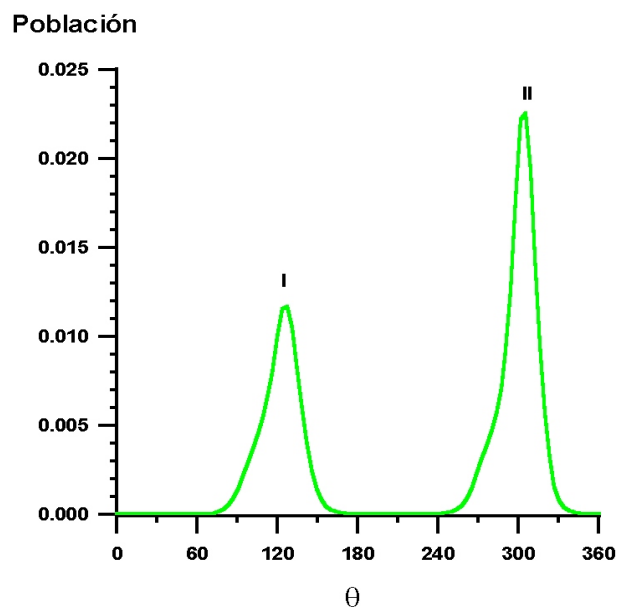


Figura 43. Mapa de población conformacional de la nicotina, en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados.



5.5.3.- Distancia internitrógeno.

El estudio de la distancia internitrógeno, r_{NN} , en la molécula de nicotina presenta un interés especial dada la importancia de dicho parámetro en relación con el farmacoforo del receptor de los agonistas nicotínicos. En la Tabla 33 se presenta el valor de la distancia r_{NN} de todas las conformaciones de la nicotina, calculadas en vacío y en disolución. Los valores de r_{NN} medidos en vacío se representan en la Figura 44 como una función del ángulo θ . En la Figura 45 se recoge la representación de los valores de r_{NN} en disolución, como una función del ángulo θ . En concordancia con los estudios realizados en secciones anteriores para la molécula de nicotina, se puede ver como solo el confórmero II está dentro del intervalo de valores de r_{NN} encontrados para los agonistas nicotínicos, 4,8 Å (Sheridan *et al.*, 1986) y 6,1 Å (Abreo *et al.*, 1996). Por lo tanto, solo ésta conformación sería candidata a ser conformación activa para enlazarse con el receptor nicotínico.

Tabla 33. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ de la molécula de nicotina.

θ	Vacío	Disolución
0,0	5,0	5,0
30,0	4,9	5,0
60,0	4,8	4,8
90,0	4,5	4,6
113,9	4,4	
119,8		4,4
120,0	4,4	5,8
150,0	4,3	4,4
180,0	4,3	4,3
210,0	4,3	4,3
240,0	4,4	4,5
270,0	4,6	4,6
287,3	4,7	
296,1		4,8
300,0	4,8	4,8
330,0	4,9	4,9
360,0	5,0	5,0

Figura 44. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la molécula de nicotina. Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.

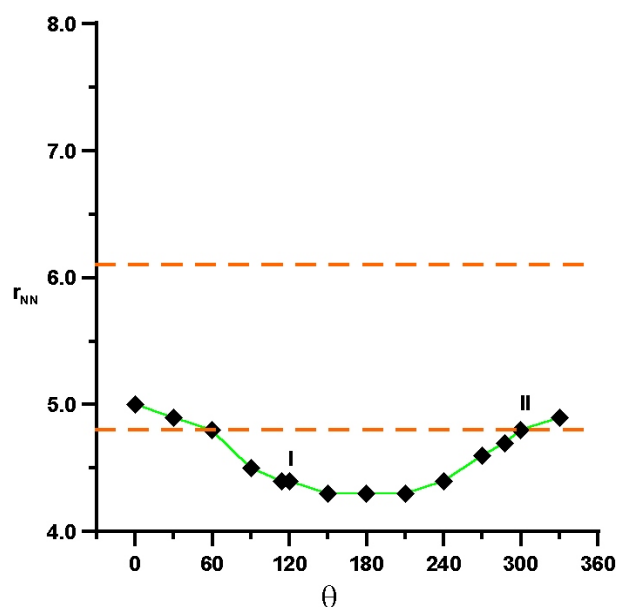
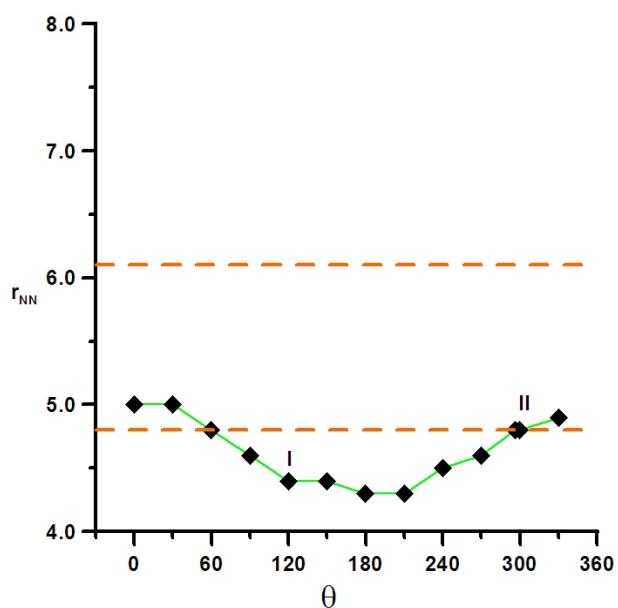


Figura 45. Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la molécula de nicotina. Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos.



La conclusión más evidente del estudio individual realizado con la molécula de nicotina es que presenta un comportamiento muy similar al de la molécula de DBO-83 (S): dos confórmeros no interconvertibles, que presentan entre sí incrementos mínimos de energía y que están suficientemente poblados para ser considerados especies activas. También en este caso las distancias internitrógeno no aparecen de forma clara como pertenecientes al intervalo de valores teóricos para los agonistas nicotínicos.

5.6.- Estudio comparativo de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 (B), DBO-83 (S) y nicotina.

El estudio individual de las moléculas en este trabajo, permite identificar los confórmeros de cada una de ellas que presentan más probabilidades de ser la especie activa. Realizar un estudio comparativo de los datos individuales obtenidos, aporta información interesante acerca de comportamientos comunes, pero solamente con datos de energía, población y distancias internitrógeno, no se pueden sacar conclusiones importantes acerca del comportamiento de la molécula-ligando en el entorno del receptor. La obtención de los índices de semejanza entre los confórmeros más estables de las moléculas en estudio, aporta información estructural de interés para la identificación de los grupos farmacofóricos.

5.6.1.- Valores de energía.

Estudiando los confórmeros más estables de cada una de las moléculas se comprueba como, tanto para los cálculos en vacío como en disolución, en el caso de la nicotina y el DBO-83 (S), las diferencias energéticas entre dichos confórmeros son casi inexistentes, si bien son ligeramente más altas en disolución. La epibatidina presenta valores poco importantes, en vacío, de las diferencias energéticas entre los confórmeros, con valores aún más bajos para los cálculos en disolución. La molécula de DBO-83 (B) en cambio presenta valores altos, de 17-37 kJ mol⁻¹ en vacío y de 25-45 kJ mol⁻¹ en disolución. En cuanto al ABT-594, solo el confórmero V presenta diferencias energéticas

razonablemente bajas, con valores de 12,2 y 4,5 kJ mol⁻¹ en vacío y en disolución respectivamente.

5.6.2.- Estabilidad termodinámica de los confórmeros.

El análisis de las poblaciones de los distintos confórmeros en cada una de las moléculas permite apreciar que en la molécula de ABT-594, tanto en vacío como en disolución, el único confórmero que aparece poblado es el III. En la molécula de epibatidina los resultados en vacío y en disolución son bastante diferentes. En vacío solo aparece poblado el confórmero II mientras que en disolución todos los confórmeros aparecen con poblaciones significativas. El DBO-83 (B), presenta comportamientos claramente diferentes en vacío y en disolución, apareciendo poblados solo el confórmero III en vacío y el confórmero II en disolución. En el DBO-83 (S), tanto en vacío como en disolución, la población se reparte entre los confórmeros I y II. En la nicotina, tanto en vacío como en disolución los dos confórmeros estudiados presentan poblaciones apreciables.

5.6.3.- Distancia internitrógeno.

La Tabla 34 recoge información de los valores de las distancias internitrógeno en los confórmeros más estables de las distintas moléculas estudiadas. En dicha tabla se observa que en la molécula de ABT-594 los valores de las distancias en vacío son menores que los calculados en disolución. En vacío los confórmeros III, V y VI presentan distancias internitrógeno que están dentro del intervalo de valores de r_{NN} encontrados para los agonistas nicotínicos, 4,8 Å (Sheridan *et al.*, 1986) y 6,1 Å (Abreo *et al.*, 1996). Para los confórmeros optimizados en disolución, solo el confórmero VI presenta un valor dentro del intervalo. En la molécula de epibatidina solo el valor de distancia internitrógeno del confórmero II optimizado en vacío está fuera del intervalo. Los cálculos en vacío para la molécula de DBO-83 (B) proporcionan valores para r_{NN} por debajo del mínimo. El confórmero I optimizado en disolución presenta un valor (5,9 Å) compatible con los intervalos establecidos en los estudios citados. La molécula de DBO-83 (S) presenta valores por encima del límite máximo en todos sus confórmeros, tanto en vacío como en

disolución. En cuanto a la nicotina, solo el confórmero II calculado en disolución alcanza el valor mínimo del intervalo.

Tabla 34. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los confórmeros más estables de las moléculas en estudio.

Molécula	Confórmero	Vacío	Disolución
ABT-594	I	4,1	4,7
	II	6,2	7,0
	III	6,0	6,2
	IV	7,3	7,3
	V	6,0	6,4
	VI	5,2	6,0
Epibatidina	I		4,8
	II	4,5	
	III		5,7
	IV	5,3	
DBO-83 (B)	I		5,9
	II		6,3
	III	3,8	
	IV	4,0	
DBO-83 (S)	I	6,3	6,3
	II	6,2	6,3
Nicotina	I	4,4	4,4
	II	4,7	4,8

5.6.4.- Semejanza.

El estudio de la semejanza existente entre los confórmeros más estables, en vacío y en disolución, de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 (B), DBO-83 (S) y nicotina, se ha realizado utilizando el programa Hex4 (Ritchie, 2003). Los valores de los índices de semejanza obtenidos se presentan en la Tabla 35 (mínimos calculados en vacío) y en la Tabla 36 (mínimos calculados en disolución).

En la elaboración de las tablas de semejanza, se han utilizado los distintos mínimos que presentaban las moléculas, que no estuviesen alejados energéticamente más de una Kcal. Esto justifica el que en la tabla de índices elaborada con los confórmeros calculados en disolución, aparezca una especie más que en la tabla que recoge los valores obtenidos comparando los confórmeros calculados en vacío.

De todas las especies en estudio, la molécula farmacológicamente más activa es la de ABT-594 (0,037 nM). Los valores obtenidos en secciones anteriores sugieren una elevada estabilidad para el confórmero III, tanto en vacío como en disolución. Así, se puede centrar el análisis de resultados del estudio de semejanza en el comportamiento del resto de confórmeros al compararlos con él.

En vacío los valores obtenidos para los índices de semejanza en la comparación del confórmero III del ABT-594 con los dos confórmeros de la epibatidina, son números negativos inferiores a -950. Esta semejanza es bastante alta y un valor razonable teniendo en cuenta que la actividad farmacológica de la epibatidina es también elevada (0,042 nM). El más semejante es el confórmero II de la epibatidina, en cambio, la semejanza entre el ABT-594 y los dos confórmeros de la nicotina es inferior a la que presenta con la epibatidina. La actividad farmacológica de la nicotina es de 1 nM. El DBO-83, sobre todo en su conformación silla, presenta valores absolutos significativamente altos del índice de semejanza con el confórmero III del ABT-594, si bien su actividad farmacológica es muy baja (4 nM). Lo más significativo, en todo caso, es que la epibatidina presenta una semejanza muy alta con el resto de los confórmeros estudiados.

El análisis de los valores de los índices obtenidos comparando los confórmeros optimizados en disolución del resto de las moléculas con el confórmero III del ABT-594, confirma el comportamiento de semejanza en vacío con la molécula de epibatidina. Los dos confórmeros de la molécula de nicotina se alejan de manera significativa de los valores alcanzados en vacío, mientras que los valores de los índices de comparación con todos los confórmeros de la molécula de DBO-83 son similares a los obtenidos en vacío. La epibatidina (sobre todo el confórmero III), sigue presentando valores muy negativos de los índices de semejanza con el resto de compuestos.

El trabajo de comparación de los valores obtenidos en el estudio individual de las

moléculas llevado a cabo en este apartado, no aporta información suficiente para obtener conclusiones claras en el mecanismo de enlace de las moléculas con el sitio receptor. El dato de distancia internitrógeno no parece ofrecer información concluyente acerca de la actividad de las distintas formas moleculares. El estudio de índices de semejanza, por otra parte, tampoco permite obtener información que justifique claramente la interacción con el receptor.

La aparición de nuevas técnicas (o las mejoras sustanciales de otras ya existentes), la mayor potencia de los recursos informáticos, y la aparición de nuevos datos relativos al receptor nicotínico, han supuesto también nuevos caminos de obtención de información para este trabajo. El uso de las técnicas de *molecular docking* aplicadas a los ligandos en estudio, permite la obtención de información de relevancia.

5.7.- Estudio de acoplamiento molecular (*molecular docking*) con el subtipo $\alpha 4\beta 2$ del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) de las moléculas de ABT-594, epibatidina, DBO-83 (B), DBO-83 (S) y nicotina.

La realización del estudio de *molecular docking* sobre las moléculas consideradas en el presente trabajo se ha planteado:

- * Seleccionando la estructura más probable de cada ligando en disolución antes de interaccionar con el receptor.
- * Identificando dónde se enlazan las moléculas. O, lo que es lo mismo, el sitio activo en el receptor macromolecular.
- * De las distintas estructuras enlazadas que se pueden obtener para cada ligando, se selecciona aquella con una orientación común a la del resto de los ligandos.
- * Para cada molécula, la estructura enlazada se compara con los conformeros previamente estudiados desde el punto de vista energético y poblacional.

Para el análisis del acoplamiento de los ligandos en estudio con la subunidad $\alpha 4\beta 2$ del receptor nAChR, se ha utilizado la estructura 10ED.PDB. De esta estructura, se han seleccionado las subunidades de interés, restringiendo el tratamiento a las hélices A, B y C, y a la zona de las mismas correspondiente al subtipo $\alpha 4\beta 2$. El programa

Autodock se ha utilizado para obtener la disposición estructural de cada uno de los ligandos al interaccionar con el receptor. Realizados todos los cálculos, todos los agonistas nicotínicos considerados presentan estructuras con una orientación similar en el mismo sitio receptor.

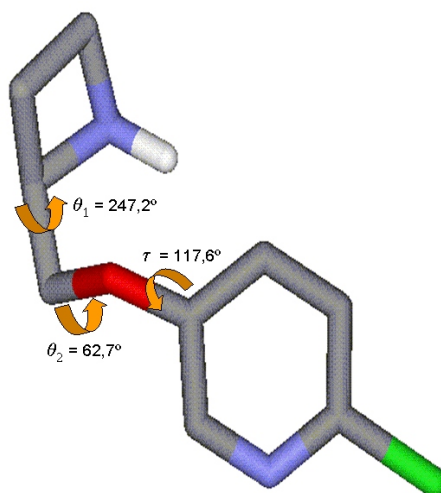
A continuación se presentan las estructuras de todos los agonistas una vez enlazados con el sitio receptor.

5.7.1.- Molécula de ABT-594

La aplicación del *molecular docking* a la molécula de ABT-594, presenta dificultades adicionales respecto del resto de las moléculas en estudio, debido al hecho de que en su conformación están presentes tres ángulos de torsión.

Una vez optimizada la molécula de ABT-594 a nivel B3LYP/cc-pVDZ, se utilizó como ligando en el programa Autodock para estudiar su interacción con el receptor nicotínico (10U.PDB). La conformación que se obtuvo tras el cálculo, se presenta en la Figura 46.

Figura 46. Estructura adoptada por la molécula de ABT-594 para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro; Rojo: Oxígeno.

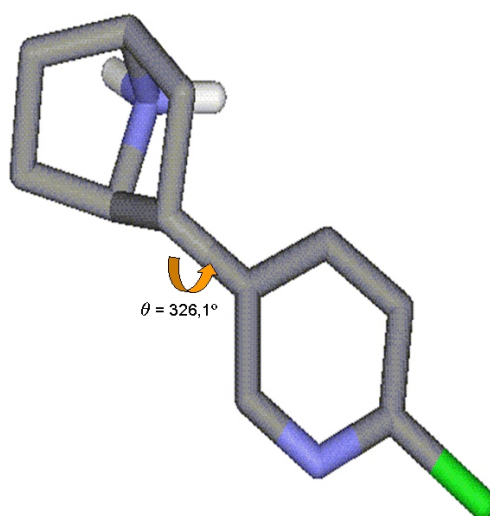


La estructura resultante presenta los valores de los ángulos diedros $\theta_1 = 247,2$, $\theta_2 = 62,7$ y $\tau = 117,6$. Al obtener valores de los ángulos tan alejados de los mínimos calculados para la molécula en el análisis conformacional, se optimizó completamente la geometría procedente de la aplicación de Autodock. El resultado de esta optimización produjo el mínimo global en vacío obtenido en el estudio de energía de la molécula de ABT-594 (Confórmero III). Dado que los métodos de optimización utilizados son locales, la conclusión parece ser que la geometría que se obtiene tras el proceso de acoplamiento molecular, es una deformación del mínimo global en vacío sin barrera de energía por medio.

5.7.2.- Molécula de epibatidina

La molécula de epibatidina, optimizada a nivel B3LYP/cc-pVDZ, se utilizó como ligando en el programa Autodock, para estudiar su interacción con el nAChR. La conformación adoptada por dicha molécula para facilitar su enlace con el sitio receptor es la que se presenta en la Figura 47.

Figura 47. Estructura adoptada por la molécula de epibatidina para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.



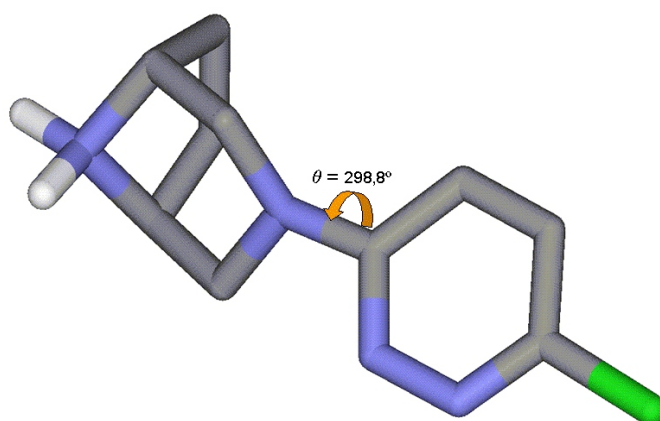
La aplicación del algoritmo genético descrito en el apartado 4.5 del Capítulo IV al acoplamiento de la epibatidina, produce un conformero de la molécula cuyo ángulo de torsión presenta un valor de $326,1^\circ$. Este valor se corresponde con el conformero $\theta = 330^\circ$ (conformero IV). La optimización en vacío del conformero IV produjo uno de los mínimos locales de la molécula con un incremento de energía de $4,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ respecto del mínimo global, alcanzado para el conformero II. Asimismo dicho conformero IV aparece poblado tras el análisis poblacional realizado a la molécula de epibatidina en vacío a temperatura fisiológica. La distancia internitrógeno medida para esta estructura es de $5,3 \text{ (\AA)}$, incluida en el intervalo de valores establecido para los agonistas nicotínicos.

5.7.3.- Molécula de DBO-83 (B).

El estudio de *molecular docking* realizado con la molécula de DBO-83 en su conformación bote, también ofrece resultados interesantes. La molécula, previamente optimizada en disolución a nivel B3LYP/cc-pVDZ, se introdujo en el programa Autodock para que actuase como ligando en su interacción con la subunidad $\alpha 4\beta 2$ del nAChR. La conformación de la molécula que se obtuvo, con el valor del ángulo de torsión, se presenta en la Figura 48.

El valor del ángulo de torsión, $298,8^\circ$, de la conformación obtenida mediante la optimización resulta equivalente al valor $300,0^\circ$, que es el de uno de los mínimos locales que se obtuvieron en el análisis conformacional del DBO-83 (B) en vacío (conformero IV). Éste conformero presenta un incremento de energía de $17,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ respecto del mínimo global, alcanzado para el conformero III. El conformero IV no aparece poblado tras el análisis poblacional de la molécula y su distancia internitrógeno, $r_{\text{NN}} = 4,0 \text{ \AA}$, está por debajo del límite inferior establecido para los agonistas nicotínicos.

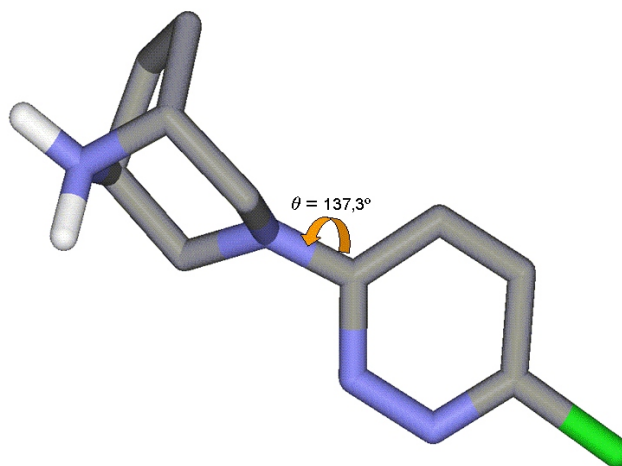
Figura 48. Estructura adoptada por la molécula de DBO-83 (B) para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.



5.7.4.- Molécula de DBO-83 (S).

La molécula de DBO-83, en su conformación silla, como el resto de las moléculas de este trabajo, se sometió al correspondiente estudio realizado con el programa Autodock. Tras la optimización de la molécula a nivel B3LYP/cc-pVDZ, se utilizó el programa Autodock considerando el DBO-83 (S) como ligando, para identificar la geometría más adecuada para su interacción con el receptor nicotínico de la acetilcolina. El resultado de los algoritmos aplicados fué el confórmero que se presenta en la figura 49.

Figura 49. Estructura adoptada por la molécula de DBO-83 (S) para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro.

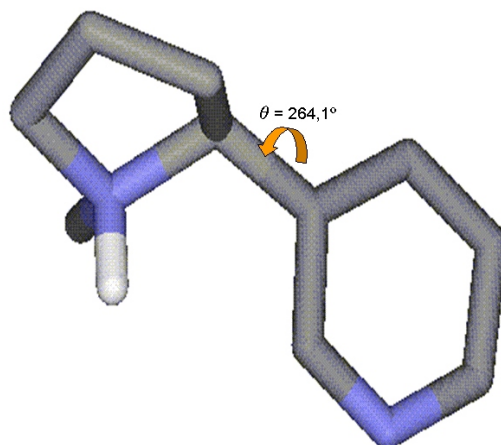


La conformación de la molécula de DBO-83 (S) considerada como la más favorable por Autodock, presenta un valor para el ángulo diedro de $137,3^\circ$. Esta estructura es equivalente a la del conformero con valor del ángulo diedro de $163,8^\circ$ estudiado en el análisis conformacional realizado para el DBO-83 (S), que es el mínimo global en vacío (conformero I). El mismo conformero, con un valor de $167,1^\circ$, es el mínimo global en disolución. El análisis poblacional realizado sobre la molécula, indica que el conformero I aparece poblado tanto en vacío como en disolución. El valor de $r_{\text{NN}} = 6,3 \text{ \AA}$, medido tanto en vacío como en disolución está ligeramente por encima del valor máximo admitido para los agonistas nicotínicos.

5.7.5.- Molécula de nicotina.

Análogamente a las anteriores, también se ha sometido al estudio de *molecular docking* la molécula de nicotina. En el programa Autodock, se introdujo como ligando la molécula de nicotina optimizada a nivel B3LYP/cc-pVDZ. Los cálculos llevados a cabo proporcionaron la estructura de la molécula de nicotina y el valor del ángulo diedro, que se representan en la Figura 50.

Figura 50. Estructura adoptada por la molécula de nicotina para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno.



El valor del ángulo de torsión de la estructura tras los cálculos de Autodock, $264,1^\circ$, permite establecer que el conformero equivalente del análisis conformacional realizado en la nicotina es el de valor $287,3^\circ$ (conformero II) para el ángulo diedro. Así pues, de manera análoga a las moléculas de ABT-594 y de DBO-83 (S), se alcanza una estructura equivalente a la del mínimo global en vacío. El conformero II de la nicotina aparece poblado tanto en vacío como en disolución. El valor de $r_{\text{NN}} = 4,7 \text{ \AA}$, medido en vacío y de $r_{\text{NN}} = 4,8 \text{ \AA}$ en disolución está en el límite inferior de los valores admitidos para los agonistas nicotínicos.

5.7.6.- Acoplamiento Ligando-Receptor.

Todos los ligandos en estudio presentan una disposición estructural equivalente en su acoplamiento con el sitio receptor. Por ello, es posible estudiar los grupos y las interacciones involucrados en el enlace entre los agonistas nicotínicos y el sitio receptor analizando uno de ellos.

En este estudio, la Figura 51 representa, de manera esquemática, la posición que adopta respecto del receptor la molécula de epibatidina tras someterla a los algoritmos

de Autodock. La molécula ligando ha adoptado la estructura óptima para enlazarse con el receptor. En la Figura 52, se visualizan los mismos contenidos de la figura anterior, pero identificando las fracciones de cadenas de aminoácidos más próximas. Aparecen fundamentalmente aminoácidos pertenecientes a la cadena A del receptor, si bien también aparecen residuos pertenecientes a la cadena B.

Figura 51. Estructura adoptada por la molécula de epibatidina en su interacción con el receptor, y su posición relativa con respecto a algunas cadenas de aminoácidos del mismo.

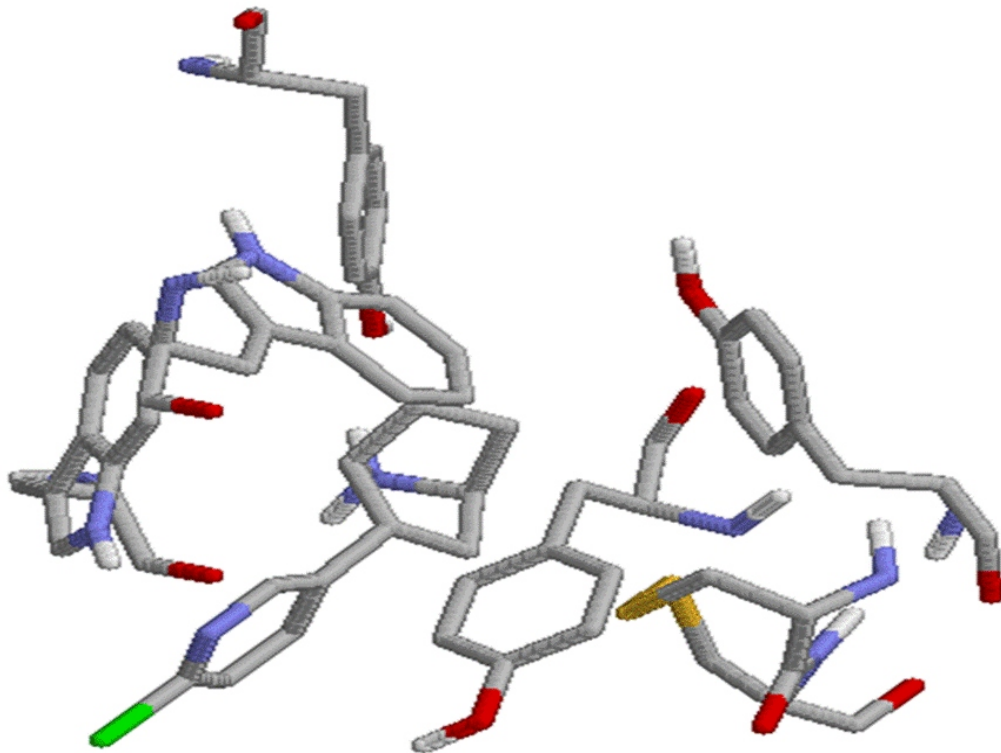
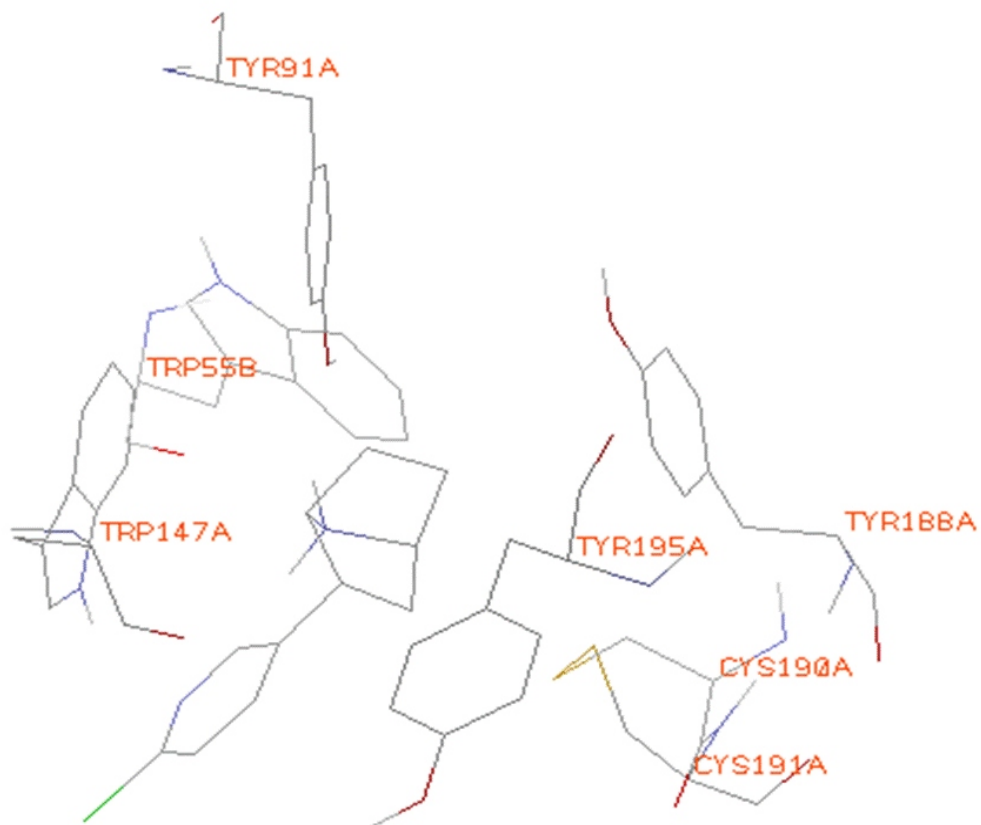


Figura 52. Representación esquemática de la estructura adoptada por la molécula de epibatidina en su interacción con el receptor, y su posición relativa con respecto a algunas cadenas identificadas de aminoácidos del mismo.



Observando la Figura 52, se encuentra que la cabeza catiónica de la molécula de epibatidina, está muy próxima a residuos de cisteína de una hélice del receptor, lo que podría favorecer la estabilización del grupo mediante la aparición de enlaces de hidrógeno (Schapira *et al.*, 2002). Asimismo, la cabeza catiónica de la epibatidina aparece entre anillos aromáticos de tirosina (TYR195, TYR188) y de triptófano (TRP147). Esto sugiere una interacción π -catiónica. El hecho de que la cabeza catiónica aparezca rodeada por TRP147, TYR195 y TYR188 indica que se forma una jaula muy amplia, lo que parece indicar que la orientación específica de la cabeza catiónica con respecto al enlace π -catiónico no es crítica. Trabajos recientes (Cashin *et al.*, 2005; Bisson *et al.*, 2005), proponen que en el subtipo muscular del nAChR la nicotina y la epibatidina se enlazan a un triptófano del receptor $\alpha 4\beta 2$ con una interacción π -catiónica de la cabeza catiónica del ligando y un enlace de hidrógeno entre un hidrógeno de la cabeza catiónica y el grupo C=O aminoácido del triptófano. En la misma Figura 52 se aprecia que un hidrógeno de la cabeza catiónica del ligando queda a 2,074 Å del oxígeno del C=O del triptófano, sugiriendo la presencia de un enlace de hidrógeno. El nitrógeno del anillo aromático de la epibatidina queda cerca del hidrógeno del N-H del mismo triptófano 147 con el que podría interaccionar la cabeza catiónica (a 2.042 Å). La distancia desde el hidrógeno del N-H del triptófano al centro del anillo bencénico del propio triptófano es de unos 4.0 Å, el mismo valor que aparece aproximadamente como límite inferior de la distancia internitrógeno para los agonistas nicotínicos. Que éste sea un límite inferior sería consistente con el hecho de enlazarse por puente de hidrógeno e interacción π -catiónica con el triptófano. Los dos residuos de cisteína (CYS 190 y CYS 191) quedan lejos del nitrógeno del anillo como para formar un enlace de hidrógeno.

Los resultados obtenidos son coherentes con que la cabeza catiónica y el N del anillo aromático sean necesarios para la actividad molecular, debido a la interacción π -catiónica y el enlace de hidrógeno con el triptófano. Por otro lado, la estructura encontrada es común a todas las moléculas ligando estudiadas, independientemente de la orientación de la cabeza catiónica.

Resulta interesante comparar los resultados obtenidos por *molecular docking* con los estudios realizados en vacío y en disolución. La Tabla 37 recoge los conformeros más poblados de cada ligando en ambos medios, junto con el conformero obtenido al realizar los cálculos con Autodock.

Tabla 37.- Tabla comparativa entre los conformeros poblados y obtenidos con Autodock

Ligando	Vacío	Disolución	Autodock
ABT-594	III	III	III
Epibatidina	II,IV	I, III	IV
DBO-83 (B)	III	II	IV
DBO-83 (S)	I, II	I, II	I
Nicotina	I, II	II, I	II

Resulta significativo apreciar que en las moléculas de epibatidina y de DBO-83 (B) el resultado obtenido por Autodock se aproxima a un conformero que solo existe en vacío. En el resto de los casos, el conformero obtenido existe en vacío y en disolución.

Aún más claro resulta el comportamiento de los ligandos al enlazarse con el receptor si estudiamos el contenido de la Tabla 38. En ella se registra el valor (en grados) del ángulo diedro de la estructura final de Autodock, y el de los ángulos de los conformeros más próximos de los ligandos, en vacío y en disolución.

Tabla 38.- Valores de los ángulos diedros de las estructuras optimizadas en vacío, disolución y con Autodock. Ángulos en grados.

Ligando	Vacío	Disolución	Autodock
ABT-594			Def. Conf. III en vacío
Epibatidina	330,0	----	326,1
DBO-83 (B)	300,0	----	298,8
DBO-83 (S)	163,8	167,1	137,3
Nicotina	287,3	300,0	264,1

En todos los casos en los que es posible comparar, los resultados de Autodock

están más cerca de los valores de los ángulos en vacío que de los de disolución. Cuando no se puede comparar, es porque sólo existe un análogo en vacío.

Considerando que el comportamiento del ligando en las proximidades del receptor es más próximo al vacío, se puede elaborar la Tabla 39, con las distancias internitrógeno de los conformeros que se corresponden.

Tabla 39.- Distancias internitrógeno de los conformeros obtenidos por Autodock y los correspondientes calculados en vacío.

Ligando	Conformero	r_{NN} vacío (Å)	r_{NN} Autodock (Å)
ABT-594	III	6,0	5,4
Epibatidina	IV	5,3	5,6
DBO-83 (B)	IV	4,0	6,2
DBO-83 (S)	I	6,3	6,2
Nicotina	II	4,7	4,2

Se puede observar que las estructuras ajustadas al sitio receptor con Autodock, excepto la nicotina, presentan valores compatibles con el intervalo para compuestos activos. En este caso, se puede aceptar la propuesta de que, para la nicotina, interviene una molécula de agua como puente en la interacción (Schapira *et al.*, 2002).

Capítulo VI

Conclusiones

Tras el análisis de la información presentada en el capítulo V, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

* En la molécula de ABT-594, el conformero III es la especie más probable, tanto en vacío como en disolución, para enlazarse con el sitio receptor. Desde el punto de vista energético es el mínimo global. Tras el estudio poblacional, aparece como el único poblado. La distancia internitrógeno medida presenta valores compatibles con la requerida para el enlace con el receptor nicotínico. El estudio por *molecular docking* proporciona una estructura que es una deformación del conformero III.

* La molécula de epibatidina presenta como estructura más probable para el enlace con el sitio receptor el conformero IV en vacío. Se trata de un mínimo local, no muy alejado energéticamente del mínimo global, y es un conformero que aparece poblado tras la aplicación de la función poblacional. La distancia internitrógeno está incluida en el intervalo de valores establecido para los agonistas nicotínicos.

* La conformación bote de la molécula de DBO-83, no presenta un comportamiento claro que permita afirmar qué conformero es el más probable para el enlace con el receptor nicotínico. El tratamiento de *molecular docking* selecciona el

confórmero IV en vacío, que es un mínimo local muy alejado en energía del mínimo global, no poblado, y con un valor muy bajo de la distancia internitrógeno. En cambio, el estudio energético y poblacional, ofrece como confórmeros más poblados y estables energéticamente el confórmero III en vacío y el confórmero II en disolución. En ambos casos las distancias internitrógeno están fuera de los valores teóricos establecidos para los agonistas nicotínicos.

* Los cálculos realizados para la estructura silla de la molécula de DBO-83, a diferencia de los que se han llevado a cabo para la estructura bote, ofrecen información totalmente homogénea. El confórmero I es el mínimo global tanto en vacío como en disolución, aparece poblado en ambos sistemas de cálculo y es la estructura más próxima a la que se obtiene del análisis de *molecular docking*. Las distancias internitrógeno que presenta dicho confórmero tanto en vacío como en disolución son ligeramente superiores al valor máximo admitido para los agonistas nicotínicos.

* De los dos puntos anteriores se sigue que la forma silla es probablemente la más activa biológicamente.

* Los estudios realizados con la molécula de nicotina, presentan como especies activas y capaces de enlazarse en el sitio receptor los dos mínimos locales que aparecen en vacío en el análisis energético, y que están poblados en el estudio poblacional. Sólo la aplicación del *molecular docking* parece seleccionar como más probable al mínimo global (confórmero II).

* Los valores de distancia internitrógeno medidos en los distintos confórmeros estudiados con las diferentes técnicas utilizadas, son compatibles con los intervalos de valores establecidos para los agonistas nicotínicos.

* El análisis de semejanza realizado comparando los confórmeros más probables de todas las moléculas presenta una importante semejanza de la epibatidina con el resto de los compuestos. Los valores de los índices de semejanza obtenidos en la comparación de la epibatidina con el resto de los compuestos con estructuras calculadas

en vacío, son mayores que los medidos con estructuras calculadas en disolución.

* La aplicación del *molecular docking* al enlace con el sitio receptor de las moléculas en estudio confirma que los cálculos realizados en vacío ofrecen información más consistente con los datos experimentales.

* Se ha identificado el sitio receptor del nAChR en las hélices A, B y C y en la zona de las mismas correspondiente al subtipo $\alpha 4\beta 2$ de la estructura 10ED.PDB.

* El hecho de que la cabeza catiónica del ligando aparezca entre anillos aromáticos de tirosina (TYR195, TYR188) y triptófano (TRP147) de los aminoácidos del receptor, sugiere una interacción π -catiónica.

* En el sitio receptor, la cabeza catiónica al estar rodeada por TRP147, TYR195 y TYR188 se encuentra en una jaula muy amplia y se concluye que la orientación específica de la cabeza catiónica no es crítica para la interacción π -catiónica.

* La posición de la cabeza catiónica del ligando, muy próxima a residuos de cisteína de una hélice del receptor, sugiere la formación de enlaces de hidrógeno.

* Se observa que un hidrógeno del nitrógeno de la cabeza catiónica del ligando queda próximo al grupo C=O del extremo ácido del triptófano. Este hecho sugiere la formación de un puente de hidrógeno.

* También el nitrógeno del anillo aromático del ligando puede formar un enlace de hidrógeno con el del N-H del grupo indol del triptófano próximo a la cabeza catiónica.

Bibliografía

Abreo M. A., Lin N. H., Garvey D. S., Gunn D. E., Hettinger A. M., Wasicak J. T., Pavlik P. A., Martin Y. C., DonnellyRoberts D. L., Anderson D. J., Sullivan J. P., Williams M., Arneric S. P., Holladay M. W., *J. Med. Chem.*, **39**, 817 (1996).

Ajay M. M., *Am. Chem. Soc.*, **38**, 4953-4967 (1995).

Alcamí M., Mó O., Yáñez M., *Mass Spectrometry Reviews*, **20**, 195-245 (2002).

Allen M. P., *Nato Asi Series, Ser. C*, **460**, 339-356 (1995).

Ariëns E.J., *Archiv. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **99**, 32 (1954).

Arneric S. P., Holladay M., Williams M., *Biochemical Pharmacology*, **74**, 1092-1101 (2007).

Astles, P. C., Baker S. R., Boot J. R., Broad L. M., Dell C. P., Keenan M., *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, **1 (4)**, 337-348 (2002).

Autodock: [Http://autodock.scripps.edu/](http://autodock.scripps.edu/). Última visita noviembre de 2007.

3D-Dock: www.bmm.icnet.uk/docking/. Última visita 30 de septiembre de 2005.

Badio B., Daly J. W., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 563 (1994).

Bannon A. W., Decker M. W., Holladay M. W., Curzon P., Donnelly-Roberts D., Puttfarcken P. S., Bitner R. S., Diaz A., Dickenson A. H., Porsolt R. D., Williams M., Arneric S. P., *Science*, **279**, 77 (1998).

Barlocco D., Cignarella G., Tondi D., Vianello P., Villa S., Bartolini A., Ghelardini C., Galeotti N., Anderson J., Kuntzweiler T. A., Colombo D., Toma L., *J. Med. Chem.*, **41**, 674 (1998).

Barone V., Cossi M., Tomasi J., *J. Chem. Phys.*, **107**, 3210-3221 (1997).

Basak S. C., Grunwald G. D., Niemi G. J., *From Chemical Topology to Three Dimensional Molecular Geometry*, Plenum Press (1997).

Basak S. C., Niemi G. J., Veith G. D., *Computational Chemical Graph Theor.*, Nova Science Publishers (1990).

Becke A. D., *Phys. Rev.*, **B38**, 3098 (1988).

Beers W. H., Reich E., *Nature*, **228**, 917 (1970).

Besler B. H., Merz K. M., Kollman P. A., *J. Comput. Chem.*, **11**, 431 (1990).

Bingham R. C., Dewar M. J. S., Lo D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1285-1293 (1975).

Binkley J. S., Pople J. A., Hehre W. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 939 (1980).

Bisson W. H., Scapozza L., Westera G., Mu L., Schubiger P. A., *J. Med. Chem.*, **48**, 5123-5130 (2005).

Born M. V., Huang K. Part II: General Theories. *Dynamical Theory Of Crystal Lattices* 166-173. (1968).

Born M. V., Oppenheimer R., *Annalen Der Physik*, **84**, 457-484 (1927).

Born M. V., *Z.Phys.*, **1**, 45-48 (1920).

Boyce S., Webb J. K., Shephard S. L., Russell M. G. N., Hill R. G., Rupniak N. M. J., *Pain*, **85 (3)**, 443-450 (2000).

Boys S. F., *Proceedings Of The Royal Society Of London Part A* **A200**, 542-554 (1950).

Buccafusco J. J., *Molecular Interventions*, **4**, 285-295 (2004).

Bunnelle W. H., Dart M. J., Schrimpf M. R., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **4**, 299-334 (2004).

Bunnelle W. H., Decker M. W., *Expert Opin. Ther. Patents*, **13 (7)**, 1003-1021 (2003).

Burke K., Werschnik J., Gross E. K. U., *J. Chem. Phys.*, **123** (2005).

Caballero N. A., *Análisis teórico de la actividad farmacológica de las Aminopiridinas como moléculas responsables del bloqueo del canal de K*, Tesis Doctoral. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Méjico), (2007).

Carbó-Dorca R., Arnau J., Leyda L., *Int. J. Quantum Chem.*, **17**, 1185 (1980).

Carbó-Dorca R., Robert D., Amat Ll., Girones X., Besalú E., *Molecular Quantum*

Similarity in QSAR and Drug Design, Lecture Notes in Chemistry 73, Springer-Verlag, (2000).

Carloni P., Alber F., *Quantum Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH GmbH & Co. KgaA, Germany (2003).

Carroll F. I., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 1889-1896 (2004).

Cashin A. L., Petersson E. J., Lester H. A., Dougherty D. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 350-356 (2005).

Celie P. H. N., van Rossum-Fikkert S. E., van Dijk W. J., Brejc K., Smit A. B., Sixma T. K., *Neuron*, **41**, 907–914, (2004).

Changeux J. P., Bertret D., Corringier P. J., Dehaene S., Edelstein S., Leena C., Le Novere N., Marubio L., Picciotto M., Zoli M., *Brain. Res. Rev.*, **26**, 198 (1998).

Cheng J., Izenwasser S., Wade D., Trudell M. L., *Med. Chem. Res.*, **10 (6)**, 356 (2001).

Chuan-Xin Z., Ze-Mei G., Tie-Ming C., Run-Tao L., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16 (7)**, 2013-2016 (2006).

Cossi M., Barone V., Cammi R., Tomasi J., *Chem. Phys. Lett.*, **255**, 327-335 (1996).

Cramer H., *Teoría de probabilidad y aplicaciones*, Aguilar, España (1968).

Dale H. H., *J. Pharmacol.*, **6**, 147 (1914).

Daly J. W., *Cellular and Molecular Neurobiology*, **25 (3/4)**, 513-552 (2005).

Davis L., Pollock L. J., Stone T. T., *Surg. Gynecol. Obstet.*, **55**, 418 (1932).

Decker M. W., Meyer M. D., *Biochem. Pharmacol.*, **58 (6)**, 917 (1999).

Decker M. W., Meyer M. D., Sullivan J. P., *Expert Opin. Investig. Drugs*, **10 (10)** 1819 (2001).

Decker M. W., Rueter L. E., Bitner R. S., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **4 (3)**, 369-384 (2004).

Defranchesci M., Le Bris C., *Lecture Notes in Chemistry. Mathematical Models and Methods for Ab Initio Quantum Chemistry*, Springer-Verlag, Germany (2000).

Del Bene J., Jaffe H. H., *J. Chem. Phys.*, **48**, 1807, 4050 (1968).

Devillers-Thiéry A., Galzi J. L., Eiselé J. L., Bertrand S., Bertrand D., Changeux J. P., *J. Membrane Biol.*, **136**, 97 (1993).

Dewar M. J. S., Zoebisch E. G., Healy E. F. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **107 (15)**, 4907 (1985).

Dewar M. J., Thiel W., *Journal Of The American Chemical Society* **99 (15)**, 4899-4907 (1977).

Dill J. D., Pople J. A., *J. Chem. Phys.*, **62**, 2921 (1975).

Ditchfield R., Hehre W. J., Pople J. A., *J. Chem. Phys.*, **54**, 724 (1971).

Dock: www.Dock.compbio.ucsf.edu/ Última visita 30 de septiembre de 2005.

Donnelly-Roberts D. L., Puttfarcken P. S., Kuntzweiler T. A., Briggs C. A., Anderson D. J., Campbell J. E., Piattoni-Kaplan M., Mckenna D. G., Wasicak J. T., Holladay W., Williams M., Arneric S. P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 777 (1998).

Dukat M., Damaj M. I., Glassco W., Dumas D., May E. L., Martin B. R., Glennon R. A., *Med. Chem. Res.*, **4**, 131-139 (1994).

Dunning Jr. T. H., *Journal Of Chemical Physics* **90(2)**, 1007-1023 (1989).

Elmore D. E., Dougherty D. A., *J. Org. Chem.*, **65**, 742 (2000).

Engeln-Müllges G., Uhlig F., *Numerical Algorithms with Fortran*. Springer-Verlag (1996).

Farnell L., Richards W. G., Ganellin C. R., *J. Theor. Biol.*, **43**, 389 (1974).

Fermi E., *Z. Phys.*, **48**, 73 (1928).

Fletcher R., Part 1 Unconstrained Optimization. *Practical Methods In Optimization*, John Wiley & Sons 1-136 (1987).

Flores C.M., *Pain*, **88**, 1-6 (2000).

Foresman J. B., Frisch \AA ., *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, Pittsburgh, PA U.S.A. Gaussian, Inc. (1996).

Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Zakrzewski V. G., Montgomery Jr. J. A., Stratmann R. E., Burant J. C., Dapprich S., Millam J. M., Daniels A. D., Kudin K. N., Strain M. C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G. A., Ayala P. Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Cioslowski J., Ortiz J. V., Baboul A. G., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Andres J. L., Gonzalez C., Head-Gordon M., Replogle E. S., Pople J. A., *Gaussian 98, Revision A.7*, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA (1998).

Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery Jr. J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A., *Gaussian 03, Revision A.1, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA (2003)*.

Ghelardini C., Galeotti N., Barlocco D., Bartolini A., *Drug Development Research*, **40 (3)**, 251-258 (1997).

Glennon R. A., Herndon J. L., Dukat M., *Med. Chem. Res.* **4**, 461 (1994).

Glennon R. A., Dukat M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 1841–1844 (2004).

Glennon R. A., *Medicinal Chemistry Research*, **13 (1/2)**, 74-77 (2004).

Goldberg D. E., *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*, Addison-Wesley Pub. Co., INC., (1989).

Goodsell D. S., Olson A. J., *Proteins*, **8**, 195-202 (1990).

Gordon M. S., Binkley J. S., Pople J. A., Pietro W. J., Hehre W. J., *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 2797 (1982).

Grant G. H., Richards W. G., *Computational Chemistry*. Oxford University Press (1995).

Grapher 3.01. 2-D Graphing System. Golden Software Inc. (2000).

Gō N., Gō M., Scheraga H. A., *Macromolecules*, **9**, 535 (1976).

Gō N., Gō M., Scheraga H. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **59**, 1030 (1968).

Gündisch D., *Expert Opin. Ther. Patents*, **15 (9)**, 1221-1239 (2005).

Hall G.G., *Proc. Roy. Soc.*, **A 205**, 541-552 (1951).

Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R., *PROTEINS: Structure, function and Genetics*, **48**, 409-443 (2002).

Hariharan P. C., Pople J. A., *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, **28**, 213 (1973).

Hartree R. D., *Proc. Cambridge Phil. Soc.*, **24**, 89, 111, 426 (1928).

Hehre W., Ditchfield R., Pople J. A., *J. Chem. Phys.*, **56**, 2257 (1972).

Hehre W. J., Stewart R. F., Pople J. A., *J. Chem. Phys.*, **64**, 2657 (1969).

Hinchliffe A., *Computational Quantum Chemistry*, John Wiley & Sons, Britain (1989).

Hirst D. M., *A Computational Approach to Chemistry*, Blackwell Scientific Pub. (1990).

Hoffman R., *J. Chem. Phys.*, **39**, 1397 (1963).

Hohenberg P., Kohn W., *Phys. Rev.*, **136**, B864 (1964).

Holladay M. W., Wasicak J. T., Lin N.-H., He Y., Ryther K. B., Bannon A. W., Buckley M.

J., Kim D. J. B., Decker M. W., Anderson D. J., Campbell J. E., Kuntzweiler T. A., Donnelly-Roberts D. L., Piattoni-Kaplan M., Briggs C. A., Williams M., Arneric S. P., *J. Med. Chem.*, **41** (4), 409 (1998).

Holladay M. W., Decker .W., *Adv. Med. Chem.*, **5**, 85 (2000).

Holland J., *Scientific American*, **1**, 66-72, (1992).

Huang X., Zheng F., Crooks P. A., Dwoskin L. P., Zhan C., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14401-14414 (2005).

Jensen F., *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley&Sons (1999).

Kanne D. B. Tomizawa M., Durkinb K. A., Casidaa J. E., *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 877–881 (2005).

Kendall R. A., Dunning Jr. T. H., Harrison R. J., *Journal Of Chemical Physics* **96(9)**, 6796-6806 (1992).

Kirkwood J. G., Westheimer F. H., *J. Chem. Phys.*, **6**, 506 (1936).

Kirpatrick S., Gelatt Jr C. D., Veidis M. V., *Science*, **220**, 671-680 (1983).

Klamt A., *J. Phys. Chem.*, **99**, 2224 (1995).

Knowles P. J., Hampel C., Werner H.-J., *J. Chem. Phys.*, **99**, 5219 (1993).

Koch W., Holthausen M. C., *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Wiley-VCH, (2000).

Kohn W., Sham L. J., *Phys. Rev.*, **140**, A1133 (1965).

Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E., *J. Mol. Biol*, **161**, 259-288 (1982).

Leach A. R., *Molecular Modeling. Principles and Applications*. Prentice Hall (2001).

Leach A.R., *Molecular Modeling. Principles and Applications*. Addison Wesley Longman Ltd. (1996).

Lee C., *Anesthesiology*, **101**, A1148 (2004).

Lee C., Yang W., Parr R. G., *Phys. Rev.*, **B37**, 785 (1988).

Lee C., *Pharmacol & Therap.*, **98**, 143-169 (2003).

Leurs R., Chapter 1. *Drug-Receptor Interactions*, in *Medicinal Chemistry: Principles and Practice, second edition*, Edited by F. D. King. Royal Society of Chemistry (2002).

Levine I. N., *Quantum Chemistry*, Prentice Hall (2000).

Lloyd G. K., Williams M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 461 (2000).

Lukas R. J., Changeux J. P., Novère N. L., Albuquerque E. X., Balfour D. J. K., Berg D. K., Bertrand D., Chiappinelli V. A., Clarke P. B. S., Collins A. C., Dani J. A., Grady S. R., Kellar K. J., Lindstrom J. M., Marks M. J., Quik M., Taylor P. W., Wonnacott S., *Pharmacol.Rev.*, **51**, 397 (1999).

Metropolis N., Rosenbluth A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H., Teller E., *J. Chem. Phys.*, **21**, 1087-1092 (1953).

Meyer M. D., Decker M. W., Rueter L. E., Anderson D. J., Dart M. J., Kim K. H., Sullivan J. P., Williams M, *Eur. J. Pharmacol.*, **393 (1-3)**, 171 (2000).

Meyer, M. D., *Drug Development Research*, **67 (4)**, 355-359 (2006).

Moller C., Plesset M. S., *Physical Review* , **46**, 618-622 (1934).

Mora M., Muñoz-Caro C., Niño A., *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **17**, 713-724 (2003).

Mora M., Castro M. E., Niño A., Melendez F. J., Muñoz-Caro C., *Int. J. Quantum Chem.*, **103**, 25-33 (2005).

Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J., *J. Comput. Chem.*, **19**, 1639-1662 (1998).

Muñoz-Caro C., Niño A., Mora M., Reyes S., Melendez F. J., Castro M. E., *J. Mol. Structure: THEOCHEM*, **726**, 115-124 (2005).

Nesbet R. K., *Rev. Mod. Phys.*, **32**, 272 (1960).

Nicolotti O., Altomare C., Pellegrini-Calace M., Carotti A., *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **4**, 335-360 (2004).

Niño A., Muñoz-Caro C., *J. Comput. Chem.*, **18**, 27 (1994b).

Niño A., Muñoz-Caro C., Moule D. C., *J. Phys. Chem.*, **98**, 1519 (1994a).

Niño A., Muñoz-Caro C., Moule D. C., *J. Phys. Chem. A*, **102**, 1177 (1998).

Niño A., Muñoz-Caro C., Moule D. C., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **91**, 399 (1995c).

Niño A., Muñoz-Caro C., Moule D. C., *J. Phys. Chem.*, **99**, 8510 (1995b).

Niño A., Muñoz-Caro C., *Computers Chem.*, **4**, 371 (1995a).

Niño A., Muñoz-Caro C., Mora M., Reyes S., *J. Phys. Chem. A*, **107**, 10191-10198 (2003).

Ozkabak, A. G., Goodman L., *J. Chem. Phys.*, **96**, 5958 (1992).

Papke R. L., Webster J. C., Lippiello P. M., Bencherif M., Francis M. M., *J. Neurochem.* **75**, 204 (2000).

Pariser R., Parr R. G., *J. Chem. Phys.*, **21**, 466 (1953).

Parr R. G., *J. Chem. Phys.*, **20**, 239 (1952).

Patrick G. L., *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford University Press (1997).

Pickett, H. M., *J. Chem. Phys.*, **56**:1715 (1972).

Pople J. A., *Trans. Faraday Soc.*, **49**, 1375 (1953).

Pople J. A., Nesbet R. K., *J. Chem. Phys.*, **22**, 571-572 (1954).

Pople J. A., Beveridge D. L., Dobosh P. A., *J. Chem. Phys.*, **47**, 2026 (1967).

Pople J. A., Santry D. P., Segall G. A., *J. Chem. Phys.*, **43**, 129 (1965).

Pople J. A., Segall G. A., *J. Chem. Phys.*, **44**, 3289 (1966).

Press W. H., Teukolsky S. A., Vetterling W. T., Flannery B. P., *Numerical Recipes in Fortran 77, Second Edition*, Cambridge University Press (1992).

Qian C., Li T., Shen T.Y., Libertine-Garahan L., Eckman J., Biftu T., S. Ip., *Eur. J. Pharmacol.*, **250**, R13-R14 (1997).

Ritchie D., *Hex 4.2.*, University of Aberdeen, Aberdeen Scotland, UK (2003).

Ritchie D., *Proteins*, **52**, 98 (2003).

Ritchie D., Kemp G. J. L., *J. Comp. Chem.*, **20**, 383 (1999).

Roos B. O., *Methods in Computational Molecular Physics*, D.Reidel Publising (1983).

Roos B. O., *Advances in Chemical Physics*, **69**, 339-445 (1987).

Roothaan C. C., *Reviews Of Modern Physics* **23 (2)**, 69-89 (1951).

Rueter L. E., Meyer M. D., Decker M. W., *Brain. Res.*, **872 (1-2)**, 93 (2000).

Sadlej J., *Semi-empirical Methods of Quantum Chemistry*, John Wiley&Sons, (1985).

Schapira M., Abagyan R., Totrov M., *BMC Structural Biology*, **2:1**, 6807 (2002).

Schlegel H. B., *J. Comp. Chem.*, **3**, 214 (1982).

Sheridan R. P., Nilakantan R., Dixon J. S., Venkataraghavan R., *J. Med. Chem.*, **29**, 899 (1986).

Singh V. C., Kollman P. A., *J. Comput. Chem.*, **5**, 129 (1984).

Slater J. C., *Phys. Rev.*, **36**, 57 (1930).

Smeyers Y. G., Senent M. L., Botella V., Moule D. C., *J. Chem. Phys.*, **98**, 2754-2767 (1993).

Spande T. F., Garraffo H. M., Edwards M. W., Yeh H. J. C., Pannell L., Daly J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3475 (1992).

Stephenson R. P., *Brit. J. Pharmacol.*, **11**, 379-93 (1956).

Stewart J. J. P., *J. Comput. Chem.*, **10 (2)**, 209 (1989).

Surfer 8.0. *Surface Mapping System*. Golden Software Inc. (2002).

Szabo A., Ostlund N. S., *Modern Quantum Chemistry. Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Mc Graw-Hill Pub. Co., (1982).

Takeshima T., Fukumoto R., Egawa T., Konaka S., *J. Phys. Chem. A.*, **106**, 8734 (2002).

Taylor P., Insel P. A., *Chapter2. Molecular basis of drug action, in Principles of drug action, third edition*, Edited by W. B. Pratt and P. Taylor. Churchill Livingstone Inc (1990).

Thomas L. H., *Proc. Camb. Phil. Soc.*, **23**, 542 (1926).

Tomasi J., Persico M., *Chem. Rev.*, **94**, 2027 (1994).

Trinajstić N., *Chemical Graph Theory*, CRC Press (1992).

Unwin N., *J. Mol. Biol.*, **346**, 967-989 (2005).

Wei Z. L., Petukhov P. A., Xiao Y., Tuckmantel W., George C., Kellar K. J., Kozikowski A. P., *J. Med. Chem.*, **46**, 921-924, (2003).

Xin H., Jie G., Xin X., Naoki S., Tsuyoshi O., Ming-Wei W., *Acta Pharmacologica Sinica*

26 (10), 1175-1180 (2005).

Yogeeswari P., Sriram D., Bal, T. R., Thirumurugan R., *Natural Product Research*, **20 (5)**, 497-505 (2006).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de ABT-594 utilizada en el presente estudio.	82
Tabla 2. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de epibatidina utilizada en el presente estudio.	84
Tabla 3. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de DBO-83 (B) utilizada en el presente estudio.	86
Tabla 4. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de DBO-83 (S) utilizada en el presente estudio.	88
Tabla 5. Matriz Z de la forma cargada de la molécula de nicotina utilizada en el presente estudio.	90
Tabla 6. Estructura semántica de un archivo de entrada del programa utilizado para calcular la distribución poblacional.	98
Tabla 7. Valores de los diedros θ_1 , θ_2 y τ y diferencias energéticas, ΔE , para la estructura más abierta de la forma protonada del ABT-594. Geometrías completamente optimizadas. Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} .	104
Tabla 8. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del ABT-594, en la malla de valores de θ_1 y θ_2 desde 0° hasta 360° , calculados con B3LYP y MP2, en vacío.	107
Tabla 9. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del ABT-594, en la malla de valores de θ_1 y θ_2 desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.	109
Tabla 10. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío del ABT-594. En negrita se han marcado los valores de θ_1 y θ_2 .	112
Tabla 11. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución del ABT-594. En negrita se han marcado los valores de θ_1 y θ_2 .	113

Tabla 12. Valores de θ_1 y θ_2 (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol ⁻¹) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada del ABT-594. Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.	114
Tabla 13. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para todos los conformeros de la molécula de ABT-594. Valores en vacío y en disolución	118
Tabla 14. Valores de energía en kJ mol ⁻¹ para la forma protonada de la epibatidina, en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360°, calculados en vacío y en disolución.	122
Tabla 15. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío de la epibatidina. En negrita se ha marcado el valor de θ .	124
Tabla 16. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución de la epibatidina. En negrita se ha marcado el valor de θ .	125
Tabla 17. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol ⁻¹) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada de la epibatidina. Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.	126
Tabla 18. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ en la molécula de epibatidina.	130
Tabla 19. Valores de energía en kJ mol ⁻¹ para la forma protonada del DBO-83 (B), en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360°, calculados en vacío y en disolución.	134
Tabla 20. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío del DBO-83 (B). En negrita se ha marcado el valor de θ .	136
Tabla 21. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución del DBO-83 (B). En negrita se ha marcado el valor de θ .	137

Tabla 22. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada del DBO-83 (B). Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.	138
Tabla 23. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ de la molécula de DBO-83 (B).	141
Tabla 24. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada del DBO-83 (S), en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.	145
Tabla 25. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío del DBO-83 (S). En negrita se ha marcado el valor de θ .	147
Tabla 26. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución del DBO-83 (S). En negrita se ha marcado el valor de θ .	148
Tabla 27. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada del DBO-83 (S). Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.	149
Tabla 28. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ en la molécula de DBO-83 (S).	152
Tabla 29. Valores de energía en kJ mol^{-1} para la forma protonada de la nicotina, en la malla de valores de θ desde 0° hasta 360° , calculados en vacío y en disolución.	156
Tabla 30. Matriz Z del mínimo absoluto en vacío de la nicotina. En negrita se ha marcado el valor de θ .	158
Tabla 31. Matriz Z del mínimo absoluto de los cálculos en disolución de la nicotina. En negrita se ha marcado el valor de θ .	159

Tabla 32. Valores de θ (en grados) e incrementos de energía (en kJ mol^{-1}) en vacío y disolución para los diferentes mínimos localizados sobre la hipersuperficie de energía de la forma protonada de la nicotina. Los datos energéticos están referidos al mínimo global obtenido en cada tipo de cálculo.	160
Tabla 33. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los distintos valores del ángulo θ de la molécula de nicotina.	163
Tabla 34. Distancias internitrógeno r_{NN} en Å para los conformeros más estables de las moléculas en estudio.	167
Tabla 35.- Valores de índices de semejanza para los conformeros más estables en vacío de las moléculas estudiadas.	168
Tabla 36.- Valores de índices de semejanza para los conformeros más estables en disolución de las moléculas estudiadas.	168
Tabla 37.- Tabla comparativa entre los conformeros poblados y obtenidos con Autodock	180
Tabla 38.- Valores de los ángulos diedros de las estructuras optimizadas en vacío, disolución y con Autodock. Ángulos en grados.	180
Tabla 39.- Distancias internitrógeno de los conformeros obtenidos por Autodock y los correspondientes calculados en vacío.	181

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura y convención numérica de la molécula de ABT-594 protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Rojo: Oxígeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno. 81
- Figura 2.** Estructura y convención numérica de la molécula de epibatidina protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno. 83
- Figura 3.** Estructura y convención numérica de la molécula de DBO-83 (B) protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno. 85
- Figura 4.** Estructura y convención numérica de la molécula de DBO-83 (S) protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno. 87
- Figura 5.** Estructura y convención numérica de la molécula de nicotina protonada utilizada en este trabajo. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno. 89
- Figura 6.** Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de ABT-594 para el movimiento de torsión alrededor de los ángulos diedros θ_1 y θ_2 . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 111
- Figura 7.** Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de ABT-594 para el movimiento de torsión alrededor de los ángulos diedros θ_1 y θ_2 . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 111
- Figura 8.** Estructura del confórmero III de la molécula de ABT-594. Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Rojo: Oxígeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno. 115

- Figura 9.** Estructura del confórmero III de la molécula de ABT-594. Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Rojo: Oxígeno; Verde: Cloro; Blanco: Hidrógeno. 115
- Figura 10.** Mapa tridimensional de poblaciones conformacionales del ABT-594, en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. El eje Z corresponde a la población. 116
- Figura 11.** Mapa tridimensional de poblaciones conformacionales del ABT-594, en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. El eje Z corresponde a la población. 117
- Figura 12 .** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función de los ángulos diedros θ_1 y θ_1 en la forma protonada de la molécula de ABT-594. Geometrías optimizadas en vacío. Se incluye e indica el confórmero III. Las líneas discontinuas marcan los límites superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 120
- Figura 13.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función de los ángulos diedros θ_1 y θ_1 en la forma protonada de la molécula de ABT-594. Geometrías optimizadas en disolución. Se incluye e indica el confórmero III. Las líneas discontinuas marcan los límites superior, $r_{NN} = 6,1$ Å e inferior, $r_{NN} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 120
- Figura 14.** Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de epibatidina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 123
- Figura 15.** Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de epibatidina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 123
- Figura 16.** Estructura del confórmero II de la epibatidina. Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 126

- Figura 17.** Estructura del confórmero III de la epibatidina. Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 127
- Figura 18.** Mapa de población conformacional de la epibatidina, en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 128
- Figura 19.** Mapa de poblaciones conformacionales de la epibatidina, en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 128
- Figura 20.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la epibatidina. Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los confórmeros II y IV. Las líneas discontinuas marcan los límites superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 131
- Figura 21.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la epibatidina. Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los confórmeros I y III. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 131
- Figura 22.** Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de DBO-83 (B) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 135
- Figura 23.** Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de DBO-83(B) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 135
- Figura 24.** Estructura del confórmero III del DBO-83 (B). Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 138
- Figura 25.** Estructura del confórmero II del DBO-83 (B). Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 139

- Figura 26.** Mapa de población conformacional del DBO-83 (B), en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 140
- Figura 27.** Mapa de población conformacional del DBO-83 (B), en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 140
- Figura 28.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (B). Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los confórmeros III y IV. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 142
- Figura 29.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (B). Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los confórmeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 142
- Figura 30.** Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de DBO-83 (S) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 146
- Figura 31.** Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de DBO-83 (S) para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 146
- Figura 32.** Estructura del confórmero I del DBO-83 (S). Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 149
- Figura 33.** Estructura del confórmero I del DBO-83 (S). Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 150
- Figura 34.** Mapa de poblaciones conformacionales del DBO-83 (S), en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 151

- Figura 35.** Mapa de poblaciones conformacionales del DBO-83 (S), en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 151
- Figura 36.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (S). Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 153
- Figura 37.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada del DBO-83 (S). Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 153
- Figura 38.** Hipersuperficie de energía potencial, en vacío, de la molécula de nicotina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 157
- Figura 39** Hipersuperficie de energía potencial, en disolución, de la molécula de nicotina para el movimiento de torsión alrededor del ángulo diedro θ . Ángulos en grados y energía en kJ mol^{-1} . 157
- Figura 40.** Estructura del conformero II de la nicotina. Geometría optimizada en vacío. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno. 160
- Figura 41.** Estructura del conformero II de la nicotina. Geometría optimizada en disolución. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno. 161
- Figura 42.** Mapa de población conformacional de la nicotina, en vacío a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 162
- Figura 43.** Mapa de población conformacional de la nicotina, en disolución acuosa a temperatura fisiológica (37°C). Ángulos en grados. 162

- Figura 44.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la molécula de nicotina. Geometrías optimizadas en vacío. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 164
- Figura 45.** Distancias internitrógeno, r_{NN} (Å), como función del ángulo diedro θ en la forma protonada de la molécula de nicotina. Geometrías optimizadas en disolución. Se incluyen e indican los conformeros I y II. Las líneas discontinuas marcan los límite superior, $r_{\text{NN}} = 6,1$ Å e inferior, $r_{\text{NN}} = 4,8$ Å del intervalo de distancias r_{NN} encontradas en estudios previos para otros agonistas nicotínicos. 164
- Figura 46.** Estructura adoptada por la molécula de ABT-594 para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 171
- Figura 47.** Estructura adoptada por la molécula de epibatidina para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 172
- Figura 48.** Estructura adoptada por la molécula de DBO-83 (B) para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 174
- Figura 49.** Estructura adoptada por la molécula de DBO-83 (S) para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno; Verde: Cloro. 175
- Figura 50.** Estructura adoptada por la molécula de nicotina para su interacción con el nAChR. Ángulos en grados. Los códigos de color en los átomos son: Gris: Carbono; Azul: Nitrógeno; Blanco: Hidrógeno. 176

-
- Figura 51.** Estructura adoptada por la molécula de epibatidina en su interacción con el receptor, y su posición relativa con respecto a algunas cadenas de aminoácidos del mismo. 177
- Figura 52.** Representación esquemática de la estructura adoptada por la molécula de epibatidina en su interacción con el receptor, y su posición relativa con respecto a algunas cadenas identificadas de aminoácidos del mismo. 178

Apéndice

Mora M., Muñoz-Caro C., Niño A. Thermodynamic conformational analysis and structural stability of the nicotinic analgesic ABT-594, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **17**, 713-724 (2003).

Niño A., Muñoz-Caro C., Mora M., Reyes S. Effect of the Conformational Kinetic Energy and the Rotovibrational Coupling in the Conformational Population of Bioactive Compounds, *J. Phys. Chem. A.*, **107**, 10191-10198 (2003).

Mora M., Castro M. E., Niño A., Melendez F. J., Muñoz-Caro C. Analysis of B3LYP and MP2 Conformational Population Distributions in *trans*-Nicotine, Acetylcholine, and ABT-594, *Int. J. Quantum Chem.*, **103**, 25-33 (2005).

Muñoz-Caro C., Niño A., Mora M., Reyes S., Melendez F. J., Castro M. E. Conformational population distribution of acetylcholine, nicotine and muscarine in vacuum and solution, *J. Mol. Structure: THEOCHEM*, **726**, 115-124 (2005).

Mora M., Muñoz-Caro C., Niño A. Theoretical prediction of the interactions between nicotinic analgesics and the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. En redacción.

Thermodynamic conformational analysis and structural stability of the nicotinic analgesic ABT-594

M. Mora, C. Muñoz-Caro & A. Niño*

Grupo de Química Computacional, E.S. Informática, Universidad de Castilla-La Mancha, Paseo de la Universidad 4, E-13071 Ciudad Real, Spain

Received 3 April 2003; accepted in revised form 2 October 2003

Key words: ABT-594, conformational population, internitrogen separation, nicotinic analgesic, nicotinic pharmacophore

Summary

This work presents a theoretical study of the nicotinic analgesic ABT-594. We describe its neutral (precursor) and protonated (active) forms in vacuum and aqueous solution at the MP2/cc-pVDZ level. A conformational analysis is performed on the two torsional angles describing the orientation of the azetidiny group and the azetidiny methoxy moiety. To account for entropic effects, a thermostatical study of conformational populations at physiological temperature is carried out. In the neutral form, conformer I is found as the most populated in vacuum and solution. Here, the nitrogen of the azetidiny group is far from the electron pairs of the oxygen and the pyridinic nitrogen. In the protonated form, conformer VIII is the most stable in vacuum and solution. Now, the additional proton on the azetidiny group is oriented toward the electron lone pairs of oxygen. The structural stability of conformers I and VIII is considered through the atoms in molecules theory. The conformer I, in the neutral forms, is stabilized by an intramolecular hydrogen bond. The preference of conformer VIII in the protonated forms is explained by the higher strength of its intramolecular hydrogen bond over the cation- π interaction found in conformer I. The effect of the interaction energy with the receptor on the conformational preferences of protonated ABT-594 is simulated. The result is that the population of conformers associated to the rotation of the azetidiny group increases. So, the molecule can easily adopt the optimal internitrogen separation for interaction with the receptor.

Introduction

Current analgesics in use fall mainly in one of two classes, opiod analgesics and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) [1]. These compounds are extensively used in the treatment of pain, but they exhibit some unwanted side effects. Thus, opioids produce physical addiction, respiratory depression and constipation, among other undesirable effects [1]. On the other hand, inspecificity of present NSAIDs for the COX-1 and COX-2 isoforms of the cyclooxygenase enzyme is translated in gastric irritation and renal dysfunction, apart from its analgesic and anti-inflammatory activity [1, 2]. For these reasons, it is of

great interest to develop new approaches to the treatment of pain, free from the side effects mentioned above.

The antinociceptive power of nicotine was reported as early as 1932 [3]. However, nicotine has not been developed as an analgesic agent due to its weak analgesic activity and its profile of side effects. The present interest in the nicotinic mechanism, as an alternative route to pain management, dates from 1976 when John Daly identified in the skin of the Ecuadorian frog *Epipedobates Tricolor* a compound 200 times more potent than morphine at blocking pain in animals [4–5]. The active principle was called epibatidine, and it was shown to exert its analgesic activity by acting on the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) [4, 6]. The structure of epibatidine was not elucidated until the 1990s [7]. Despite its great activity, the lack of

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: quimcom@uclm.es

specificity of epibatidine on the different subtypes of nicotinic receptors results in an important profile of side effects on the respiratory, gastrointestinal and cardiovascular functions [8]. Therefore, epibatidine is not used as an analgesic agent, but represents an important tool in the study of the function of the nAChR.

The nicotinic receptor, the target of nicotinic analgesics, is a kind of ligand gated ion channel, where acetylcholine is the endogenous ligand [9]. This receptor is a transmembrane protein with the ligand receptor site placed at the extracellular side. The first model of nicotinic pharmacophore was proposed by Beers and Reich [10] and refined by Sheridan and coworkers [11]. Following this model, the nicotinic pharmacophore comprises a basic nitrogen (a centre of charge) and a hydrogen bond acceptor. The optimal distance proposed in this model between the charge centre and the hydrogen bond acceptor is 4.8 Å. Posterior studies on epibatidine found an internitrogen separation of 5.5 Å [12]. Additional studies, using molecular mechanics optimized geometries for epibatidine and related compounds, found internitrogen distances as long as 6.1 Å [13]. These data show that the question of the role played by the internitrogen separation in the nicotinic pharmacophore remains unanswered; for a review see [14].

Several compounds structurally related to epibatidine and exhibiting analgesic activity have been developed to date [15]. Among them, the compound called ABT-594, (R)-5-(2-azetidylmethoxy)-2-chloropyridine [16, 17], is equal in efficacy to morphine across a series of diverse animal models of acute thermal, persistent chemical, and neuropathic pain states [17]. In addition, repeated treatment with ABT-594 does not seem to elicit opioid-like withdrawal or physical dependence [17]. It has been shown that ABT-594 is much less toxic than epibatidine due to its higher selectivity for the nAChR of the central nervous system (CNS) [16]. Similarly to epibatidine, ABT-594 shows a lack of stereoselectivity at its binding to the nAChR of the CNS, with the *S*-enantiomer (called A-98593) being more potent at the neuromuscular nAChR [18]. At present, ABT-594 is in clinical Phase II [15]. For these reasons, ABT-594 can be considered the starting point of a new generation of potent nicotinic analgesics.

Despite the interest of ABT-594, to our knowledge no theoretical treatment of the properties of this compound has been carried out. Considering the existence of a basic nitrogen in the azetidinyll moiety of ABT-594, at physiological pH we have

the neutral (precursor) form in equilibrium with the protonated (active) form. As illustrated in [19] for aminopyridines, the study of the neutral and protonated ligand is needed for any model of activity that expresses thermostatically the protonation equilibrium and the binding constant with the receptor.

As the starting point toward the development of a model of activity for nicotinic analgesics, we present here the first theoretical characterization of the conformational behaviour of ABT-594. Thus, its neutral (precursor) and protonated (active) forms are considered, both in vacuum and aqueous solution. To account for the influence of entropic effects, the most stable conformations are determined at physiological temperature, in thermostatical rather than on pure energetic terms. In addition, the effect of the interaction (binding) energy on the conformational equilibria is also simulated. For the more stable conformations found, an Atoms in Molecules (AIM) study is performed to characterize the observed structural stability.

Methodology

To describe the conformational behaviour of ABT-594, *ab initio* methodology has been applied including correlation energy at the MP2 level. As basis set, we have used the correlation consistent, double-zeta, cc-pVDZ basis set [20], which includes by definition polarization functions on hydrogen and heavy atoms. All the geometry optimizations are carried out using the quasi-Newton BERNY algorithm [21].

To have a realistic description of the molecular behaviour in aqueous solution (dielectric constant, $\epsilon = 78.39$) the solvent effect is described using the Polarizable Continuum Model (PCM) [22, 23]. In this approach, a van der Waals surface cavity is used, as well as a detailed description of the electrostatic potential. The cavity/dispersion contribution is parameterized considering the surface area. The PCM model performs a realistic description of the molecular shape. All the calculations are carried out using the Gaussian 98 package [24].

The structure and numbering convention for ABT-594 (in neutral and protonated form) are shown in Figure 1. The conformational flexibility is accounted for considering three dihedral angles, θ_1 , θ_2 and τ . θ_1 measures the torsion of the azetidylmethoxy moiety. θ_2 describes the rotation of the azetidinyll moiety. Finally, τ defines the orientation of the oxy-

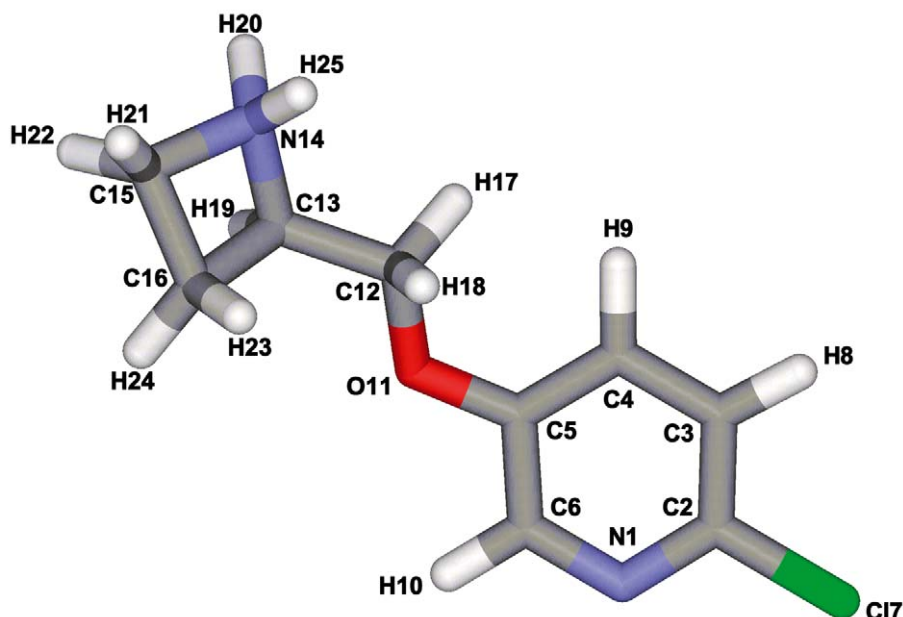


Figure 1. Structure and numbering convention of ABT-594 used in this work. The protonated form is shown. The neutral form lacks H25. The atoms' colour code is as follows: grey: carbon; blue: nitrogen; red: oxygen; green: chlorine; white: hydrogen.

gen lone pairs. Using the numbering of Figure 1, the θ_1 , θ_2 and τ torsional angles are defined as dihedrals C13C12O11C5, N14C13C12O11, and C12O11C5C4, respectively. For reasons described below, our conformational analysis focuses on the variation of θ_1 and θ_2 with τ restricted to values near 0° (though fully optimized for each θ_1 , θ_2 pair).

For the θ_1 and θ_2 angles, the positive sense of rotation is defined as clockwise, with C5 (or O11) placed closer to the observer and looking through the O11-C12 (or C12-C13) axis. A potential energy hypersurface is defined from a grid of points in θ_1 and θ_2 . This grid is obtained considering a range from 0° to 360° using increments of 60° for each angle. In vacuum, all the grid points have been fully optimized. From the grid, the local minima are identified and localized by full relaxation of the closer structures. The algorithmic limitations of the software employed force us to freeze the geometries for the solvated molecules at the values optimized in vacuum.

To take into account not only enthalpic but also entropic effects in the stability of the conformers we apply statistical thermodynamics. Thus, the original grid of energetic data is transformed in a detailed grid of values (100×100 points) placed at equal increments of the θ_1 and θ_2 large amplitude coordinates. This detailed hypersurface is derived from the original

one applying the Kriging interpolation method [25] with the Surfer 8 package [26]. Kriging is a form of weighted averaging where the weights are chosen in such a way that they minimize the estimation variance. From the energy data, we build a conformational partition function. As described in [27], we build the conformational partition function, Q_c , at temperature T , from the energy hypersurface, $E(\theta_1, \theta_2)$, by considering a Boltzmann distribution:

$$Q_c = \int_{\theta_1} \int_{\theta_2} \exp[-E(\theta_1, \theta_2)/kT] d\theta_1 d\theta_2, \quad (1)$$

where k represents the Boltzmann constant.

The double integral in Equation 1 is numerically evaluated using a bicubic spline [28] as:

$$Q_c = \sum_i^{\theta_1} \sum_j^{\theta_2} \sum_{l=0}^3 \sum_{m=0}^3 a_{ijlm} \frac{(\theta_1(i+1) - \theta_1(i))^{l+1}}{l+1} \frac{(\theta_2(j+1) - \theta_2(i))^{m+1}}{m+1}, \quad (2)$$

where the first two summations represent the grid of points in the θ_1 and θ_2 coordinates. The a_{ijlm} are the coefficients of the spline obtained from the energy hypersurface, $E(\theta_1, \theta_2)$. As detailed in [28], the spline, S , fulfills the interpolation condition, $S(\theta_1, \theta_2) = E(\theta_1, \theta_2)$, for all the grid data points. In

Table 1. Values of the θ_1 , θ_2 , and τ dihedrals, and energy difference, ΔE , for the most open structures of neutral and protonated ABT-594. Fully optimized geometries. Angles in degrees and energy in kJ mol^{-1} .

Form	θ_1	θ_2	τ	ΔE
Neutral ^a	180.4	172.1	179.7	0.0
Neutral ^b	180.6	171.8	359.2	1.1
Protonated ^a	180.3	168.1	180.9	0.0
Protonated ^b	180.2	167.5	0.1	3.7

^aElectron lone pairs of O11 and N1 in antieclipsed conformation.

^bElectron lone pairs of O11 and N1 in eclipsed conformation.

addition, S is continuously differentiable in $E(\theta_1, \theta_2)$, and $\partial^2 S / \partial \theta_1 \partial \theta_2$ is continuous in $E(\theta_1, \theta_2)$.

The conformational population, p , for given θ_1, θ_2 values is determined from Q_c as

$$p(\theta_1, \theta_2) = \exp[-E(\theta_1, \theta_2)/kT]/Q_c. \quad (3)$$

To account for the overall population in a given interval delimited by the values $\theta_1(i), \theta_2(i), \theta_1(j), \theta_2(j)$ we compute the double integral,

$$p(\Delta\theta_1, \Delta\theta_2) = \int_{\theta_1(i)}^{\theta_1(j)} \int_{\theta_2(i)}^{\theta_2(j)} p(\theta_1, \theta_2) d\theta_1 d\theta_2 \quad (4)$$

performing the numerical integration of a bicubic spline derived from $p(\theta_1, \theta_2)$. Equations 2–4 are evaluated using software developed at our laboratory that incorporates the numerical routines provided in [28].

To characterize the most stable structures, the AIM theory is applied by means of the package Morphy98 [29]. In all cases (neutral and protonated forms, in vacuum and solution), the AIM theory is applied from the corresponding one-determinantal electronic density functions.

Results and discussion

Structural results

As shown in Figure 1, conjugation of O11 with the pyridinic ring can appear for τ values close to 0° and 180° . In these conformations the electron lone pairs of oxygen are placed above and below the pyridinic ring plane, maximizing the overlap with the pyridinic π -system. To test the difference in energetic terms between the two possibilities, we have fully optimized the conformations with starting θ_1 and θ_2 values

of 180° (the most open structure) and τ values of 0° and 180° . The calculation has been performed for the neutral and the protonated forms. Table 1 collects the results after full relaxation of the geometry. We observed that the initial θ_1, θ_2 , and τ values change slightly during the optimization. The energy difference between conformers starting at $\tau = 0^\circ$ and 180° are 1.1 and 3.7 kJ mol^{-1} , for the neutral and protonated compounds, respectively. In both cases the most stable conformer corresponds to $\tau \approx 180^\circ$. This is a conformation where the electron lone pairs of O11 and N1 are placed in antieclipsed form. Thus, electronic repulsion is minimized, although the difference in energy (less than 1 kcal mol^{-1}) is too small to define a structurally preferred conformation.

These results suggest that on energetic grounds there is no clearly preferred conformation with respect to the τ angle. Comparison with other nicotinic agonists will be useful to clarify this question. Thus, DBO-83, a 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane derivative, exhibits morphine-like analgesic potency and efficacy [30]. This compound shows selectivity for the neuronal nAChR [30], as well as ABT-594 does. In DBO-83, an azo group is part of the aromatic ring. Thus, there is an additional nitrogen in sp^2 hybridization next to what could be considered the pyridinic nitrogen in ABT-594. In other words, we have the two electron lone pairs from the nitrogens eclipsing each other. Also, the compound known as RJR-2403 [(E)-N-methyl-4-(3-pyridinyl)-3-butene-1-amine] shows specificity for the neuronal nAChR [31]. RJR-2403 has a double bond between two carbon atoms in a relative position, to the pyridinic ring, equivalent to the oxygen atom in ABT-594. These data suggest that selectivity for the neuronal nAChR is associated with the presence of an electronegative zone oriented in the same direction as the electron lone pair of the electronegative atom involved in the putative hydrogen bond with the receptor site. For these reasons, we assign an initial value of $\tau = 0^\circ$ (in which the O11 and N1 electron pairs eclipse each other), and perform the full conformational analysis on θ_1 and θ_2 .

Figure 2 shows the fully relaxed two-dimensional energy hypersurfaces obtained for the neutral and protonated ABT-594 in vacuum. We can observe the existence of a quasi-threefold symmetry on the θ_1 and θ_2 coordinates. This fact results in nine possible minima in the hypersurface, on θ_1 and θ_2 . These minima correspond to θ_1 and θ_2 values close to $60^\circ, 180^\circ$ and 300° . Taking into account the different θ_1, θ_2 couples, we define the conformers of minimal energy as: I ($60^\circ,$

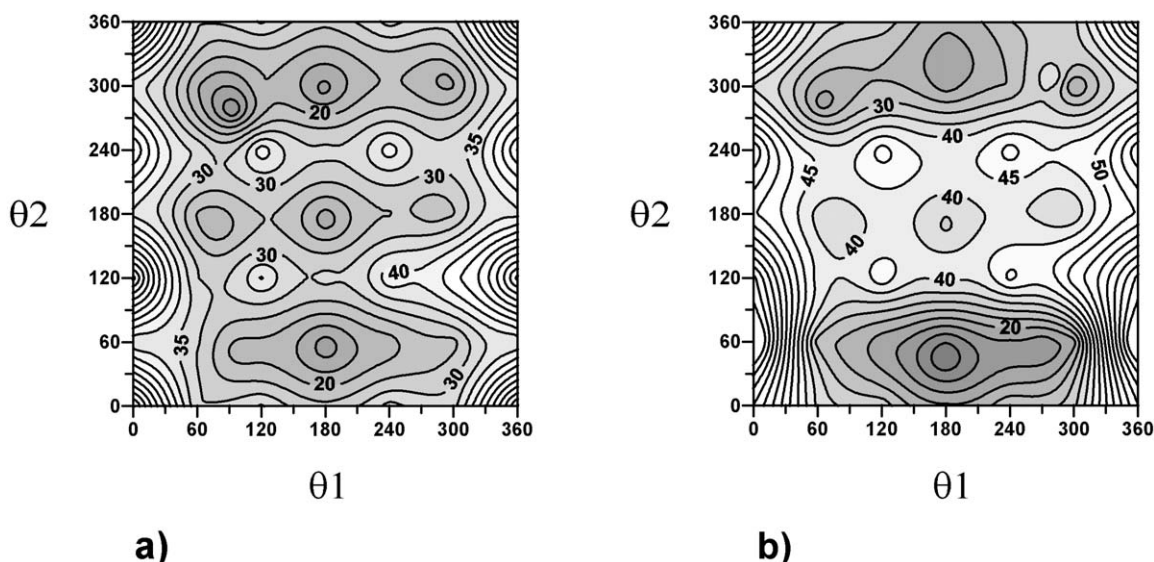


Figure 2. Potential energy hypersurfaces, in vacuum, of neutral (case a) and protonated (case b) ABT-594 for the torsional motion around the θ_1 and θ_2 dihedral angles. Interval between isocontour lines 5 kJ mol^{-1} . Angles in degrees. Darker zones correspond to lower energy zones.

Table 2. θ_1 and θ_2 values (in degrees) and energy increments (in kJ mol^{-1}) in vacuum for the different minima located on the conformational energy hypersurfaces of neutral and protonated ABT-594. Energetic data refer to the global minimum for each species.

Conformer	θ_1^a	θ_2^a	ΔE^a	θ_1^b	θ_2^b	ΔE^b
I	93.1	277.0	0.0	64.4	283.7	17.0
II	177.8	296.1	8.5	181.8	309.0	16.7
III	292.1	306.3	13.4	281.2	308.4	39.7
IV	78.2	168.3	15.1	78.3	167.3	34.7
V	180.6	171.8	12.4	180.2	167.5	34.0
VI	279.5	181.9	21.9	288.2	184.8	34.9
VII	97.2	51.8	17.3	–	–	–
VIII	180.4	53.6	7.3	178.7	43.8	0.0
IX	–	–	–	271.2	58.2	11.6

^aNeutral form.

^bProtonated form.

300°), II (180°, 300°), III (300°, 300°), IV (60°, 180°), V (180°, 180°), VI (300°, 180°), VII (60°, 60°), VIII (180°, 60°) and IX (300°, 60°). Their specific locations (after full relaxation of the geometry) for the neutral and protonated forms in vacuum are collected in Table 2. Figure 2 shows that the energy minima are organized in three zones for θ_2 values about 60°, 180° and 300°. These zones are separated from each other by two zones of local maxima, for θ_2 values close to 120° and 240°.

As shown in Table 2, the global minimum in the neutral form is found, in vacuum, for conformer I, at $\theta_1 = 93.1^\circ$, $\theta_2 = 277.0^\circ$. Close in energy, less than 9 kJ mol^{-1} ($2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$), we found conformers II and VIII, see Table 2. Conformer VIII is the closer one, placed at only 7.3 kJ mol^{-1} from the absolute minimum. Figure 2 shows that the maximum energy separating conformers I and II is about 20 kJ mol^{-1} ($4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$). The high energy zones separating the minima, at θ_2 values close to 240° and 120°, reach $35\text{--}40 \text{ kJ mol}^{-1}$ in height. These barriers separate conformers (I, II, III) from (IV, V, VI) and (IV, V, VI) from (VII, VIII, IX), respectively.

For the protonated form in vacuum, Figure 2 shows that conformer VIII becomes the global minimum. Table 2 shows that the closest local minimum, 11.6 kJ mol^{-1} ($2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$), corresponds to conformer IX. In addition, the high energy barriers reach $50\text{--}55 \text{ kJ mol}^{-1}$ for θ_2 values close to 240°, and 50 kJ mol^{-1} for θ_2 values about 120°. Therefore, on protonation, the conformational preference of ABT-594 experiences a large change. In addition, the protonated form seems to exhibit less conformational flexibility than the neutral one. However, this last point is difficult to quantify on pure energetic grounds.

Figure 3 shows the two-dimensional energy hypersurfaces obtained for the neutral and protonated ABT-594 in aqueous solution, using the geometries fully relaxed in vacuum. Table 3 collects the energy values obtained in solution at the minima found in

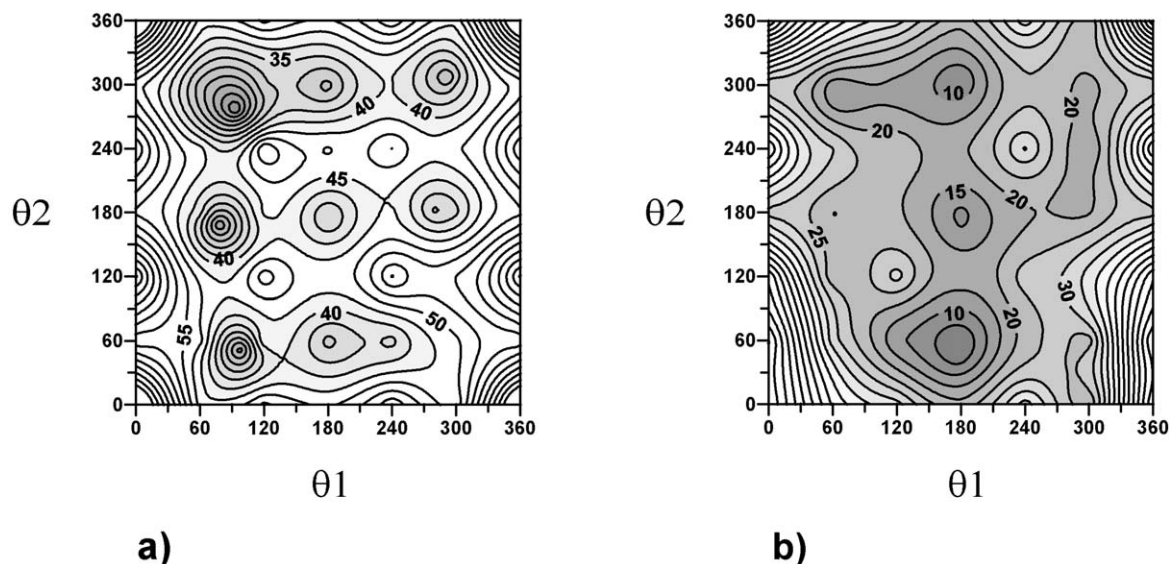


Figure 3. Potential energy hypersurfaces, in aqueous solution, of neutral (case a) and protonated (case b) ABT-594 for the torsional motion around the θ_1 and θ_2 dihedral angles. Interval between isocontour lines 5 kJ mol^{-1} . Angles in degrees. Darker zones correspond to lower energy zones.

Table 3. θ_1 and θ_2 values (in degrees) and energy increments (in kJ mol^{-1}) in aqueous solution for the different minima located on the conformational energy hypersurfaces of neutral and protonated ABT-594 in vacuum. Energetic data refer to the global minimum for each species.

Conformer	θ_1^a	θ_2^a	ΔE^a	θ_1^b	θ_2^b	ΔE^b
I	93.1	277.0	0.0	64.4	283.7	11.9
II	177.8	296.1	23.9	181.8	309.0	6.8
III	292.1	306.3	20.2	281.2	308.4	21.0
IV	78.2	168.3	10.6	78.3	167.3	21.7
V	180.6	171.8	30.2	180.2	167.5	9.7
VI	279.5	181.9	28.9	288.2	184.8	18.0
VII	97.2	51.8	12.1	-	-	-
VIII	180.4	53.6	30.0	178.7	43.8	1.6 ^c
IX	-	-	-	271.2	58.2	27.0

^aNeutral form.

^bProtonated form.

^cThe minimum is found at $\theta_1 = 180^\circ$, $\theta_2 = 60^\circ$.

vacuum. Due to the lack of geometry relaxation, the present results have only a qualitative meaning.

For the neutral form in solution, Table 3 shows that conformer I is still the most stable species. In addition, conformers IV and VII decrease in energy, whereas conformers II, III, V, VI and VIII experience an increase. The high energy zones around $\theta_2 = 240^\circ$ and $\theta_2 = 120^\circ$ increase in energy, reaching 55–60 kJ mol^{-1} . Figure 3 shows that the maxima of

energy for interconversion between the couples of conformers (I, II), (II, III), (IV, V), (V, VI) and (VII, VIII) also increase. Thus, in solution, higher energy barriers must be overcome to interconvert between the conformers of neutral ABT-594.

As expected, the protonated form exhibits the largest change in solution. The energy minimum is found at the VIII conformer. As seen in Figure 3, we have a zone of three close minima for $\theta_1 \approx 180^\circ$ (conformers II, V, VIII), which interconvert as a function of θ_2 . This behaviour represents an inversion with respect to that observed in all other cases, where the closest minima interconvert as a function of θ_1 . Tables 2 and 3 show that in solution all the conformers experience a decrease in energy, except conformer IX that increases from 11.6 to 27.0 kJ mol^{-1} . The global minimum is again found for conformer VIII, with θ_1 , θ_2 values of 180° , 60° , respectively. Thus, the minimum is slightly displaced from the placement in vacuum. Isoforms II and V are close to the minimum, placed at 6.8 and 9.7 kJ mol^{-1} , respectively. The high energy zone between conformers (II, V) and (V, VIII) reaches 15–20 kJ mol^{-1} . Comparison of Figures 2 and 3 shows that the energy hypersurface for the protonated form, in solution, is flatter than in vacuum. All these data indicate that the protonated (active) form in solution is more flexible, in energetic terms, than in vacuum. In particular, rotation on the θ_2 dihedral (rotation of

the azetidiny head) is favoured, whereas the θ_1 angle remains close to 180° .

Structural stability of conformers

To characterize the reasons for the different stabilities of the reference conformers I and VIII (for neutral and protonated forms, in vacuum and solution), we resort to the Atoms In Molecules (AIM) theory. The AIM theory characterizes a bond by an atomic interaction line (AIL) [32, 33]. An AIL is a path through the electron density, ρ , along which ρ is a maximum with respect to any neighbouring point. On the AIL lies the bond critical point (BCP), a second order saddle point where ρ reaches a minimum [32, 33]. The value of the electronic density at the BCP for a given bond, ρ_b , is correlated to the concept of bond order [33]. Thus, higher values of ρ_b correspond to higher degrees of conjugation and stronger bonds. In addition, the sign of the Laplacian of the charge density at the BCP, $\nabla^2\rho_b$, defines the interaction responsible for the bonding [32, 33]. A negative sign corresponds to a shared interaction, where the electronic charge is shared by the two nuclei. This is the case for covalent bonds. A positive sign corresponds to a closed-shell interaction, where the electronic charge is concentrated near each nucleus. This is the case for ionic and hydrogen bonds.

We have applied the AIM theory to conformers I and VIII in the neutral and protonated forms in vacuum and solution. The geometry fully optimised in vacuum is always used. For all the BCP, the AIL has been traced to identify unambiguously the bonded atoms. After computing the BCP points and its $\nabla^2\rho_b$ values, we observe the existence of non covalent bonds ($\nabla^2\rho_b > 0$). No variation is found when going from vacuum to solution. Figure 4 collects the structure of conformers I and VIII in neutral and protonated forms, as well as the non covalent bonds identified.

We find that for neutral ABT-594, in vacuum and solution, conformer I is stabilized by an intramolecular hydrogen bond. This bond involves the azetidiny moiety (N14) and a hydrogen (H9) of one carbon on the aromatic ring (C4), see Figure 1 and case (a) of Figure 4. Similar orientations of the pyrrolidine nitrogen and pyridine hydrogens are found in nicotine [34]. When protonated, in vacuum and solution, the conformer I is stabilized by a bond involving the azetidiny nitrogen (N14) and one carbon (C6) on the aromatic pyridinic ring, see case (c) of Figure 4. Thus, we have an interaction between the positively charged head and the aromatic ring. This suggests a typical

cation- π interaction. In fact, the positive $\nabla^2\rho_b$ value (0.039 a.u.) shows that this is a closed-shell interaction, as a cation- π interaction is. In addition, the ρ_b value is 0.011 a.u. These data agree with the values for ρ_b and $\nabla^2\rho_b$ found for the cation- π interaction of protonated aminopyridines with an ethylene group [35].

With respect to conformer VIII, it is always stabilized by an intramolecular hydrogen bond. In the neutral forms, vacuum and solution, the bond involves the oxygen atom (O11) and a hydrogen (H21) on carbon C15 (one carbon of the azetidiny moiety), see case (b) of Figure 4. In contrast, for the protonated forms, vacuum and solution, the hydrogen bond involves the oxygen (O11) and one hydrogen (H25) on the azetidiny nitrogen, see case (d) of Figure 4.

ρ_b can be used as an index of bond order, but direct comparison of bond strengths between different pairs of atoms using their ρ_b value is not correct [33]. Anyway, the exponential dependence of the bond order on ρ_b suggests that for neutral ABT-594 the N14H9 bond in conformer I is stronger than the O11H21 bond in conformer VIII (ρ_b values of 0.017 a.u. and 0.009 a.u., respectively). Additional information can be gained by comparison with the OH hydrogen bond in the methanal-water complex, which is weak (35 kJ mol^{-1}) and has a ρ_b of 0.018 a.u. [32]. This datum indicates that our $\rho_b = 0.009$ a.u. for the O11H21 bond in conformer VIII corresponds in fact to a very weak hydrogen bond. This explains the higher stability of conformer I in the neutral molecule. On the other hand, in the protonated ABT-594, the N14C6 cation- π interaction in conformer I is characterized by a ρ_b value of 0.011 a.u. In turn, the H25O11 hydrogen bond in conformer VIII exhibits a ρ_b value of 0.023 a.u. This hydrogen bond is, then, very much stronger than the O11H21 bond found in the neutral form, and than the hydrogen bond in the methanal-water complex. However, we cannot directly conclude that the N14C6 bond is weaker than the H25O11 one. We can get some insight of the strength of the N14C6 cation- π interaction comparing with the binding energy of some known cation- π complexes. Experimental measurements yield a binding energy of $9.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ for the $\text{N}(\text{Methyl})_4^+-\text{C}_6\text{H}_6$ cation- π complex [36]. This binding energy is comparable to the OH hydrogen bond energy previously quoted for the methanal-water complex (35 kJ mol^{-1}). Since the present H25O11 hydrogen bond has a ρ_b value of 0.023 a.u., it is much stronger than the OH hydrogen bond in the methanal-water complex, with $\rho_b =$

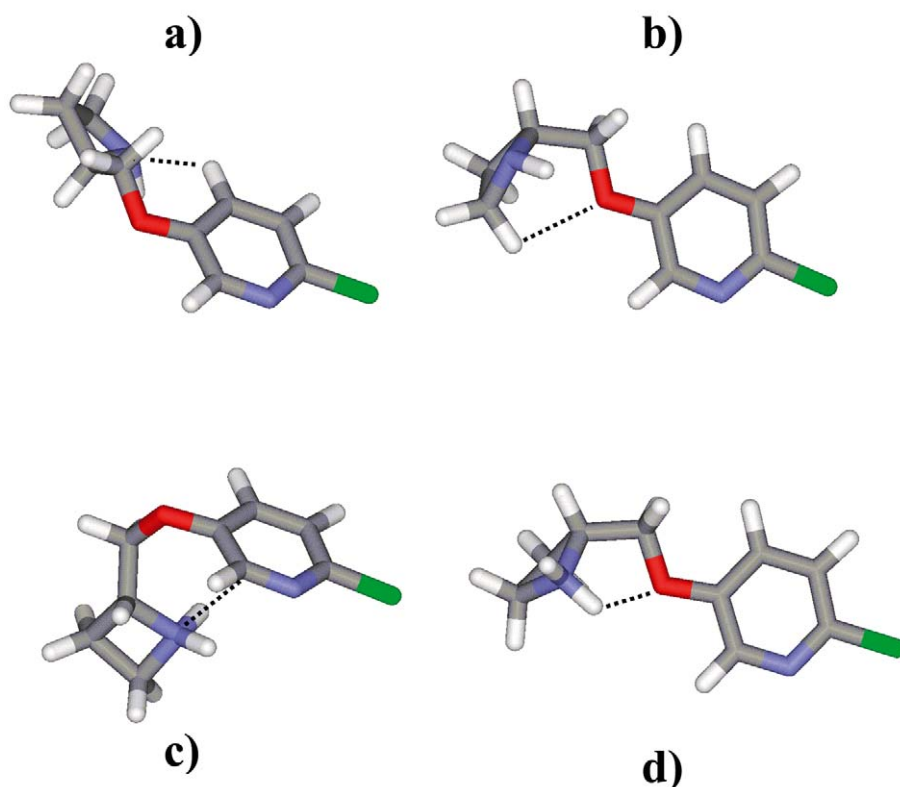


Figure 4. Structure of the preferred conformers found for neutral and protonated ABT-594. Geometries optimized in vacuum. The dotted lines represent the non-covalent bonds found. Case (a) conformer I in the neutral form. Dotted line: N14H9 hydrogen bond. Case (b) conformer VIII in the neutral form. Dotted line: O11H21 hydrogen bond. Case (c) conformer I in the protonated form. Dotted line: N14C6 cation- π bond. Case (d) conformer VIII in the protonated form. Dotted line: O11H25 hydrogen bond. The atoms' colour code is as follows: grey: carbon; blue: nitrogen; red: oxygen; green: chlorine; white: hydrogen.

0.018 a.u. It is then reasonable to conclude that the H25O11 hydrogen bond is stronger than the N14C6 cation- π interaction. This fact explains the preference of conformer VIII when ABT-594 is protonated.

Thermodynamic stability of conformers

Purely energetic (enthalpic) criteria are not a good index for the stability of conformers, since entropic effects are absent. Thus, to quantify the relative population of the different conformers at physiological temperature (37 °C), the conformational partition function was computed. A population analysis was performed as indicated in the Methodology section. Figures 5 and 6 show the population maps for the neutral and protonated forms, in vacuum and solution. To account quantitatively for the population of each isoform, we have evaluated the volume under each peak in Figures 5 and 6, by integrating a bicubic spline as a function of θ_1 and θ_2 . Since the base value of popula-

tion in the population maps is 10^{-6} – 10^{-8} , we select as limits of integration for each peak the zone delimited by a population value of 10^{-6} , as minimum. When two peaks are so close that the population between them is higher than 10^{-6} , we define the limit for integration in the minimum of population connecting the peaks. Table 4 collects the population values for the different conformers found in Figures 5 and 6.

Figure 5 and Table 4 show that in vacuum in the neutral form conformer I is the most populated isoform. This isoform is followed by conformers VIII, II, V and III with a much smaller population. For the protonated form, the only significantly populated isoforms are conformers VIII and IX. We see (Table 4) that for the neutral form, isoform I has the highest weight (65.6%). Conformations II and VIII are much less populated, but in similar amounts, 9.0% and 16.3%, respectively. Conformers V and III have a small population ($\leq 1.3\%$). On protonation, isoform VIII is dominant (95.8%). The small contribution from

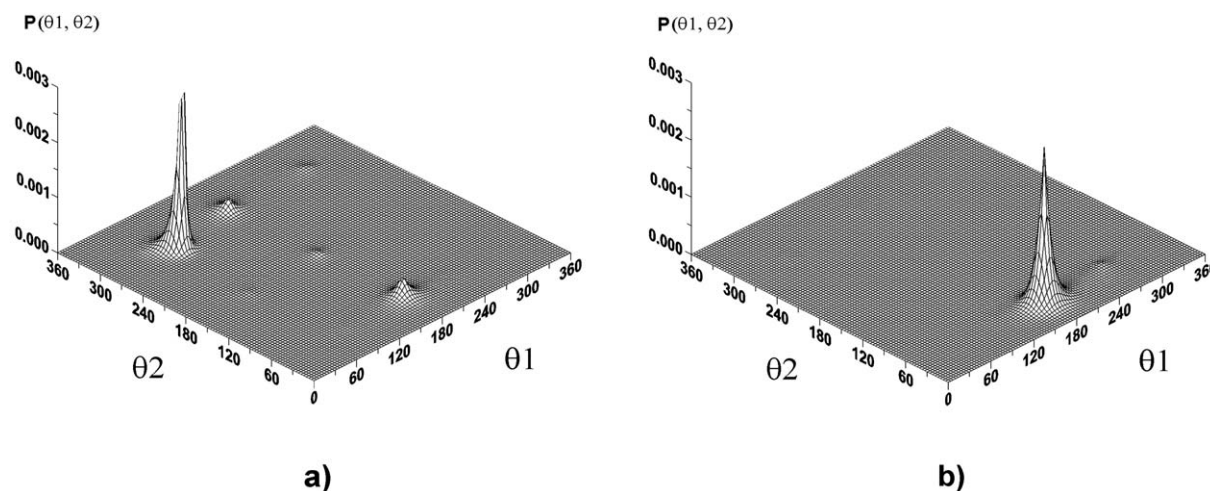


Figure 5. Wireframe map of conformational populations for neutral (case a), and protonated (case b) ABT-594 in vacuum at physiological temperature (37 °C). Angles in degrees.

Table 4. Population (in per cent) of the significantly populated conformers of the neutral and protonated ABT-594 in vacuum and aqueous solution. Data at physiological temperature (37 °C).

Conformer	Case ^a	Case ^b	Case ^c	Case ^d
I	65.6	–	97.8	–
II	9.0	–	–	10.1
III	1.1	–	–	–
IV	–	–	1.1	–
V	1.3	–	–	2.9
VIII	16.3	95.8	–	80.4
IX	–	2.4	–	–

^aNeutral ABT-594 in vacuum.

^bProtonated ABT-594 in vacuum.

^cNeutral ABT-594 in solution.

^dProtonated ABT-594 in solution.

isoform IX (2.4%) is almost merged with isoform VIII.

In solution, see Figure 6 and Table 4, the neutral form is essentially found in the isoform I (97.8%) with a very small contribution of conformer IV (1.1%). Thus, accessibility of conformations is reduced with respect to vacuum. On the other hand, Table 4 shows that in solution conformer VIII is the most populated, as in vacuum, but the population is reduced from 95.8% to 80.4%. In addition, several conformers are now significantly populated: isoforms II and V. Isoform II is populated in 10.1%, followed by isoform V with 2.9%. As seen in Figure 3, case (b), isoforms II and VIII are separated by a barrier, placed at $\theta_2 = 0^\circ$ (360°), of 25 kJ mol^{-1} ($5.9 \text{ kcal mol}^{-1}$) when

going from isoform VIII to II. The barrier is about 13 kJ mol^{-1} ($3.1 \text{ kcal mol}^{-1}$) if going from II to VIII. Thus, isoforms II and VIII interconvert by a torsion of the azetidiny moiety. These results indicate that conformer VIII (and conformer II, which is structurally equivalent by a torsion on θ_2) is the form existing in solution at physiological temperature.

The three-dimensional structures of the thermodynamically most stable conformers for neutral (isoform I) and protonated (isoform VIII) ABT-594 are collected in cases (a) and (d) of Figure 4. The fundamental difference between the two structures is that the charged nitrogen in the protonated form is closer to the electron pairs of oxygen, oriented toward the pyridinic nitrogen.

Internitrogen separation

The distance between the two nitrogens, r_{NN} , in the protonated form is of interest since it is one factor defining the 3D nicotinic pharmacophore [10–13]. Different values have been given for r_{NN} in several studies using different nicotinic agonists [10–13]. However, all the data are in the range 4.8 \AA [11] to 6.1 \AA [13]. Thus, we have analysed the relationship of the r_{NN} distance with the thermodynamically most stable conformers for the protonated ABT-594. These conformers interconvert as a function of θ_2 . Figure 7 collects the results for the r_{NN} distance as a function of the θ_2 angle. The θ_1 angle is kept fixed at 180° , and conformers VIII, V and II are included. We see that isoforms II and VIII, with $r_{\text{NN}} = 6.0 \text{ \AA}$, are within the range of r_{NN} values found in nicotinic agonists.

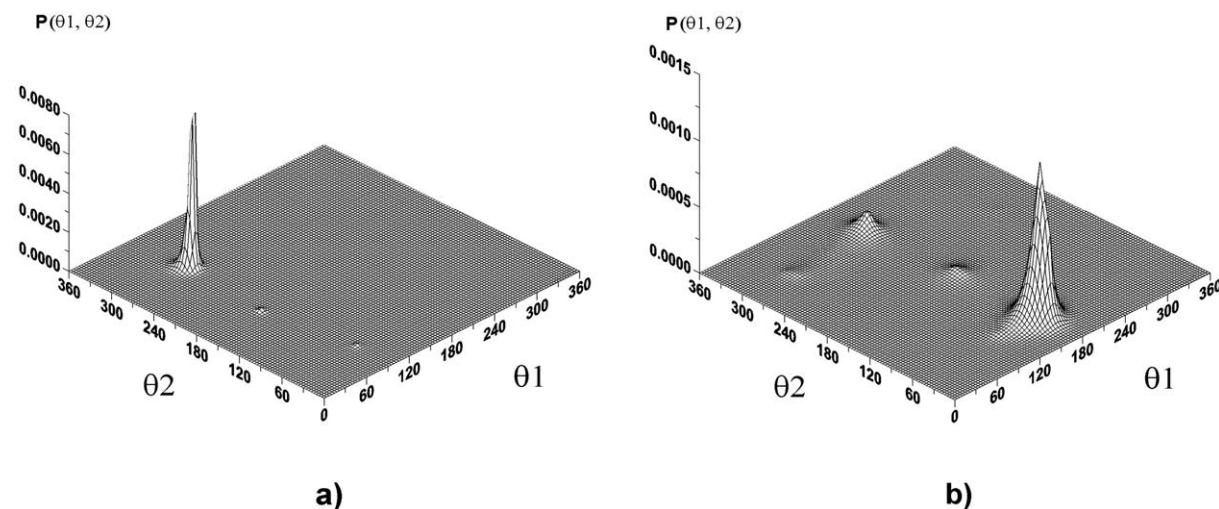


Figure 6. Wireframe map of conformational populations for neutral (case a), and protonated (case b) ABT-594 in solution at physiological temperature (37 °C). Angles in degrees.

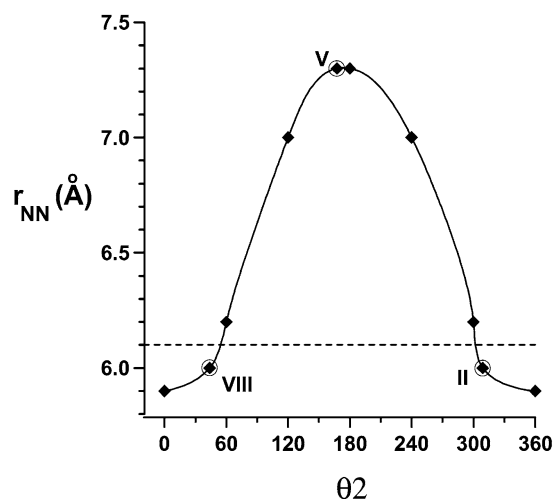


Figure 7. Internitrogen distance, r_{NN} (Å), as a function of the θ_2 dihedral in protonated ABT-594. Geometries optimized in vacuum. Isoforms II, V and VIII are included and indicated. The dashed line marks the upper limit of the range of r_{NN} distances for nicotinic agonists found in previous studies, $r_{NN} = 6.1$ Å.

On the other hand, isoform V with $r_{NN} = 7.3$ Å is outside the range by more than 1 Å. Thus, isoforms II and VIII are not only the preferred forms in solution, but also are candidates to be active conformations for binding to the nicotinic receptor. We can further analyse this point by considering the conformational behaviour when a given interaction energy comes into play. To simulate, qualitatively, the effect of the interaction energy, we consider the variation of population for a thermal bath with a kT factor higher than the one

at physiological temperature (2.77 kJ mol^{-1}). Thus, we consider a kT factor of 8 kJ mol^{-1} . This value is high enough to affect the population, and see the trend of the change, but not so high as to populate indiscriminately all the minima. Figure 8 shows the resulting population for the protonated ABT-594 in solution. We observe that the population of isoforms V and especially II and VIII increases, with the peaks beginning to merge. Thus, it seems that the energy provided by interaction with the receptor permits easy rotation of the azetidiny head between conformers II and VIII. In this form, adopting an optimal r_{NN} distance for binding to the receptor site is possible.

Conclusions

This work presents a study of the conformational behaviour and structural stability of the nicotinic analgesic ABT-594, (R)-5-(2-azetidiny methoxy)-2-chloropyridine. Thus, we consider the neutral (precursor) and protonated (active) forms in vacuum and in aqueous solution.

Working at the MP2/cc-pVDZ level, a conformational analysis is performed on the two torsional angles describing the orientation of the azetidiny group and the azetidiny methoxy moiety. In vacuum and solution the same conformer (conformer I) is the most stable in the neutral form. Here, the nitrogen of the azetidiny group is far from the electron pairs of the oxygen and from the pyridinic nitrogen. In the protonated form conformer VIII is the most stable in vacuum

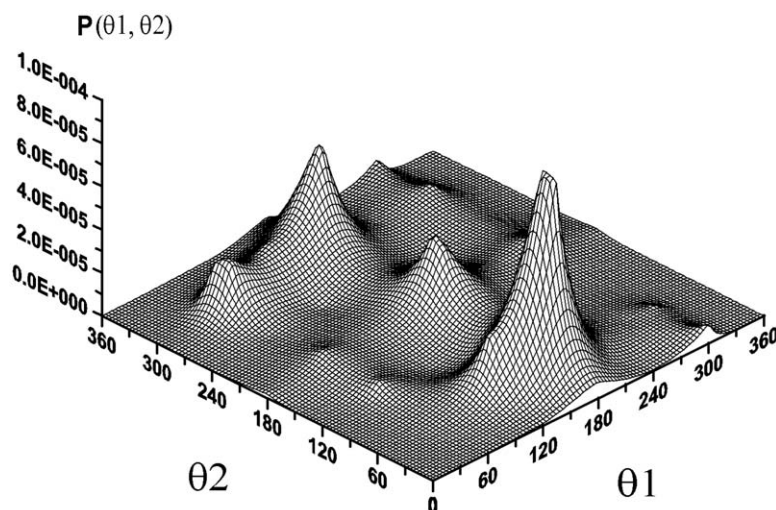


Figure 8. Wireframe map of conformational populations for protonated ABT-594 in solution in a thermal bath of $kT=8 \text{ kJ mol}^{-1}$. Angles in degrees.

and solution. This conformer has the additional proton on the azetidiny group oriented toward the electron lone pairs of the oxygen. For the neutral form, the effect of the solvent is to increase the barriers of interconversion between conformers. On the contrary, in the protonated form the solvent reduces the interconversion barriers. Thus, on energetic grounds, the active (protonated) form of ABT-594 is more flexible in solution.

To rationalize the structural stability of conformers I and VIII, we apply the atoms in molecules (AIM) theory. In the neutral form, conformer I is stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the azetidiny moiety and a hydrogen of the pyridinic ring. On the other hand, conformer VIII is stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the oxygen and a hydrogen from one carbon of the azetidiny group. The higher stability of conformer I is due to the higher strength of the hydrogen bond.

In the protonated form, conformer I stabilizes thanks to a cation- π interaction between the azetidiny head and the pyridinic ring. In turn, conformer VIII also exhibits an intramolecular hydrogen bond between the oxygen and one hydrogen on the nitrogen of the azetidiny group. The higher strength of this intramolecular hydrogen bond, over the cation- π interaction of conformer I, explains the higher stability of conformer VIII.

To account for entropic effects, we carried out a thermostistical analysis of the population of each conformer at physiological temperature. It was found

that conformer I is predominant in the neutral form. Its population increases when going from vacuum to solution. For the protonated ABT-594, conformer VIII is the most populated, although its population is reduced in solution. However, the closer conformer II (equivalent to conformer VIII by a torsion of the azetidiny group) increases in population. Thus, in solution at physiological temperature, the active, protonated, form of ABT-594 is found in the conformational space limited by isoforms VIII and II.

The effect of the interaction energy with the receptor site on the conformational preferences of protonated ABT-594 was simulated by placing the molecule in a thermal bath for a kT factor of 8 kJ mol^{-1} . We observe that the effect is to populate the conformers associated to the rotation of the azetidiny group. Thus, the interconversion between conformers VIII and II is favoured. In addition, we determined the internitrogen distance variation, which is one of the indices defining the nicotinic pharmacophore. It was found that only the zone corresponding to the interconversion of conformers VIII to II is placed within the boundaries of previously observed distances for nicotinic agonists. All these data suggest that the active conformation for the interaction of the protonated ABT-594 with the nicotinic receptor is within the conformational space delimited by conformers VIII to II.

Acknowledgements

The authors thank the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (grant # PAI-02-001) for financial support.

References

- MacPherson, R.D., *Pharmacol. Therapeut.*, 88 (2000) 163.
- Power, I. and Barrat, MsG., *Surg. Clin. North. Am.*, 79 (1999) 275; Stalnikowicz, R. and Rachmilewitz, D., *J. Clin. Gastroenterol.*, 17 (1993) 238.
- Davis, L., Pollock, L.J. and Stone, T.T., *Surg. Gynecol. Obstet.*, 55 (1932) 418.
- Badio, B. and Daly, J.W., *Mol. Pharmacol.*, 45 (1994) 563.
- Daly, J.W., Garraffo, H.M., Spande, T.F., Decker, M.W., Sullivan, J.P. and Williams, M., *Natural Products Reports*, 17 (2000) 131.
- Sullivan, J.P., Decker, M.W., Brioni, J.D., Donnelly-Roberts, D., Anderson, D.J., Bannon, A.W., Kang, C., Adams, P., Piattoni-Kaplan, M., Buckley, M.J., Gopalakrishnan, M., Williams, M. and Arneric S.P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271 (1994) 624.
- Spande, T.F., Garraffo, H.M., Edwards, M.W., Yeh, H.J.C., Pannell, L. and Daly, J.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 3475.
- Lloid, G.K. and Williams, M., *Pharmacol. Exp. Ther.*, 292 (2000) 461.
- Taylor, P. and Insel, P.A., *Molecular basis of drug action*, In: Pratt, W.B. and Taylor, P. (Eds.), *Principles of Drug Action*, third ed. Churchill Livingstone Inc., 1990, pp. 101–123.
- Beers, W.H. and Earl, B.L., *Nature*, 228 (1970) 917.
- Sheridan, R.P., Nilakantan, R., Dixon, J.S. and Venkataraghavan, R., *J. Med. Chem.*, 29 (1986) 899.
- Glennon, R.A., Herndon, J.L. and Dukat, M., *Med. Chem. Res.*, 4 (1994) 461.
- Abreo, M.A., Lin, N.H., Garvey, D.S., Gunn, D.E., Hettinger, A.M., Wasicak, J.T., Pavlik, P.A., Martin, Y.C., Donnelly-Roberts, D.L., Anderson, D.J., Sullivan, J. P., Williams, M., Arneric, S.P. and Holladay, M.W., *J. Med. Chem.*, 39 (1996) 817.
- Glennon, R.A. and Dukat, M., *Pharm. Acta Helv.*, 74 (2000) 103.
- Decker, M.W., Meyer, M.D. and Sullivan, J.P., *Expert Opin. Investig. Drugs*, 10 (2001) 1819.
- Holladay, M.W., Wasicak, J.T., Lin, N.H., He, Y., Ryther, K.B., Bannon, A.W., Buckley, M.J., Kim, D.J.B., Decker, M.W., Anderson, D.J., Campbell, J.E., Kuntzweiler, T.A., Donnelly-Roberts, D.L., Piattoni-Kaplan, M., Briggs, C.A., Williams, M. and Arneric, S.P., *J. Med. Chem.*, 41 (1998) 407.
- Bannon, A.W., Decker, M.W., Holladay, M.W., Curzon, P., Donnelly-Roberts, D., Puttfarcken, P.S., Bitner, R.S., Diaz, A., Dickenson, A.H., Porsolt, R.D., Williams, M. and Arneric, S.P., *Science*, 279 (1998) 77.
- Donnelly-Roberts, D.L., Puttfarcken, P.S., Kuntzweiler, T.A., Briggs, C.A., Anderson, D.J., Campbell, J.E., Piattoni-Kaplan, M., McKenna, D.G., Wasicak, J.T., Holladay, M.W., Williams, M., and Arneric, S.P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285 (1998) 777.
- Niño, A., Muñoz-Caro, C., Carbó-Dorca, R. and Girones, X., *Biophys. Chem.*, 104 (2003) 417.
- Dunning, Jr. T.H., *J. Chem. Phys.*, 90 (1989) 1007.
- Schlegel, H.B., *J. Comput. Chem.*, 3 (1982) 214.
- Cossi, M., Barone, V., Cammi, R. and Tomasi, J., *Chem. Phys. Lett.*, 255 (1996) 327.
- Barone, V., Cossi, M. and Tomasi, J., *J. Chem. Phys.*, 107 (1997) 3210.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Zakrzewski, V.G., Montgomery, J.A. Stratmann, R.E. Jr., Burant, J.C., Dapprich, S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Kudin, K.N., Strain, M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Petersson, G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Cioslowski, J., Ortiz, J.V., Baboul, A.G., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle, E.S. and Pople, J.A., *Gaussian 98, Revision A.7*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.
- Cressie, N., *Math. Geol.*, 22 (1990) 239; Oliver, M.A. and Webster, R., *Int. J. Geogr. Inf. Systems.*, 4 (1990) 313; Cressie, N., *Statistics for Spatial Data*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1993.
- Surfer 8.0. *Surface Mapping System*. Golden Software Inc., 2002.
- Farnell, L., Richards, W.G. and Ganellin, C.R., *J. Theor. Biol.*, 43 (1974) 389; Richards, W.G., *Quantum Pharmacology*, Second Edition. Butterworth & Co., 1983; Grant, G.H. and Richards, W.G., *Computational Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1995.
- Engeln-Müllges, G. and Uhlig, F., *Numerical Algorithms with Fortran*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1996.
- MORPHY98, a topological analysis program written by P.L.A. Popelier with a contribution from R.G.A. Bone, UMIST, Manchester, UK, 1998.
- Barlocco, D., Cignarella, G., Tondi, D., Vianello, P., Villa, S., Bartolini, A., Ghelardini, C., Galeotti, N., Anderson, J., Kuntzweiler, T.A., Colombo, D. and Toma, L., *J. Med. Chem.*, 41 (1998) 674.
- Papke, R.L., Webster, J.C., Lippiello, P.M., Bencherif, M. and Francis, M.M., *J. Neurochem.*, 75 (2000) 204.
- Popelier, P., *Atoms in Molecules*. Prentice Hall, New York, 2000.
- Bader, R.F.W., *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1995.
- Takeshima, T., Fukumoto, R., Egawa, T. and Konaka, S., *J. Phys. Chem. A*, 106 (2002) 8734.
- Muñoz-Caro, C. and Niño, A., *Biophys. Chem.*, 96 (2002) 1.
- Ma, J.C. and Dougherty, D.A., *Chem. Rev.*, 97 (1997) 1303.

Effect of the Conformational Kinetic Energy and the Rotovibrational Coupling in the Conformational Population of Bioactive Compounds

A. Niño,* C. Muñoz-Caro, M. Mora, and S. Reyes

Grupo de Química Computacional, E. S. Informática, Universidad de Castilla-La Mancha, Paseo de la Universidad 4, 13071, Ciudad Real (Spain)

Received: August 21, 2003; In Final Form: October 2, 2003

This work presents the determination of a semiclassical conformational partition function for bioactive compounds. The proposed partition function includes the effect of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy, through the rotovibrational G matrix. In addition, the model considers a relaxed potential that includes the effect of the nonconformational, internal, coordinates. Comparison of results from harmonic and anharmonic vibrational models shows that the present partition function is a good approximation to the quantum one. The effect of the rotovibrational coupling and conformational kinetic energy, i.e. the G matrix, on the partition function is analyzed considering the biologically active, protonated, forms of nicotine and the nicotinic analgesic ABT-594. All energetic and structural data are derived from ab initio results at the MP2/cc-pVDZ level. Only two conformers are found to be significantly populated at physiological temperature in the nicotine case. The relative population of both conformers is clearly affected by the value of the G matrix. For ABT-594, several minima on the conformational potential energy hypersurface are found. However, only one conformer collects the population. Here, the distribution of population is only slightly affected by the G matrix. Performing simulations with a double minima potential, we show that for conformers separated by energy differences about or higher than 2 kcal mol⁻¹, the effect of the G matrix can be neglected.

Introduction

Conformational flexibility is an important factor to take into account when modeling the activity of bioactive compounds. In particular, the three-dimensional arrangement of pharmacophoric groups is a function of the conformational coordinates. To adopt the optimal disposition for interaction with the receptor's active site, the conformational coordinates of the bioactive agent must change accordingly.

Usually, the conformational problem is tackled from a conformational analysis on the considered coordinates. Thus, on the grounds of the Born–Oppenheimer approximation, we obtain a potential energy hypersurface for the conformational motion. Minima on this hypersurface (and specially the global minimum) are considered as candidates for the optimal pharmacophore distribution. However, this information lacks the entropic effects. On the other hand, when interacting with the receptor site, the conformation of interest is the one corresponding to a minimum of Gibbs energy for the ligand-active site complex. Therefore, two conclusions can be drawn. First, rather than using energetic criteria, a thermostistical point of view is needed. Second, to account for the possible variation of conformation when interacting with the receptor, the set of conformations accessible for a given interaction energy must be considered. From this point of view, the key point is the evaluation of a conformational partition function.

The conformational partition function for bioactive compounds is usually obtained from a Boltzmann distribution involving only the conformational potential energy.^{1–3} This technique is rooted on a series of works related to the determination of the semiclassical conformational partition

function in macromolecules.^{4–7} From the physical standpoint, the exclusive use of the conformational potential energy implies two assumptions. First, the inertial moments remain unchanged over all the conformational space. Second, the conformational kinetic energy is also constant. Strictly speaking, these two assumptions are unjustified for a typical bioactive compound where the conformational variation is translated in the motion of large moieties within the molecule.

The computation of a conformational partition function using approximate molecular models was considered by Gō and Scheraga in ref 7. These authors consider two models. The first one is the “classical flexible model”. In this case, the conformational potential energy is defined by the minimum potential energy for fixed (time-averaged) values of the conformational coordinates. The kinetic energy is handled in Cartesian coordinates. In the semiclassical partition function, the integration of the momenta (kinetic part) gives a constant term. Integration of the coordinates (potential part) is carried out in internal coordinates. However, in this last integration, both the Jacobian of the Cartesian to internal coordinates transformation and the force constants for the nonconformational coordinates are considered constant. The result depends only on the conformational potential energy. The second model considered in ref 7 is the “classical rigid model”. Here, the potential depends only on the conformational coordinates for fixed values of the remaining internal coordinates. The semiclassical partition function is obtained using internal coordinates, excluding the nonconformational coordinates and the overall rotation. Integration of momenta yields a matrix of kinetic terms depending on the conformational coordinates. Now, the partition function involves both the conformational kinetic energy matrix and the conformational potential energy. The detailed comparison presented in ref 7 shows that both models are approximate, with

* Corresponding author. E-mail: quimcom@uclm.es, Tel.: (+34)-926295362, Fax: (+34)926295354.

the first (the flexible model) being more realistic and accurate than the second (the rigid model).

The problem of the construction of a less approximate molecular model for conformational motions can be tackled from the standpoint of the theoretical study of large amplitude vibrations. These vibrations are responsible for the conformational flexibility. The classical example of such vibrations is the torsional motion (internal rotation) of methyl groups. These studies begin by solving the vibrational Schrödinger equation for the anharmonic, large amplitude variation of internal coordinates.⁸ Today ab initio methodology is used, and the potential energy for the considered motion is obtained by relaxing the molecular geometry for fixed values of the large amplitude (conformational) coordinates.⁹ In turn, the kinetic energy terms are obtained from the elements of the rotovibrational G matrix,¹⁰ considering the overall rotation and the conformational coordinates. These kinetic terms are derived from the relaxed molecular structures.⁹ In this form, the vibrational energy levels are computed. The results show that the theoretical vibrational energy levels differ from the experimentally observed levels by a few wavenumbers, see for instance refs 9c and 9d. These studies indicate that the effect of the variation of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy is relevant. From the point of view of the potential, the data show that the potentials obtained by relaxing the molecular geometries for fixed values of the conformational coordinates actually represent the potential for the conformational motion. These potentials are formally very close, but not identical, to the potential used in the “classic flexible model” for the computation of the partition function.⁷ In addition, the reliability of the results depends mainly on the quality of the potential energy function, see for instance ref 11.

In this work, we revisit the calculation of a conformational partition function for molecular systems. We consider systems with the size of usual bioactive compounds, where ab initio methodology can be applied. Thus, we develop a semiclassical rotovibrational partition function for a molecule with several conformational degrees of freedom. The model considers the overall rotational and the conformational coordinates, with a fully relaxed potential for fixed conformational coordinates. No additional restrictions are introduced. Thus, the model includes the effect of the conformational kinetic energy and the rotovibrational coupling. In addition, we analyze the validity of the semiclassical partition function by comparison with results for harmonic and large amplitude vibrational models. Finally, the effect of the conformational kinetic energy and the rotovibrational coupling in the conformational populations of nicotine and the new nicotinic analgesic ABT-594 is presented.

Theoretical Treatment

We start by considering a molecule with m conformational degrees of freedom. Using internal coordinates, the semiclassical partition function for the rotovibrational motions, z_{rv} , is obtained as¹²

$$z_{rv} = h^{-(m+3)} \int_Q \int_P \exp[-H(P,Q)/kT] \prod_i^{m+3} dp_i \quad (1)$$

where $H(P,Q) = T(P) + V(Q)$ is the classical Hamiltonian defined in terms of conjugated pairs of momenta, P , and coordinates, Q , for the overall rotation and conformational motions. For N atoms, the kinetic energy, $T(P)$, can be obtained

in velocity representation as^{8,13}

$$T(V) = \frac{1}{2} \sum_{\alpha}^N m_{\alpha} V_{\alpha} \cdot V_{\alpha} \quad (2)$$

where

$$V_{\alpha} = V + (\omega \times \mathbf{r}_{\alpha}) + \sum_{i=6}^{3N} \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_i} \dot{q}_i \quad (3)$$

In eq 3, V represents the velocity of the center of mass, ω is the angular velocity, \mathbf{r}_{α} is the position vector of the α atom, and q_i are the internal coordinates. By using center of mass coordinates, matrix notation, and deriving $T(V)$ with respect to the velocities, we obtain the kinetic energy in terms of momenta⁸

$$T(P) = \frac{1}{2} \mathbf{P}^T \mathbf{G} \mathbf{P} \quad (4)$$

Here, \mathbf{P} is the column matrix of momenta, \mathbf{P}^T its transpose, and \mathbf{G} is the rotovibrational matrix defined as

$$\mathbf{G} = \begin{bmatrix} \mathbf{I} & \mathbf{X} \\ \mathbf{X}^T & \mathbf{Y} \end{bmatrix}^{-1} \quad (5)$$

In eq 5, \mathbf{I} represents the inertial tensor, i.e., the pure rotational contribution, \mathbf{Y} corresponds to the pure vibrational contribution, and \mathbf{X} is the rotation–vibration interaction (Coriolis term). The elements of these matrices are obtained from the molecular geometry as

$$\begin{aligned} I_{ij} &= - \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} \mathbf{r}_{\alpha i} \mathbf{r}_{\alpha j} \\ I_{ii} &= \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} [(\mathbf{r}_{\alpha})^2 - \mathbf{r}_{\alpha i}^2] \\ X_{ij} &= \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} \left[\mathbf{r}_{\alpha} \times \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_i} \right]_j \\ Y_{ij} &= \sum_{\alpha}^n m_{\alpha} \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_i} \cdot \frac{\partial \mathbf{r}_{\alpha}}{\partial q_j} \end{aligned} \quad (6)$$

Using eq 4 and the potential energy, the quantum mechanical Hamiltonian for pure vibrations can be obtained by applying the Podolsky transformation.¹⁴ The expression reads⁸

$$\hat{H} = - \sum_i^m \sum_j^m \left[B_{ij} \frac{\partial^2}{\partial q_i \partial q_j} + \left(\frac{\partial B_{ij}}{\partial q_i} \right) \frac{\partial}{\partial q_j} \right] + V(Q) \quad (7)$$

where the kinetic terms B_{ij} are defined as $B_{ij} = \hbar^2 g_{ij}/2$, with g_{ij} being the corresponding element of the G matrix. The potential $V(Q)$ is given in internal coordinates. Equation 7 will be applied afterward.

Equation 1 is defined in the framework of the Hamilton formulation of mechanics. Thus, we must work with holonomic systems,¹⁵ in other words, with systems where the generalized coordinates are independent of each other. However, when using the ω angular velocity we have a constraint (constant ω) between the components of the velocity, but not between the coordinates. So, the constraint cannot be expressed as a relation between the coordinates in the form $f(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n) = 0$. This is another way of saying that the coordinates are nonholonomic.¹⁵

Therefore, eq 4 cannot be introduced directly in eq 1. To use eq 1 we must begin with a holonomic set of overall rotational coordinates, for instance, the usual Euler angles (θ , ϕ , ψ).¹⁵ Thus, eq 1 becomes

$$z_{\text{rv}} = h^{-(m+3)} \int_Q \int_P \exp[-T_E(P)/kT] \times \exp[-V(Q)/kT] dP_\theta d\theta dP_\phi d\phi dP_\psi d\psi \prod_{i=4}^{m+3} dp_i dq_i \quad (8)$$

where T_E indicates that the kinetic energy is expressed in terms of Euler angles. Thus, eq 4 can be introduced in eq 8 using the principal axis as internal axis. In this form, it is possible to change the differential of Euler moments to a differential of angular moments using the Jacobian of the transformation:¹⁵ $\sin(\theta)$. Integrating the Jacobian and substituting eq 4 in eq 8 we obtain

$$z_{\text{rv}} = 8\pi^2 h^{-(m+3)} \int_Q \int_P \exp[-\mathbf{P}^T \mathbf{G} \mathbf{P} / 2kT] \prod_{i=1}^{m+3} dp_i \times \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (9)$$

In eq 9, the kinetic energy part, i.e., the \mathbf{G} matrix, depends on the coordinates, and the coordinates considered are reduced to the conformational ones.

The kinetic energy term can be integrated by reducing the rotovibrational \mathbf{G} matrix to a diagonal form, \mathbf{D} , using an orthogonal transformation,

$$\mathbf{D} = \mathbf{W}^T \mathbf{G} \mathbf{W} \quad (10)$$

where \mathbf{W} is the transformation matrix. The matrix \mathbf{D} represents the kinetic matrix in a coordinate system where it is diagonal. Thus, the effect of the \mathbf{D} matrix is to perform a rotation of coordinates from the principal axis system. The matrix of the transformation to the new momenta system is \mathbf{W} . Since \mathbf{W} is orthogonal, its determinant (Jacobian of the transformation) is unity. Therefore,

$$z_{\text{rv}} = 8\pi^2 h^{-(m+3)} \int_Q \prod_{i=1}^{m+3} \left[\int_P \exp[-d_{ii}/2kT] dp_i \right] \times \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (11)$$

where d_{ii} are the diagonal elements of the \mathbf{D} matrix. Since

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \exp(-ax^2) dx = (\pi/a)^{1/2} \quad (12)$$

we obtain,

$$z_{\text{rv}} = 8\pi^2 \left(\frac{2\pi kT}{h^2} \right)^{(m+3)/2} \int_Q |G(Q)|^{-1/2} \times \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (13)$$

where $|G(Q)|$ is the determinant of the \mathbf{G} matrix. Equation 13 resembles the semiclassical rotovibrational partition function for the ‘‘classical rigid model’’ of ref 7. However, here the rotovibrational coupling is included in the \mathbf{G} matrix. The model

is fully flexible, since all the internal coordinates are allowed to vary when obtaining the potential.

From eq 13, the population of a conformer defined by an interval ΔQ with limiting values of the m conformational coordinates Q_1 and Q_2 is

$$p(\Delta Q) = \left[\int_{Q_1}^{Q_2} |G(Q)|^{-1/2} \exp[-V(Q)/kT] \prod_i dq_i \right] / z_{\text{rv}} \quad (14)$$

At this point, it is interesting to analyze the physical nature of the potential used in eq 13 in relation to the potentials used in previous molecular models.⁷ We consider the potential at any one of the points, a , where the nonconformational coordinates are fully relaxed. For a molecule of N atoms and m conformational coordinates, expanding in Taylor series up to second order and considering the equilibrium condition respect to the nonconformational coordinates, we obtain

$$V_a = V_a^0 + \sum_i^m \left(\frac{\partial V}{\partial q_{i,a}} \right) \Delta q_i + \frac{1}{2} \sum_i^m \sum_j^m \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) \Delta q_i \Delta q_j + \sum_i^m \sum_{j=m+1}^{3N-6} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) \Delta q_i \Delta q_j + \frac{1}{2} \sum_{i=m+1}^{3N-6} \sum_{j=m+1}^{3N-6} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) \Delta q_i \Delta q_j \quad (15)$$

Equation 15 shows that, for a linear approach, the potential is exactly a function of the m conformational coordinates. The second, third, and fourth terms exhibit a direct dependence on the conformational coordinates. The fourth and fifth terms involve nonconformational internal coordinates. In particular, the fifth term represents the effect of the nonconformational force constants. In ref 7 the ‘‘flexible model’’ assumes these force constants to be independent of the conformational coordinates. Thus, they emerge from the integral sign. However, the force constants depend parametrically on the conformational coordinates. Therefore, they should be kept in the integral. By using a relaxed potential, as defined in this work, we are taking into account this effect.

Results

Validity of the Semiclassical Approach. Rotational energy levels are so close at ambient temperature that the semiclassical approach is a good approximation. On the other hand, for the usual value of vibrational frequencies (say, in the range 1000–3000 cm^{-1}), the separation between the energy levels is higher than the ambient kT factor (about 200 cm^{-1}). Thus, the semiclassical approach is not applicable. However, the frequencies associated with the conformational motions (large amplitude vibrations) are low-frequency vibrations. For instance, the separation between the two first vibrational energy levels is calculated to be 141.43 and 48.35 cm^{-1} , for the methyl rotation of acetaldehyde^{9a} and the rotation of the keto groups in malonaldehyde,^{9c} respectively. In addition, the higher the molecular moiety experiencing the conformational motion, the smaller the kinetic B term in the quantum mechanical Hamiltonian, eq 7, and the smaller the vibrational frequency. It seems that for usual bioactive compounds, where the conformational changes affect groups higher than methyl or keto groups, the semiclassical approach could be an acceptable approximation. This assumption needs quantification.

We can get some insight on this problem by using the harmonic oscillator model at physiological temperature, 37 °C (310.15 K). The quantum mechanical vibrational partition

function is given by¹²

$$z_v^Q = \exp[-hv_0/2kT]/(1 - \exp[-hv_0/kT]) \quad (16)$$

where the origin of energies has been taken in the zero of energies. In turn, the semiclassical vibrational partition function obtained from eq 16 is given as $z_v^{SC} = (kT - hv_0/2)/hv_0$. The difference between z_v^Q and z_v^{SC} can be quantified by defining an error function, E , (in percent) as

$$E = 100(z_v^Q - z_v^{SC}/z_v^Q) \quad (17)$$

Figure 1 shows the error, E , as a function of ν_0 at physiological temperature. Fundamental frequencies up to 200 cm^{-1} are considered. We observe a linear variation of the error in this range of frequencies. In particular, the error is smaller than 10% for $\nu_0 \leq 44 \text{ cm}^{-1}$.

To compare with the previous results, it is necessary to determine the range of anharmonic frequencies involved in the conformational motion of bioactive compounds. Thus, we simulate periodic motions with several periodicities, using potentials of the form

$$V(\theta) = V_0 + V_0 \cos(n\theta) \quad (18)$$

In eq 18, V_0 is half the barrier height, $V_0 = H/2$, and n is the periodicity. Periodicities of 1, 2, and 3 are considered. We consider small (1 kcal mol^{-1}), medium (5 kcal mol^{-1}), and large (10 kcal mol^{-1}) barriers. As kinetic terms, we consider values of 1.0, 0.5, and 0.1 cm^{-1} for the B term, eq 7. These B values correspond to molecular moieties involving several heavy atoms (compare with the constant B term of 8.918 cm^{-1} for the methyl group in acetaldehyde^{9c} or the 2.856 cm^{-1} for the keto group in malonaldehyde^{9e}). The vibrational Hamiltonian, eq 7, is solved variationally in the free rotor basis using the program NIVELON,¹⁶ which implements the methodology developed and described in refs 8c–8e. For two-fold and three-fold periodicities, the system can be classified under G_2 and G_3 nonrigid groups, isomorphic to the C_2 and C_3 point groups, respectively. Thus, the following symmetry adapted basis functions were employed for each irreducible representation:

G_2 group

- a: $\cos(2n\theta)$, $\sin(2n\theta)$
 b: $\cos((2n \pm 1)\theta)$, $\sin((2n \pm 1)\theta)$

G_3 group

- a: $\cos(3n\theta)$, $\sin(3n\theta)$
 e: $\cos((3n \pm 1)\theta)$, $\sin((3n \pm 1)\theta)$ (19)

with $n = 0, 1, 2, \dots$. A total of 400 basis functions were used to determine the stack of vibrational energy levels. To compare with the harmonic oscillator model, the position of the first vibrational energy level, E_0 , measured from the bottom of the potential well, is selected. We consider that this datum defines a “harmonic” frequency as $\nu_0 = 2E_0$. Table 1 collects the ν_0 results of the simulations for the different combinations of kinetic terms and potential functions.

Table 1 shows that ν_0 , and then the error for the associated semiclassical partition function, increases with the periodicity of the motion, with the B term, and with the potential barrier. The higher ν_0 is found for $B = 1.0 \text{ cm}^{-1}$ and a barrier of 10 kcal mol^{-1} in the three-fold case. The error, eq 17, is 39.2%. On the other hand, the smallest ν_0 , 5.9 cm^{-1} , appears in the

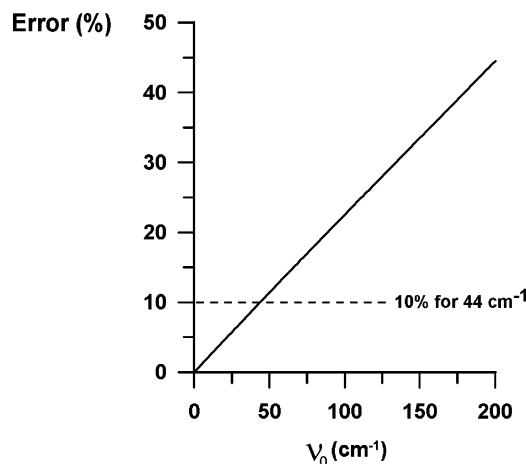


Figure 1. Error (in percent) between the quantum and semiclassical vibrational partition functions for the range of frequencies 1–200 cm^{-1} . Data at physiological temperature (37 °C).

TABLE 1: Fundamental Frequencies of Vibration Obtained as Twice the Energy, Measured from the Bottom of the Potential Well, of the First Vibrational Energy Level for Several Anharmonic Models^a

B (cm^{-1})	H (kcal mol^{-1})	ν_0 (cm^{-1}) ^b	ν_0 (cm^{-1}) ^c	ν_0 (cm^{-1}) ^d
1.0	1.0	18.6	36.9	55.0
0.5	1.0	13.2	26.2	39.1
0.1	1.0	5.9	11.8	17.6
1.0	5.0	41.7	82.0	124.4
0.5	5.0	29.5	58.1	88.2
0.1	5.0	13.2	26.0	39.6
1.0	10.0	59.0	117.8	176.4
0.5	10.0	41.8	83.4	124.9
0.1	10.0	18.7	37.4	56.0

^a The table includes the kinetic term, B , and the height of the barrier, H , for the potentials considered. ^b No periodicity. ^c Two-fold periodicity. ^d Three-fold periodicity.

nonperiodical case for $B = 0.1 \text{ cm}^{-1}$ and for a barrier of 1.0 kcal mol^{-1} . Here, the error amounts to 1.4%. However, the barriers for conformational variations are usually smaller than 10 kcal mol^{-1} . In addition, the B kinetic terms for motions involving several heavy atoms are smaller than 1.0 cm^{-1} (for instance, a maximum value of 0.27 cm^{-1} for nicotine). Also, the periodicity decreases with the complexity of the molecule. Thus, a realistic average case can be a barrier of 5 kcal mol^{-1} , for 2-fold or no periodicity, and a B term of 0.1 or 0.5 cm^{-1} . Table 1 shows that in these conditions and two-fold periodicity, ν_0 , amounts to 26.0 and 58.1 cm^{-1} , respectively. Using eq 17, the respective errors, are 6.0% and 13.2%. In the nonperiodical case, the corresponding errors are 3.0% and 6.7%. Thus, an error of a 10% can be used as an upper reference value.

This value can be considered as an upper limit for the following reasons. First, when considering the stack of energy levels for a conformational motion, see refs 9c and 9e, a higher density of states is observed than is found for a harmonic motion. Thus, the energy levels are closer than predicted by the harmonic model. This effect is translated in a higher number of states populated at a given temperature and, accordingly, in a smaller difference between the quantum and semiclassical partition functions. Second, when analyzing a conformational population distribution, we are using relative values arising from the same molecular model. Therefore, the error of the relative measure can be expected to be smaller than that of the individual data due to the cancellation of systematic errors. This same effect has been shown to reduce, in the worst case, almost by 50% the relative basis set superposition error in a set of several

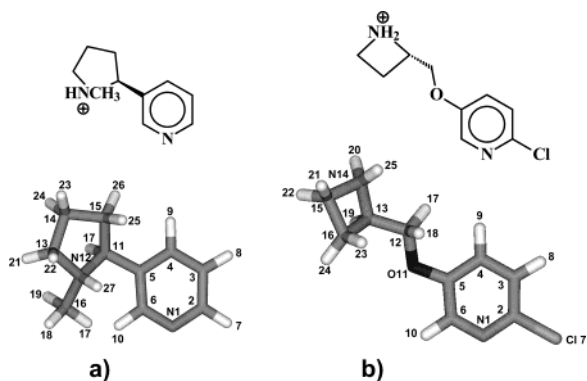


Figure 2. Structure and numbering convention of molecules considering in the work. (a) Protonated nicotine. (b) Protonated ABT-594. The heteroatoms are indicated in the numbering.

molecular complexes of aminopyridines.¹⁷ Thus, we can conclude that for a typical flexible bioactive compound the semiclassical approach is able to reproduce the quantum results with an error smaller than 10%. In fact, the approach is better the larger the molecular moiety experiencing the variation.

Effect of the Conformational Kinetic Energy and the Rotovibrational Coupling. To determine the effect of these two factors we will consider the conformational population distribution of two molecules in a vacuum. First, the protonated nicotine will be considered, which is the bioactive form of the compound. This form exhibits only one conformational degree of freedom and medium potential energy barriers.¹⁸ The second case corresponds to the nicotinic analgesic ABT-594 in its protonated, active, form. This is a two-dimensional case where two conformational coordinates can be defined. In addition, as shown previously,¹⁹ the potential energy barriers are relatively high, about 40 kJ mol⁻¹.

Figure 2 shows the structure and numbering convention of nicotine and ABT-594 used in this work. The conformational coordinates are defined as θ (N12C11C5C4) for the protonated nicotine and θ_1 (C13C12O11C5) and θ_2 (N14C13C12O11) for the protonated ABT-594. In the structure used for nicotine, the *N*-methyl substituent is placed in trans with respect to the pyridine ring. Previous data¹⁸ from molecular mechanics and from calculations at the MP2/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p) and B3LYP/6-31G(d, p)//HF/6-31G(d, p) levels show that this is the minimum energy arrangement. The molecules are described at the MP2/cc-pVDZ level using the Gaussian 98 package.²⁰ A grid of points on each conformational coordinate is generated in increments of 30° for nicotine, and in increments of 60° for ABT-594.¹⁹ At each point, the molecular structure is fully relaxed, keeping fixed the conformational coordinates. From the initial grid, the approximate placements of local minima are identified. The minima are obtained by fully relaxing the geometry from the closest point of the grid.

Figure 3 shows the potential energy variation for the two considered molecules. Figure 3a corresponds to the potential energy variation for protonated nicotine in a vacuum. Four minima, I to IV in increasing order of energy, are found. Minima I–III appear for values of the θ angle of 288.4°, 113.7°, and 218.9°, respectively. Minimum II appears at 0.3 kJ mol⁻¹ of the global minimum. On the other hand, minimum III appears at 11.9 kJ mol⁻¹. The last minimum on θ , minimum IV, is located in the proximity of $\theta = 30^\circ$. Full geometry relaxation from this geometry is unable to find the local minimum, leading instead to minimum II. However, the $\theta = 30^\circ$ point is placed 15.9 kJ mol⁻¹ from the global minimum. Thus, we can expect the population of this minimum to be negligible, as shown

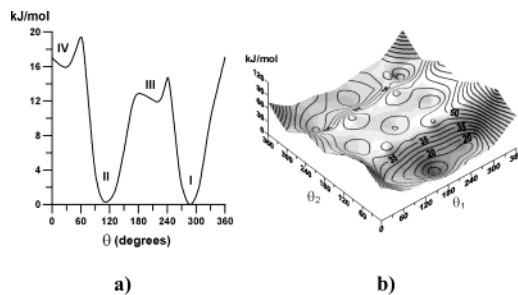


Figure 3. Potential energy maps. (a) Protonated nicotine. (b) Protonated ABT-594. Interval between isocontour lines 5 kJ mol⁻¹. All data are referred to the minimum value.

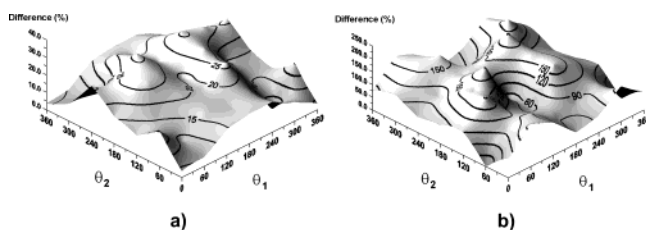


Figure 4. Variation, with the conformation, of the elements of the G matrix in the nicotinic analgesic ABT-594. (a) Variation of the pure rotational partition function. Interval between isocontour lines 5%. (b) Variation of the G matrix determinant. Interval between isocontour lines 30%. All data referred to the minimum value.

below. Therefore, the exact location of this minimum will not alter the population distribution of conformers. For this reason we keep the energy value for $\theta = 30^\circ$ as the corresponding to minimum IV.

The close I and II minima correspond to conformations where the pyrrolidine and pyridinic rings are approximately perpendicular to each other. These data compare favorably with previous results for the trans form obtained by molecular mechanics, ab initio HF/6-31G(d, p) calculations,¹⁸ and from fully relaxed MP2/6-31G(d, p) results.²¹ This last work identifies two close minima, A and B (in order of energy) separated by less than 1.0 kcal mol⁻¹. These minima appear for a torsional angle, defined as (H17C11C5C6) using the numbering convention of Figure 2, close to 0° and 180°, respectively. These data can be compared favorably to the -7.2° and 178.6° values of the corresponding angle found for our conformers I and II.

Figure 3b shows the potential energy surface for the protonated ABT-594. The global minimum appears for $\theta_1 = 178.7^\circ$, $\theta_2 = 43.8^\circ$ (conformer VIII, following the nomenclature of ref 19), with some additional minima on the hypersurface that are extensively discussed elsewhere.¹⁹ This minimum corresponds to a conformation where the additional proton on the azetidinyloxy group is oriented toward the electron lone pairs of the oxygen, O11. It has been determined that the same global minimum appears in aqueous solution.¹⁹ The atoms in molecules (AIM) theory shows that this structure is stabilized by an intramolecular hydrogen bond between O11 and a hydrogen from one carbon on the azetidinyloxy group.¹⁹ The minimum closest in energy appears at $\theta_1 = 271.2^\circ$, $\theta_2 = 58.2^\circ$, and is placed 11.6 kJ mol⁻¹ above the global one. As it can be seen in Figure 3b, this second minimum almost merges with the first one. The remaining minima are placed higher in energy.

The failure of the usual assumption of a constant rotovibrational G matrix (in elements and determinant) is shown in Figure 4. Here, we use the two-dimensional case of ABT-594 to illustrate the dependence on the conformational coordinates of the rotational partition function (i.e., the individual elements of the G matrix giving rise to the inertial moments) and the G

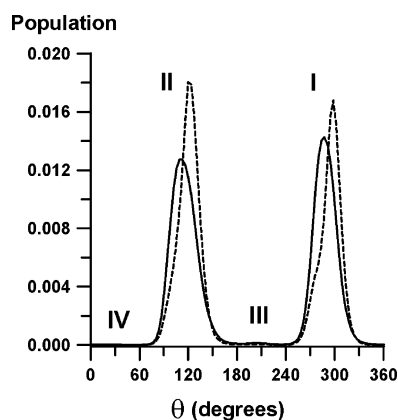


Figure 5. Conformational population for protonated nicotine. The dashed line corresponds to the population evaluated including the G matrix. The continuous line corresponds to the population evaluated using only the potential energy. Data at physiological temperature (37 °C).

matrix determinant. To obtain these data, the G matrix is computed for each grid point from the corresponding relaxed geometry. Figure 4a shows that the minimum value of the partition function is found for the conformation $\theta_1 = 300^\circ$, $\theta_2 = 60^\circ$. The maximum appears for $\theta_1 = 240^\circ$, $\theta_2 = 180^\circ$, with a difference representing a 28.4% of the minimum value. On the other hand, Figure 4b shows that the minimum value of the G matrix determinant appears at $\theta_1 = 0^\circ$, $\theta_2 = 60^\circ$. In this case the variation is very large. The difference with the minimum value reaches 215.7% for $\theta_1 = 240^\circ$, $\theta_2 = 240^\circ$. These results show that for a typical bioactive compound the elements of the rotovibrational G matrix cannot be considered constant with the conformation.

The next question is how, and how much, this variation of the G matrix affects the distribution of conformers. To such an end, eq 14 and eq 15 are applied to protonated nicotine and ABT-594 at physiological temperature, 37 °C. For each molecule, we have used the potential energy derived from the ab initio calculations. As previously, the G matrix determinant is computed for each grid point from the corresponding relaxed geometry. The integral in equations 14 and 15 is computed numerically using a set of bicubic splines in the two-dimensional case.^{19,22,23} For the one-dimensional case, protonated nicotine, integration is carried out using the Romberg extrapolation, applying the trapezoidal rule.²³

Figure 5 shows the population distribution of nicotine for two cases. In the first one (continuous line), we include only the potential energy, removing the effect of the G matrix determinant. In the second case (dashed line), we apply equations (14–15) without approximations. It is shown that only conformers I and II are significantly populated at physiological temperature. We observe that the inclusion of the G matrix changes the population distribution. Table 2 collects the population of conformers I to IV. The populations are computed integrating in the intervals determined by the minima arising in the population distribution. These minima correspond, approximately, to the intervals, 0° – 60° , 60° – 180° , 180° – 230° , and 230° – 360° for conformers IV, II, III, and I, respectively. Table 2 shows that the population of conformers III and IV at physiological temperature can be neglected. On the other hand, when only the potential energy is used, the population of conformers I and II are similar and very close to 50%. However, when the G matrix is included, the population of conformer I decreases, whereas it increases for conformer II. The result is

TABLE 2: Population (in percent) for the Conformers of Protonated Nicotine and ABT-594 When the G Matrix Is Considered^a

	V	GV
conformer I nicotine	49.04	45.91
conformer II nicotine	50.37	53.76
conformer III nicotine	0.46	0.26
conformer IV nicotine	0.13	0.07
conformer VIII ABT-594	97.8	98.7

^a Columns with V correspond to populations obtained using only the potential energy. Columns with GV indicate that the populations are computed using the potential energy and the G matrix determinant. Data at physiological temperature (37 °C).

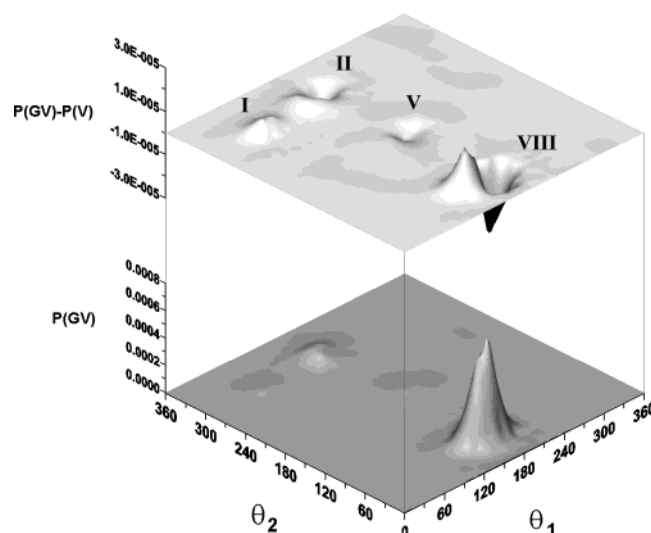


Figure 6. Conformational population for protonated ABT-594. The lower surface corresponds to the population evaluated including the G matrix. The upper surface corresponds to the difference between populations evaluated including and excluding the G matrix. Data at physiological temperature (37 °C).

that conformer II, the less energetically stable, is the most populated due to entropic effects.

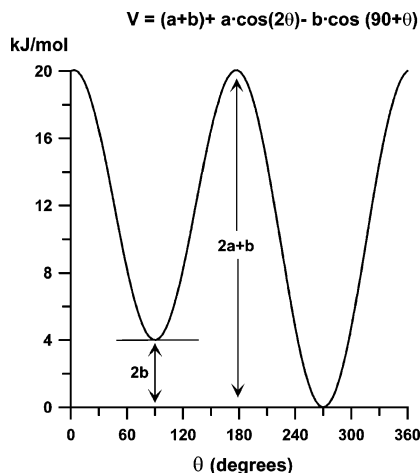
Figure 6 collects the population distribution of ABT-594 as a function of θ_1 and θ_2 . The population distribution, including the effects of the G matrix and the potential energy, is shown in the lower diagram. We observe that the conformer VIII (global minimum) is almost exclusively populated. The main difference of this case with respect to the protonated nicotine is the higher energy difference between the minima on the potential energy hypersurface, see Figure 3. In particular, no minimum is closer than 11.6 kJ mol⁻¹ to the global minimum.

The results obtained by the exclusive use of the potential energy yields a distribution almost indistinguishable from the previous results. To display the difference between the two cases, we compute the difference between the map that includes both effects (G matrix and potential energy) and the map obtained from the potential energy. The result is shown in the upper part of Figure 6. We observe small differences for the minor conformers identified as I, II, and V, using again the nomenclature of ref 19. In particular, when we introduce the G matrix, conformer I is more populated, whereas conformers II and V decrease in population. On the other hand, for the most populated conformer, conformer VIII, the difference is positive and negative around the zone. However, all the differences are in the range -3.0×10^{-5} to 3.0×10^{-5} , which are low values (the base value in the population map shown in the lower part of Figure 6 is 10^{-6} to 10^{-7}). To quantify the effect of the inclusion of the G matrix in the population calculations, we

TABLE 3: Simulated Population (in %) of Conformers I and II of trans Nicotine, at Physiological Temperature (37 °C), as a Function of the Potential Energy Difference (ΔE) between Them^a

	$\Delta E = 0.0 \text{ kJ mol}^{-1}$		$\Delta E = 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$		$\Delta E = 4.0 \text{ kJ mol}^{-1}$		$\Delta E = 6.0 \text{ kJ mol}^{-1}$		$\Delta E = 8.0 \text{ kJ mol}^{-1}$		$\Delta E = 10.0 \text{ kJ mol}^{-1}$	
	V	GV	V	GV	V	GV	V	GV	V	GV	V	GV
I	50.1	36.9	67.8	55.6	81.4	72.9	90.0	85.3	94.9	92.5	97.4	96.4
II	49.9	63.1	32.2	44.4	18.6	27.1	10.0	14.7	5.1	7.5	2.6	3.6

^a Columns with V correspond to populations obtained using only the potential energy. Columns with GV indicate that the populations are computed using the potential energy and the G matrix determinant.

**Figure 7.** Model potential used to determine the effect of increasing energy differences between conformers.

compute the population of conformer VIII obtained including and excluding the G matrix. Since the base value of population in the population maps is 10^{-6} to 10^{-7} , we select as limits of integration for the peak the zone delimited by a population value of at least 10^{-6} . The results are collected in Table 2. We observe that including the G matrix, the population of conformer VIII changes only slightly from 97.8% to 98.7%.

The previous results show that the net effect of the G matrix depends on the difference in energy between the conformers. To quantify this effect, we compute the population variation for increasing energy differences between conformers. Thus, we simulate a one-dimensional potential with two minima, similar to the potential for nicotine shown in Figure 3a. The potential is defined as

$$V(\theta) = (a + b) + a \cos(2\theta) - b \cos(90 + \theta) \quad (20)$$

This potential exhibits two minima at θ values of 90° and 270° . The minimum at 270° is the global one. The interconversion barrier is fixed at 20 kJ mol^{-1} . Figure 7 shows the physical meaning of the a and b parameters of eq 20. As G matrix values we have used the data obtained in the conformational analysis of nicotine. We have tested differences in energy between the conformers from 0.0 to 10.0 kJ mol^{-1} in increments of 2.0 kJ mol^{-1} . Table 3 shows the variation of population for increasing differences in energy between the conformers. In all cases, when the G matrix is included, conformer I decreases in population, whereas conformer II increases. Also, we observe that as ΔE increases the effect of the G matrix decreases. The absolute value of the population variation goes from 26.3% for $\Delta E = 0.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ to 1.0% for $\Delta E = 10.0 \text{ kJ mol}^{-1}$. In particular, the variation falls under 5% for $\Delta E = 8.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ (about 2 kcal mol^{-1}). In fact, for this ΔE the variation reaches 2.5%. Thus, a difference of 2 kcal mol^{-1} between conformers can be taken as a practical limit for the potential energy to become the leading factor in the conformational population.

It is important to recall that the exclusive use of the potential energy is based on the assumption of the classical flexible model.⁷ Thus, to be consistent with the model, the nonconformational coordinates should be fixed at some time-averaged values. Therefore, it is not physically consistent to compute the conformational partition function from a Boltzmann distribution involving only a relaxed potential. If a relaxed potential is used, eq 13 for the conformational partition function must be applied. Only when the difference between conformers is higher than about $2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ can the effect of the G matrix be neglected.

Acknowledgment. This work has been supported by the "Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha" (grant # PAI-02-001).

References and Notes

- (1) Farnell, L.; Richards, W. R.; Ganellin, C. R. *J. Theor. Biol.* **1974**, *43*, 389–392.
- (2) Richards, W. G. *Quantum Pharmacology*, 2nd ed.; Butterworths: London, 1983.
- (3) Grant, G. H.; Richards, W. G. *Computational Chemistry in Oxford Chemistry Primers*; Oxford University Press: Oxford, 1995.
- (4) G6, N.; G6, M.; Scheraga, H. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1968**, *59*, 1030–1037.
- (5) G6, M.; Scheraga, H. A. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 4751–4767.
- (6) Flory, P. J. *Macromolecules* **1974**, *7*, 381–392.
- (7) G6, M.; Scheraga, H. A. *Macromolecules* **1976**, *9*, 535–542.
- (8) (a) Pickett, H. M. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 1715–1723. (b) Lewis, J. D.; Malloy, T. B., Jr.; Chao, T. H.; Laane, J. *J. Mol. Struct.* **1972**, *12*, 427–449. Harthcock, M. A.; Laane, J. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4231–4240. (c) Mu6oz-Caro, C.; Ni6o, A.; Moule, D. C. *Chem. Phys.* **1994**, *186*, 221–231. (d) Mu6oz-Caro, C.; Ni6o, A. *Comput. Chem.* **1994**, *18*, 413–417. (e) Ni6o, A.; Mu6oz-Caro, C. *Comput. Chem.* **1995**, *4*, 371–378.
- (9) (a) Ozkabak, A. G.; Goodman, L. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 5958–5968. (b) Smeyers, Y. G.; Senent, M. L.; Botella, V.; Moule, D. C. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 2754–2767. (c) Ni6o, A.; Mu6oz-Caro, C.; Moule, D. C. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1519–1524. (d) Ni6o, A.; Mu6oz-Caro, C.; Moule, D. C. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 8510–8515. (e) Ni6o, A.; Mu6oz-Caro, C. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1177–1180.
- (10) Ni6o, A.; Mu6oz-Caro, C. *Comput. Chem.* **1994**, *18*, 27–32.
- (11) Mu6oz-Caro, Ni6o, A.; C., Moule, D. C. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1995**, *91*, 399–403.
- (12) Lucas, K. *Applied Statistical Thermodynamics*; Springer-Verlag: Berlin, 1991.
- (13) Wilson, E. B., Jr.; Decius, J. C.; Cross, C. *Molecular Vibrations*; Dover: New York, 1980. Re-publication of the original work of 1955 published by McGraw-Hill: New York.
- (14) Podolsky, B. *Phys. Rev.* **1928**, *32*, 812–816.
- (15) Goldstein, H. *Classical Mechanics*, 2nd ed.; Addison-Wesley: Reading, MA, 1980.
- (16) Mu6oz-Caro, C.; Ni6o, A. *QCPE Bull.* **1995**, *15*, 48.
- (17) Mu6oz-Caro, C.; Ni6o, A. *Biophys. Chem.* **2002**, *96*, 1–14.
- (18) Elmore, D. E.; Dougherty, D. A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 742–747.
- (19) Mora, M.; Mu6oz-Caro, C.; Ni6o, A. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, in press.
- (20) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M.

W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, revision A.7; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.

(21) Takeshima T.; Fukumoto R.; Egawa T.; Konaka S. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 8734–8740.

(22) Engeln-Müllges, G.; Uhlig F. *Numerical Algorithms with Fortran*; Springer-Verlag: Berlin, 1996.

(23) Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. *Numerical Recipes in Fortran 77*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1992.

Analysis of B3LYP and MP2 Conformational Population Distributions in *trans*-Nicotine, Acetylcholine, and ABT-594

M. MORA,¹ M. E. CASTRO,² A. NIÑO,¹ F. J. MELENDEZ,²
C. MUÑOZ-CARO¹

¹Grupo de Química Computacional, E. S. Informática, Universidad de Castilla-La Mancha, Paseo de la Universidad 4, 13071, Ciudad Real, Spain

²Laboratorio de Química Teórica, Centro de Investigación, Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. 140, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla-72570, México

Received 3 June 2004; accepted 8 September 2004

Published online 1 February 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/qua.20475

ABSTRACT: This work presents an analysis of the equivalence of MP2 and DFT (B3LYP functional) conformational populations. As a test case, we select three cholinergic agents (*trans*-nicotine, acetylcholine, and the nicotinic analgesic ABT-594), where the minima on the conformational energy hypersurfaces expand a large range of energies (~ 0 – 30 kJ mol⁻¹). From energetic and structural data obtained in vacuo at the MP2 and B3LYP/cc-pVDZ levels, we build conformational partition functions, including the effect of the conformational kinetic energy and the rotovibrational coupling. Our results at a physiological temperature (37°C) show qualitative agreement in all cases. Quantitative agreement, however, is only found for *trans*-nicotine and ABT-594. In the first case, energy minima differ by < 0.2 kJ mol⁻¹. Therefore, the equivalence of structural results translates in the equivalence of the conformational distribution. For ABT-594, the minima are separated by as much as 8.0 kJ mol⁻¹, and the conformational energy determines the conformational distribution. In this case, the slight relative

Correspondence to: C. Muñoz-Caro; e-mail: quimcom@uclm.es

Contract grant sponsor: CONACyT (Mexico).

Contract grant number: 171982.

Contract grant sponsor: Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Spain).

Contract grant number: PAI-02-001.

Contract grant sponsor: Universidad de Castilla-La Mancha (Spain).

variation of conformational energy, between B3LYP and MP2, does not affect the population, since the secondary minima are high in energy and very low in population.
© 2005 Wiley Periodicals, Inc. Int J Quantum Chem 103: 25–33, 2005

Key words: nicotine; acetylcholine; ABT-594; conformational population

Introduction

The conformational preferences of bioactive compounds are important when considering their interaction with a receptor site. Typically, to describe the conformational variation of a molecule, several internal coordinates are used. In this form, on the grounds of the Born–Oppenheimer approximation, we generate a potential energy hypersurface for the conformational motion. In the standard treatment of conformational preferences, only this potential energy hypersurface is taken into account. Minima on this hypersurface (and especially the global minimum) are considered as candidates for the optimal pharmacophore distribution. The problem with this approach is the lack of entropic effects. To solve this problem, a conformational partition function is built in order to determine the statistical weight of the different structures (conformers). The established procedure applies a Boltzmann distribution involving only the conformational potential energy [1, 2], using fixed values for the internal coordinates. The use of a Boltzmann distribution involving only the conformational potential energy assumes that the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy are constant with the conformation. Recently, we have developed a treatment for the conformational partition function that includes the effects of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy [3]. The treatment is based in the theoretical study of anharmonic, large-amplitude vibrations in molecules. Thus, *ab initio* methodology is applied, and the potential energy for the considered motion is obtained by relaxing the molecular geometry for fixed values of the conformational coordinates. The effect of the overall rotation and the conformational kinetic energy is introduced through the rotovibrational *G* matrix [4].

We have applied this new approach using data derived from *ab initio* calculations in second-order Møller–Plesset perturbation theory (MP2) [3, 5, 6]. However, accounting for correlation energy at the MP2 level is translated in large amounts of computational resources for medium-size bioactive com-

pounds. For this reason, it is usual to resort to density functional theory (DFT), which permits to describe correlation energy at a fraction of the cost of the Møller–Plesset treatment. The most used density functional, the three-parameter hybrid, B3LYP functional, is parametrized to reproduce the equilibrium results of the G1 molecular set [7]. Thus, it provides reliable structures and harmonic vibrational frequencies for equilibrium configurations, at a reasonable computational expense [8]. In a previous work, we have found that energetic B3LYP results differ from the MP2 results when working out of minima on the potential energy hypersurface [9]. However, the question is whether B3LYP can still provide equivalent results to MP2 with respect to conformational populations. In this case, we must account not only for energetic equivalence, but also for equivalence of structural variations to include the effect of the conformational kinetic energy and the rotovibrational coupling. To our knowledge, the suitability of B3LYP for this type of study has not yet been taken into account.

In the present work, we consider the equivalence of the MP2 and B3LYP methodologies, from the point of view of conformational populations. Thus, in the framework of previous studies [3, 6], we consider three cholinergic agents in their bioactive form: protonated *trans*-nicotine, acetylcholine, and the new nicotinic analgesic ABT-594. These molecules are considered in *vacuo* and correspond to cases in which the conformational minima expand a range of separations in energy: from almost equally placed to large energetic separations. We perform complete conformational analysis, compute the rotovibrational *G* matrices as a function of conformation, and evaluate the corresponding conformational statistical weights. In this form, we analyze and quantify the difference between the MP2 and B3LYP results.

Computational Details

The conformational study of the different molecular systems is performed in *vacuo* using *ab initio* methodology, including correlation energy at the

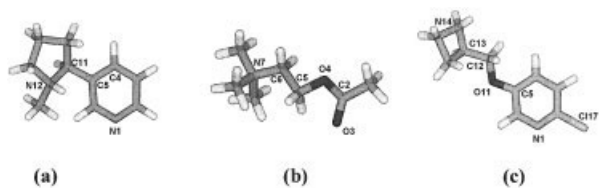


FIGURE 1. Structure and numbering convention for the molecules considered in the work. (a) Protonated *trans*-nicotine. (b) Acetylcholine. (c) Protonated ABT-594. Atoms involved in the definition of the torsional coordinates are indicated. Atom numbering is defined in Ref. [3] for protonated *trans*-nicotine and protonated ABT-594, and in Ref. [6] for acetylcholine.

MP2 and B3LYP levels. The basis selected is the correlation consistent polarized double ζ , cc-pVDZ basis set [10]. All the calculations are carried out with the Gaussian 98 package [11].

The structures for protonated *trans*-nicotine, acetylcholine, and protonated ABT-594 are shown in Figure 1. The numbering convention for nicotine and acetylcholine is the one defined in Ref. [6]. For ABT-594, the numbering convention is defined in Refs. [3, 5].

Protonated *trans*-nicotine is a one-dimensional conformational problem. In this isoform, the *N*-methyl substituent is placed in *trans* with respect to the pyridine ring [12]. Previous data from molecular mechanics, and from calculations at the MP2/6-31G(*d,p*)/HF/6-31G(*d,p*) and B3LYP/6-31G(*d,p*)/HF/6-31G(*d,p*) levels, show that this *trans*-isomer is the minimum energy arrangement both in the gas phase and in water [12]. For *trans*-nicotine, the conformational coordinate is defined as dihedral $\theta(\text{N12C11C5C4})$, using the nomenclature shown in Figure 1. This torsion angle describes the orientation between the pyrrolidine and pyridinic rings. In contrast, acetylcholine is a two-dimensional conformational problem (see Refs. [6, 13, 14]). The two conformational coordinates are defined as dihedrals $\theta_1(\text{N7C6C5O4})$ and $\theta_2(\text{C6C5O4C2})$ (see Fig. 1). These angles define the relative orientation of the trimethylammonium moiety (θ_1) and of the acetoxy group (θ_2 angle). Calculations on acetylcholine are simplified by the fact that it can be classified under a G_2 nonrigid group. The operations of this group are the identity and the simultaneous inversion of the two conformational angles. Thus, only one point needs to be calculated for the couple θ_1 , θ_2 and $-\theta_1$, $-\theta_2$. Finally, the protonated ABT-594 is a two-dimensional conformational problem [5]. The conformational flexibility is accounted for consid-

ering two dihedral angles, $\theta_1(\text{C13C12O11C5})$ and $\theta_2(\text{N14C13C12O11})$ (see Fig. 1). The θ_1 angle measures the torsion of the azetidylmethoxy moiety. In contrast, θ_2 describes the rotation of the azetidyl group.

For the three molecules, a grid of points is generated on each conformational coordinate using increments of 30° , for the one-dimensional case, protonated *trans*-nicotine, and 60° for acetylcholine and protonated ABT-594. A range of 0° – 360° is considered. At each grid point, the conformational coordinates are kept frozen, whereas the rest of the structure is fully relaxed. From the grid, the local minima are identified and localized by full relaxation of the closer structures.

The population of conformers is obtained at physiological temperature (37°C), using the technique previously developed [3]. Thus, the population of a given conformer, $p(\Delta Q)$, is obtained as

$$p(\Delta Q) = 8\pi^2 \left(\frac{2\pi kT}{h^2} \right)^{(m+3)/2} \left\{ \int_{Q_1^i}^{Q_1^f} \cdots \int_{Q_m^i}^{Q_m^f} |G(Q)|^{-1/2} \times \exp[-V(Q)/kT] \prod_i dq_i \right\} / Z_{rv} \quad (1)$$

where the conformer is defined by an interval ΔQ , with limiting values for each conformational coordinates of Q^i and Q^f . $G(Q)$ is the rotovibrational G matrix at the conformation Q , V is the potential energy function, m is the number of conformational coordinates considered, and Z_{rv} is the conformational (rotovibrational) partition function defined as [3]

$$Z_{rv} = 8\pi^2 \left(\frac{2\pi kT}{h^2} \right)^{(m+3)/2} \int_Q \cdots \int_Q |G(Q)|^{-1/2} \times \exp[-V(Q)/kT] \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (2)$$

The rotovibrational G matrix is computed, as previously described [15], from the relaxed geometry obtained at each grid point. The integrations in Eqs. (1) and (2) are performed numerically. For the one-dimensional cases, we apply a Romberg extrapolation, using the trapezoidal rule [16]. The two-

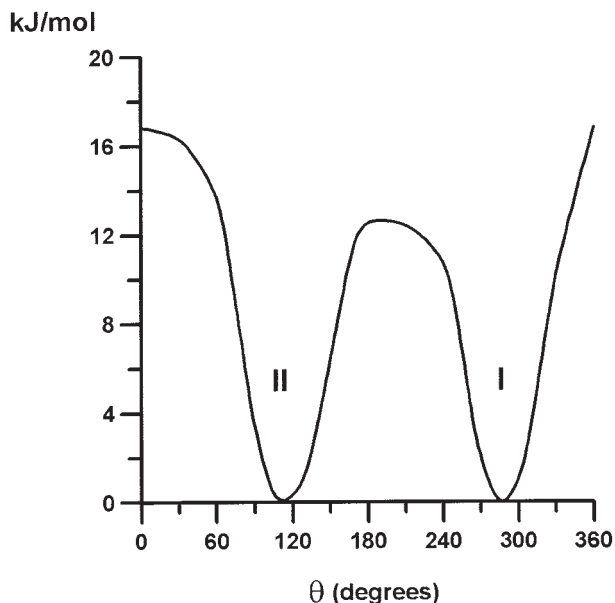


FIGURE 2. Conformational energy map of protonated *trans*-nicotine as a function of the $\theta(\text{N12C11C5C4})$ torsional angle. Angles in degrees and energies in kJ mol^{-1} . All data refer to the minimum value.

dimensional numerical integration in acetylcholine and protonated ABT-594 is performed using bicubic splines [17]. All the thermostistical computations have been performed with software developed at our laboratory.

Results and Discussion

PROTONATED *trans*-NICOTINE

Figure 2 shows the potential energy surface at the B3LYP/cc-pVDZ level for the protonated *trans*-nicotine, as a function of the torsion angle $\theta(\text{N12C11C5C4})$. As shown in Table I, we find two minima labeled I and II in increasing order of energy. The global minimum, I, appears at $\theta = 287.3^\circ$, whereas minimum II appears at $\theta = 113.9^\circ$ and is placed 0.1 kJ mol^{-1} above the global one. In these two minima, the pyrrolidine and pyridinic rings are placed almost perpendicular to each other. This result is in agreement with recent ab initio data [12]. As shown previously [3], the MP2 method leads to four minima (I–IV) (see Table I). The swallow MP2 minima III and IV are placed at the top of the barriers and do not appear with the B3LYP methodology. In fact, previous theoretical works [12] did not find these two minima either. It is unclear

whether these minima do exist or are an artifact. In any case, they represent a small depression of the maxima between minima I and II. Therefore, they are so high in energy that its population can be neglected. MP2 and B3LYP yield similar energy values for the main minima, I and II. The difference in the energy value for minimum II is only 0.2 kJ mol^{-1} , slightly smaller for B3LYP. The energy barrier between the two minima (I and II) is the same with both methods: 12.5 kJ mol^{-1} . We find that the energy difference among all the points is smaller than 0.5 kJ mol^{-1} (if minima III and IV are not considered).

The previous results are energetic, essentially enthalpic, data relative to the conformational behavior. To account for entropic effects, a thermostistical analysis is performed applying Eqs. (1) and (2). The conformational distribution of the protonated *trans*-nicotine is shown in Figure 3, which can be compared with Figure 5 of Ref. [3] obtained at the MP2/cc-pVDZ level. Populations are computed integrating between the minima arising in the population distribution and bracketing the two maxima found. Thus, we integrate the intervals $0.0^\circ\text{--}178.2^\circ$ and $178.2^\circ\text{--}360.0^\circ$, for conformers II and I, respectively. The B3LYP population under the maxima is found 46.1%, for conformer I, and 53.9%, for conformer II. The result is that conformer II, the less energetically stable, is the most populated due to entropic effects. The previous MP2/cc-pVDZ results found that the population is 45.9% for conformer I and 53.8% for conformer II [1].

TABLE I
 θ values (in degrees) and energy increments from the global minimum (in kJ mol^{-1}) for the different minima located on the conformational energy hypersurfaces of protonated *trans*-nicotine with the B3LYP and MP2 methods.*

Conformer ^a	θ^b	ΔE^b	θ^c	ΔE^c
I	287.3	0.0	288.4	0.0
II	113.9	0.1	113.8	0.3
III	—	—	218.9	11.9
IV	—	—	30.0	15.9

* Energy data referred to the global minimum for each species.

^a Nomenclature taken from Ref. [3].

^b This work, data at the B3LYP/cc-pVDZ level.

^c Ref. [3], data at the MP2/cc-pVDZ level.

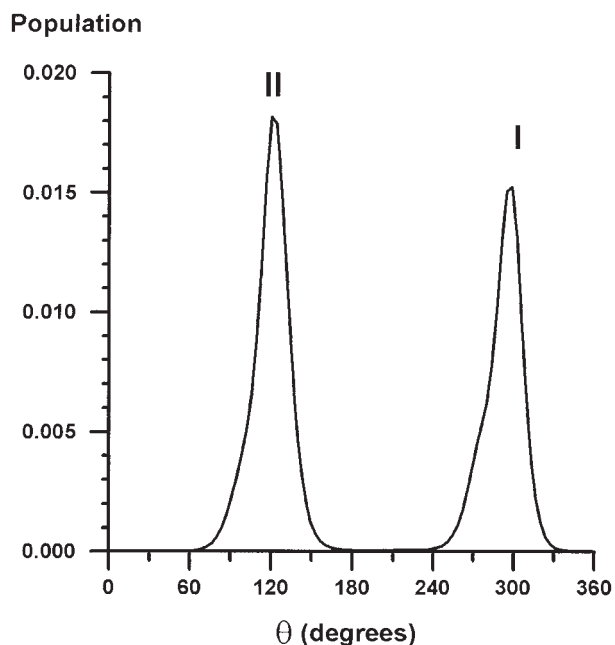


FIGURE 3. Conformational population distribution of *trans*-nicotine, at physiological temperature (37°C), as a function of the θ (N12C11C5C4) torsional angle.

ACETYLCHOLINE

Figure 4 shows the conformational hypersurface of acetylcholine. As shown in Table II, the global minimum (conformer I) appears for $\theta_1 = 280.3^\circ$, $\theta_2 = 107.9^\circ$. A secondary minimum (conformer II) appears for $\theta_1 = 293.3^\circ$, $\theta_2 = 280.2^\circ$, placed at 3.7 kJ mol^{-1} . A third minimum (conformer III) is found at $\theta_1 = 298.4^\circ$, $\theta_2 = 195.0^\circ$, placed at 6.1 kJ mol^{-1} . The last local minimum (conformer IV) appears at $\theta_1 = 180.2^\circ$, $\theta_2 = 179.9^\circ$, placed at 17.2 kJ mol^{-1} . These data agree with the recent DFT study by Segall et al. [18]. The comparison with previous MP2/cc-pVDZ results [6] is presented in Table II, where we collect the minima obtained with both methods. The same four minima are found, but the relative positions of minima II, III, and IV differ in B3LYP with respect to MP2 by 3.0 kJ mol^{-1} , 2.3 kJ mol^{-1} , and -0.7 kJ mol^{-1} , respectively. To account for the difference in the conformational energy hypersurfaces, we compute MP2 minus B3LYP values as a function of conformation. Thus, we build an energy differences map, which is shown in Figure 5. It is observed that the higher differences appear around minima I to III. From the interpolated grid, the energy barriers between minima II and III are 8.0 kJ mol^{-1} in B3LYP and MP2. However, the energy barriers between minima III and I are 7.0 kJ mol^{-1} in B3LYP

and 5.0 kJ mol^{-1} in MP2. Although B3LYP overestimates the energy barrier, the difference is $<2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$.

As in the case of protonated *trans*-nicotine, we account for entropic effects by performing a thermostatical analysis applying Eqs. (1) and (2). The two-dimensional distribution of conformers in acetylcholine, using the B3LYP approach, is shown in Figure 6. We observe that the population is concentrated around minima I, II, and III, i.e., around $\theta_2 = 60^\circ$ – 300° . Integrating this zone, selecting as limits a minimum value of population of 10^{-6} or 10^{-7} , we found a population of 87.2%. Minimum IV is not populated. However, there is another populated zone around $\theta_1 = 150^\circ$, $\theta_2 = 150^\circ$, and the symmetry equivalent $\theta_1 = 210^\circ$, $\theta_2 = 210^\circ$. Integrating as described above, we found that these two symmetric zones comprise a population of 12.5%. In the MP2 case, it is possible to observe these two zones [6], but with very small population values. Therefore, the population is concentrated mostly around minima I, II, and III, representing almost the 100%. This behavior can be attributed to the difference in the minima and in the barriers between them. In MP2, minima II and III are closer to minimum I than in B3LYP. In addition, the barrier between minima I and III is smaller in MP2. Thus, the population is accumulated in these close minima. However, in B3LYP the minima are more energetically separated. Thus, the zone around minima I is more populated, and part of this population can be

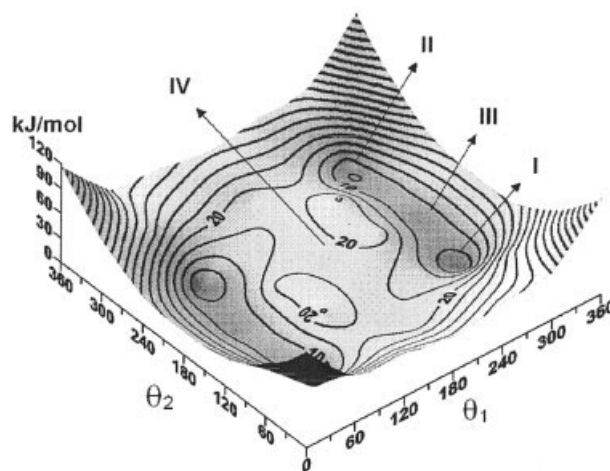


FIGURE 4. Conformational energy map of acetylcholine as a function of the θ_1 (N7C6C5C4) and θ_2 (C6C5O4C2) torsional angles. Angles in degrees and energies in kJ mol^{-1} . Interval between isocontour lines 5 kJ mol^{-1} . Data refer to the minimum value.

TABLE II

θ_1 and θ_2 values (in degrees) and energy increments from the global minimum (in kJ mol^{-1}) for the different minima located on the conformational energy hypersurfaces of acetylcholine with the B3LYP and MP2 methods.*

Conformer ^a	θ_1^b	θ_2^b	ΔE^b	θ_1^c	θ_2^c	ΔE^c
I	280.3	107.9	0.0	283.8	112.3	0.0
II	293.3	280.2	3.7	298.6	282.5	0.7
III	298.4	195.0	6.1	301.4	188.7	3.8
IV	180.2	179.9	17.2	180.3	180.0	17.9

* Energy data referred to the global minimum for each species.

^a Nomenclature taken from Ref. [6].

^b This work, data at the B3LYP/cc-pVDZ level.

^c Ref. [6], data at the MP2/cc-pVDZ level.

shared with the close zone around $\theta_1 = 150^\circ$, $\theta_2 = 150^\circ$.

PROTONATED ABT-594

Figure 7 shows the conformational energy map for protonated ABT-594 at the B3LYP/cc-pVDZ level. Table III presents the six minima found on the hypersurface, using the nomenclature defined in Ref. [5]. The global minimum (VIII) appears for $\theta_1 = 177.3^\circ$, $\theta_2 = 42.7^\circ$. The closer minima appear

for $\theta_1 = 185.8^\circ$, $\theta_2 = 309.5^\circ$ (minimum II) and $\theta_1 = 269.3^\circ$, $\theta_2 = 310.3^\circ$ (minimum III). These minima are placed 12.2 kJ mol^{-1} and 18.0 kJ mol^{-1} above the global one, respectively. The remaining minima are placed $>20 \text{ kJ mol}^{-1}$. Table III also presents the results obtained at the MP2/cc-pVDZ level [5].

The main difference is the existence of six minima in B3LYP against the eight found in MP2. Our results show that in B3LYP, minima VI and IX fall to minima V and VIII, respectively. In the MP2 case, it is possible to distinguish between minima V and VI, but the hypersurface in these points is very flat and the minima almost merge (see Ref. [5]). The same behavior is observed with respect to minima VIII and IX. We observe that in B3LYP the hypersurface around these four minima is flatter than for MP2 (Fig. 7). This can explain the merging of the

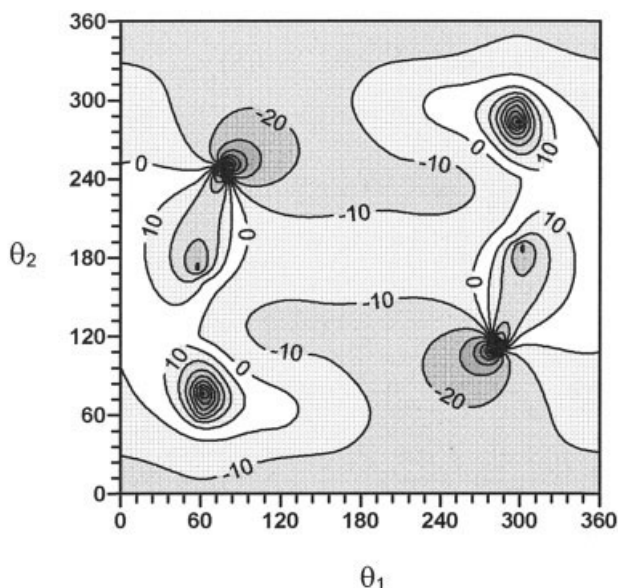


FIGURE 5. (B3LYP-MP2) energy difference map (%) of acetylcholine. Angles in degrees and energies in kJ mol^{-1} . Interval between isocontour lines 10 kJ mol^{-1} . Darker zones correspond to larger differences.

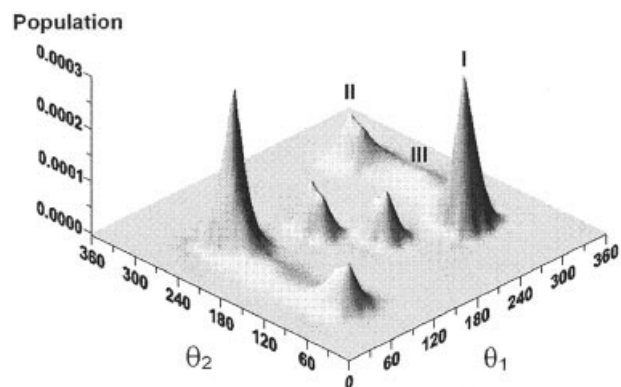


FIGURE 6. Conformational population distribution of acetylcholine at physiological temperature (37°C), as a function of the θ_1 (N7C6C5C4) and θ_2 (C6C5O4C2) torsional angles.

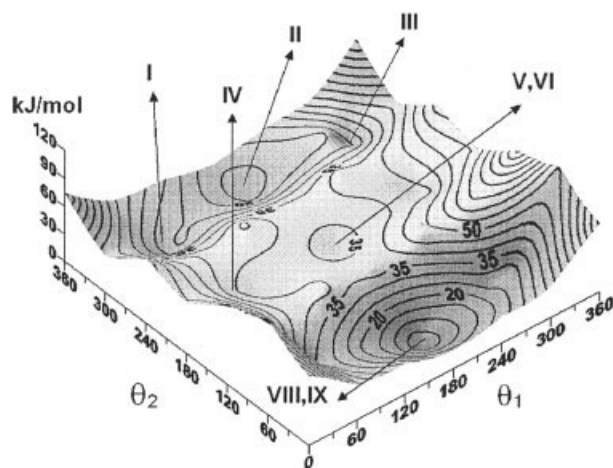


FIGURE 7. Conformational energy map of protonated ABT-594 as a function of the θ_1 (C13C12O11C5) and θ_2 (N14C13C12O11) torsional angles. Angles in degrees and energies in kJ mol^{-1} . Interval between isocontour lines 5 kJ mol^{-1} . Data refer to the minimum value.

closer V and VI minima, on one hand, and of minima VIII and IX, on the other.

Figure 8 shows the population distribution of protonated ABT-594 as a function of θ_1 and θ_2 . We observe that conformer VIII (global minimum) is almost exclusively populated. Integration of the zone around the maximum using a limit population of 10^{-6} – 10^{-7} , yields a population of 98.9%. The remaining 1% is distributed among the rest of the surface. A similar result is found at the MP2 level

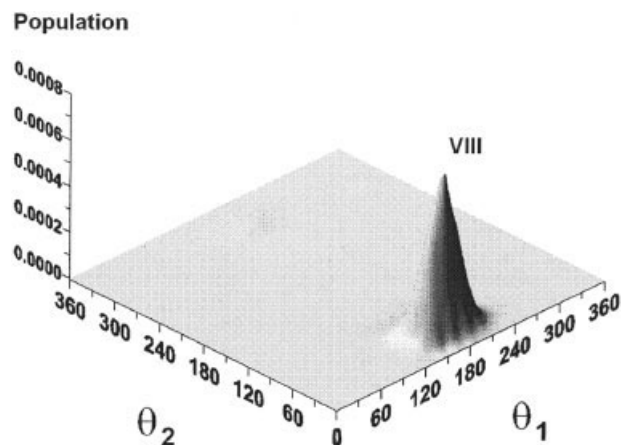


FIGURE 8. Conformational population distribution of protonated ABT-594 at physiological temperature (37°C), as a function of the θ_1 (C13C12O11C5) and θ_2 (N14C13C12O11) torsional angles.

[3]. Here, conformer VIII is also the most populated, accumulating 100% of the population.

Conclusions

In this work we present an analysis of the equivalence of MP2 and DFT (B3LYP functional) with respect to the prediction of conformational populations. Thus, we use data at the MP2 and B3LYP/cc-pVDZ levels to build conformational partition

TABLE III

θ_1 and θ_2 values (in degrees) and energy increments from the global minimum (in kJ mol^{-1}) for the different minima located on the conformational energy hypersurfaces of protonated ABT-594 with the B3LYP and MP2 methods.*

Conformer ^a	θ_1^b	θ_2^b	ΔE^b	θ_1^c	θ_2^c	ΔE^c
I	82.2	287.0	23.9	64.4	283.7	17.0
II	185.8	309.5	12.2	181.8	309.0	16.7
III	269.3	310.3	18.0	281.2	308.4	16.1 ^d
IV	88.9	168.3	35.2	78.3	167.3	34.7
V	180.8	170.9	30.8	180.2	167.5	34.0
VI	180.8	170.9	30.8	288.2	184.8	34.9
VIII	177.3	42.7	0.0	178.7	43.8	0.0
IX	177.3	42.7	0.0	271.2	58.2	11.6

* Energy data referred to the global minimum for each species.

^a Nomenclature taken from Ref. [5].

^b This work, data at the B3LYP/cc-pVDZ level.

^c Ref. [5], data at the MP2/cc-pVDZ level.

^d This value has been recalculated in this work at the MP2/cc-pVDZ level.

functions, including the effect of the conformational kinetic energy and the rotovibrational coupling at physiological temperature (37°C). As a test case, a group of three cholinergic agents, in its cationic, bioactive form, is considered in vacuo: *trans*-nicotine, acetylcholine, and the nicotinic analgesic, ABT-594.

In the protonated *trans*-nicotine, we have a one-dimensional conformational problem. From the energetic point of view, we found that B3LYP and MP2 yield equivalent results, with a maximum energy variation of 0.5 kJ mol⁻¹. Both methods predict a couple of minima very close in energy (higher separation: 0.2 kJ mol⁻¹, in MP2). In particular, the energy barrier between the two minima is the same with both methods. The population distributions are found also equivalent. This indicates that the structural variation, not only the energetic, is very similar in both cases.

In acetylcholine, a two-dimensional conformational problem, four minima in similar positions are found with the MP2 and B3LYP methodologies. The three smaller minima are energetically more separated (in the range 0–6 kJ mol⁻¹), and exhibit higher or equal barriers, with B3LYP than with MP2. Differences respect to MP2 of ≤ 3 kJ mol⁻¹ (higher values in B3LYP) are found among them. The fourth minima is equivalent with MP2 and B3LYP. After computing the conformational partition function, the conformational population is found qualitatively similar with both methodologies. However, quantitatively, the variation of relative position and separation in the smaller minima, with B3LYP, is translated in the population of a zone close to the conformational coordinates $\theta_1 = 150^\circ$, $\theta_2 = 150^\circ$.

For protonated ABT-594, we have a two-dimensional conformational case. We found that MP2 and B3LYP predicts a qualitatively similar conformational hypersurface with minima separated even by >30 kJ mol⁻¹. All the minima found with B3LYP appear with MP2. However, minima VI and VIII in MP2 merge with the closer V and IX minima, respectively, in B3LYP. This is a consequence of the B3LYP flattening of the hypersurface in the zone surrounding the couples of minima (VI, V) and (VIII, IX). The rest of the minima are high in energy, in both MP2 and B3LYP. Thus, although B3LYP differs even by 6.7 kJ mol⁻¹ from MP2 (minimum I), the high value of the energy prevents the existence of any significant population. The result is that the conformational distribution is equivalent applying the MP2 and B3LYP methodologies.

Our results show that the populations predicted by B3LYP are totally equivalent to those obtained by MP2 when the difference in energy between minima is “small” or “large.” “Small” or “large” can be quantified considering previous results [3], which show that the potential energy becomes the leading factor, in the conformational distribution, for energy differences of >8.0 kJ mol⁻¹. Thus, for hypersurfaces where minima are separated by ≥ 8 kJ mol⁻¹, as in ABT-594, the equivalence of energetic results (in relative value) between the MP2 and B3LYP methodologies yields similar conformational distributions. When minima are separated by <8 kJ mol⁻¹, as in acetylcholine, only a qualitative agreement between B3LYP and MP2 conformational populations can be expected. In contrast, for very close minima, as in *trans*-nicotine, the leading factor is the structural one. This factor defines the conformational kinetic energy and rotovibrational coupling variation on the hypersurface. The well-known equivalence of MP2 and B3LYP structural data is translated in equivalent conformational distributions. Therefore, we can conclude that when the minima are very close or very separated in energy, quantitative agreement can be found between MP2 and B3LYP population distributions (at temperatures close to the physiological one, i.e., 37°C). In the intermediate case, only qualitative results can be expected.

ACKNOWLEDGMENTS

CONACyT (México) is acknowledged for a graduate grant (171982) (to M. E. C. S.).

References

1. Richards, W. G. *Quantum Pharmacology*. 2nd ed.; Butterworths: London, 1983.
2. Grant, G. H.; Richards, W. G. *Computational Chemistry*. Oxford Chemistry Primers; Oxford University Press: New York, 1995.
3. Niño, A.; Muñoz-Caro, C.; Mora, M.; Reyes, S. *J Phys Chem A* 2003, 107, 10191.
4. (a) Pickett, H. M. *J Chem Phys* 1972, 56, 1715; (b) Lewis, J. D.; Malloy, T. B., Jr.; Chao, T. H.; Laane, J. *J Mol Struct* 1972, 12, 427; (c) Harthcock, M. A.; Laane, J. *J Phys Chem* 1985, 89, 4231; (d) Muñoz-Caro, C.; Niño, A. *Comput Chem* 1994, 18, 413; (e) Niño, A.; Muñoz-Caro, C. *Comput Chem* 1995, 4, 371.
5. Mora, M.; Muñoz-Caro, C.; Niño, A. *J Comp-Aid Mol Design* 2003, 17, 713.
6. Muñoz-Caro, C.; Niño, A.; Mora, M.; Reyes, S.; Melendez,

- F. J.; Castro, S. M. E. *Similarity in Molecular Systems*; Kluwer (in press).
7. (a) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys Rev B* 1988, 37, 785; (b) Becke, A. D. *J Chem Phys* 1993, 98, 5648.
8. Lozynski, M.; Rusinska-Roszak, D.; Mack, H.-G. *J Phys Chem A* 1998, 102, 2899.
9. Niño, A.; Muñoz-Caro, C.; Senent, M. L. *J Mol Struct (Theorchem)* 2000, 503, 291.
10. Dunning, T. H., Jr. *J Chem Phys* 1989, 90, 1007.
11. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98, Revision A.7*; Gaussian: Pittsburgh, PA, 1998.
12. Elmore, D. E.; Dougherty, D. A. *J Org Chem* 2000, 65, 742.
13. Beveridge, D. V.; Radna, R. J. *J Am Chem Soc* 1971, 93, 3759.
14. Radna, R. J.; Beveridge, D. L.; Bender, A. L. *J Am Chem Soc* 1973, 95, 3831.
15. Niño, A.; Muñoz-Caro, C. *Comput Chem* 1994, 18, 27.
16. Press, W. H.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. *Numerical Recipes in Fortran 77, 2nd ed.*; Cambridge University Press: New York, 1992.
17. Engeln-Müllges, G.; Uhlig, F. *Numerical Algorithms with Fortran*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 1996.
18. Segall, M. D.; Payne, M. C.; Boyes, R. N. *Mol Phys* 1998, 93, 365.

Conformational population distribution of acetylcholine, nicotine and muscarine in vacuum and solution

C. Muñoz-Caro^a, A. Niño^{a,*}, M. Mora^a, S. Reyes^a, F.J. Melendez^b, M.E. Castro^b

^aGrupo de Química Computacional y Computación de Alto Rendimiento, E.S. Informática, Universidad de Castilla-La Mancha, Paseo de la Universidad 4, 13071 Ciudad Real, Spain

^bLab. de Química Teórica, Centro de Investigación, Dpto. de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. 140, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla 72570, México

Received 15 February 2005; revised 30 March 2005; accepted 4 April 2005

Available online 22 June 2005

Abstract

This work presents a theoretical, unified, study of the conformational distribution of acetylcholine, nicotine and muscarine in vacuum and aqueous solution at physiological temperature. The energetic and geometric data are obtained at the MP2/cc-pVDZ level, whereas the solvent effect is described by means of the PCM continuum model. The population of conformers is derived from a conformational partition function, including the effects of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy. For muscarine we find, in vacuum and solution, only one significantly populated conformer. In this conformer, muscarine exhibits a *gauche* conformation. For nicotine, only two conformations are found, similarly populated in vacuum. In solution only one of these conformations remains, corresponding to an almost perpendicular orientation of the pyrrolidine and pyridine rings. On the other hand, acetylcholine in vacuum and solution accumulates its population in a zone where the cationic head is in a *gauche* conformation. This conformational zone is defined by the orientation of the acetoxy moiety. For the three molecules, the most populated conformers in solution are compared using internuclear distances. The results show that the conformers of acetylcholine and nicotine exhibit a similar pharmacophoric distribution (using the oxygen of the acetylcholine ester group). In addition, this acetylcholine conformer also exhibits a similar pharmacophoric pattern to the conformer of muscarine (using the acetylcholine carbonyl oxygen). Simulation of the effect of the acetylcholine interaction with the receptor site, by using a thermal bath, translates in an increase of the torsional flexibility of the acetoxy moiety.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Acetylcholine; Nicotine; Muscarine; Conformational population; Theoretical study

1. Introduction

The conformational preference and accessibility of bioactive compounds is an important issue when considering their interaction with a receptor site. To describe the conformational variation of a molecule, several internal coordinates are used. In this form, on the grounds of the Born–Oppenheimer approximation, we generate a potential energy hypersurface for the conformational motion as a function of these coordinates. In the standard treatment of conformational preferences only this potential energy

hypersurface is taken into account. Minima on this hypersurface (and specially the global minimum) are considered as candidates for the optimal pharmacophore distribution. However, in this approach there is a lack of entropic effects. To solve this problem, we must build a conformational partition function to determine the statistical weight of the different structures (conformers). The established procedure considers a Boltzmann distribution involving only the conformational potential energy, and using fixed values for the internal coordinates [1,2]. The treatment of Farnell et al. [3] on the conformational free energy of histamine is a typical example of this kind of calculations. This technique is based in earlier works on the determination of statistical weights for conformations in macromolecules [4–7].

The exclusive use of the Boltzmann distribution for the conformational potential energy assumes that the

* Corresponding author. Tel.: +34 926 295 300x3720; fax: +34 926 295 354.

E-mail address: alfonso.nino@uclm.es (A. Niño).

rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy are constant with the conformation. Strictly speaking this is an approximation. Recently [8], we have developed a treatment for the conformational partition function that includes the effects of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy. The treatment follows the guidelines of the work by Gõ and Scheraga on macromolecules [4,5,7], and is based in the theoretical study of anharmonic, large amplitude vibrations in molecules. Thus, using ab initio methodology, the potential energy for the considered motion is obtained by relaxing the molecular geometry for fixed values of the conformational coordinates. The effect of the overall rotation and the conformational kinetic energy is introduced through the rotovibrational G matrix [9]. The results show that the difference in potential energy between the conformers has a clear effect in the influence of the rotovibrational G matrix.

Acetylcholine plays a key role in neural transmission. The classical work of Dale [10] established the division of the activity of acetylcholine in nicotinic and muscarinic, defined by the effect of these two acetylcholine agonists. Structural comparison of acetylcholine with several nicotinic and muscarinic agonists suggests that similar conformations are involved in the nicotinic and muscarinic activity [11,12]. From the structural standpoint, it has been proposed that the carbonyl oxygen is involved in the nicotinic interaction, whereas the ester oxygen is needed for the muscarinic activity [11,13].

Several theoretical works have been carried out on acetylcholine, including the classical work by Kier [14] using the extended Hückel method, the semiempirical INDO studies of Radna, Beveridge and others [15–18], the earlier ab initio work of Pullman and Port at the STO-3G level [19], and the DFT study of Segall et al. [20]. All these works deal with the determination of the minimum energy conformers on the potential energy hypersurface of acetylcholine. These studies show that in vacuum a low energy zone appears corresponding to the orientation of the acetoxo group with respect to the rest of the molecule. In addition, a local minimum is found for the most extended (open) conformation. The different minima on the hypersurface have been related to the muscarinic and nicotinic activity of acetylcholine [15,18]. The initial study of the solvent effect performed by Beveridge et al. at the INDO level [17] seems to show that the number of minima on the hypersurface is reduced in solution.

For neutral nicotine several theoretical works with the extended Hückel [21], PCILO [22], INDO [16], and AM1 [23] methods have been reported. Specially, relevant is the recent MP2/6-31G(d,p) study of Takeshima et al. [24]. These studies agree with NMR data in solution [25] showing that the methyl group on the pyrrolidine ring is placed *trans* with respect to the pyridinic ring. Also, these studies indicate that the two rings are approximately perpendicular to each other. However, comparison with acetylcholine shows that nicotine protonated at the pyrrolidine nitrogen is

the biologically active form. The recent theoretical study of Elmore and Dougherty [26] uses molecular mechanics and single-point electronic structure calculations at the MP2/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p) and B3LYP/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p) levels to describe single protonated, diprotonated and neutral nicotine. These authors found the *trans* form to be the most stable for single protonated nicotine. In addition, they identify two minima on the conformational coordinate (the dihedral describing the orientation of the pyrrolidine and pyridinic rings) very close in energy.

Muscarine has been the subject of some classical theoretical studies using the extended Hückel [14], PCILO [22] and INDO [16] methods. In particular, the last work, performed fixing the molecular parameters except the conformational degree of freedom, identifies three minima. Two of these minima are high in energy (more than 3 kcal mol⁻¹). More recently, a molecular mechanics study using the MM2(85) package [27] identifies the same three zones of minima. However, now the highest minimum is split in two, placed at about 5 kcal mol⁻¹ over the absolute minimum. All these works were carried out in vacuum.

Recently, Bikádi and Simonyi have performed a comparative study of 37 muscarinic and nicotinic cholinergic agonists in vacuum [28]. These authors determine minimum energy conformers through a random search using the MMFF94 force field. The structures found are fully optimized at the AM1 semiempirical level. From the results, the authors propose the intervals of geometrical parameters (including torsional angles) needed for a compound to express muscarinic or nicotinic activity.

Due to the intrinsic importance of acetylcholine and its two main agonists (muscarine and nicotine), it is of interest to have a uniform picture of the conformational distribution, including the entropic effects, of the biologically active form (cationic) of these three molecular systems. In this work, we present a theoretical treatment of the conformational behaviour of protonated nicotine, muscarine and acetylcholine in vacuum and aqueous solution. In particular, both the *cis* and *trans* forms of protonated nicotine are considered. The conformational population is determined at physiological temperature, including the effect of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy in the partition function. From these results, we analyse the structural similarity of the populated conformers of acetylcholine with those of protonated nicotine and muscarine. The variation of conformational preferences of acetylcholine when interacting with a receptor is simulated by placing the molecule in a thermal bath.

2. Methodology

The conformational behaviour of protonated nicotine, muscarine and acetylcholine is described by ab initio methodology. Correlation energy is accounted for at the MP2 level. As basis set, we have used the correlation

consistent double-zeta cc-pVDZ basis set [29]. This basis was developed to account in a balanced form for the correlation energy. The basis includes by definition polarization functions on hydrogens and heavy atoms.

The description of the molecular behaviour in aqueous solution is described using the Polarizable Continuum Model (PCM) [30]. The PCM model performs a realistic description of the molecular shape using a van der Waals surface cavity, and a detailed description of the electrostatic potential. The cavity/dispersion contribution is parameterized considering the surface area. All the calculations are carried out using the gaussian 98 package [31].

The structures and numbering conventions for nicotine, muscarine and acetylcholine are shown in Fig. 1. Nicotine and muscarine are one-dimensional problems, with only one conformational coordinate. The conformational coordinate for nicotine and muscarine is defined as dihedral N12C11C5C4 and N7C6C4O3, respectively. On the other hand, acetylcholine is a four-dimensional problem. However, it is well established that the acetoxy group is planar

[15,16]. Thus, the C1C2O4C5 angle is placed at an initial value of 180° , since it has been shown that C5 and C1 remains in *trans* one respect another [15,16]. In addition, the cationic head orientation can be accounted for in the relaxation of geometry (in the classical works this orientation is keep fixed). Thus, acetylcholine reduces to a two-dimensional problem. The two conformational coordinates are defined as dihedrals θ_1 (N7C6C5O4) and θ_2 (C6C5O4C2), see Fig. 1. Calculations on acetylcholine are simplified by the fact that it can be classified under a G_2 non-rigid group. The operations of this group are the identity and the simultaneous inversion of the two conformational angles. Thus, only one point needs to be calculated for the couple θ_1, θ_2 and $-\theta_1, -\theta_2$.

For nicotine, muscarine and acetylcholine a grid of points is generated on each conformational coordinate using increments of 30° , for the one-dimensional cases, and 60° for acetylcholine. A range of $0\text{--}360^\circ$ is considered. In vacuum, at each grid point the conformational coordinates are frozen, whereas the rest of the structure is fully relaxed.

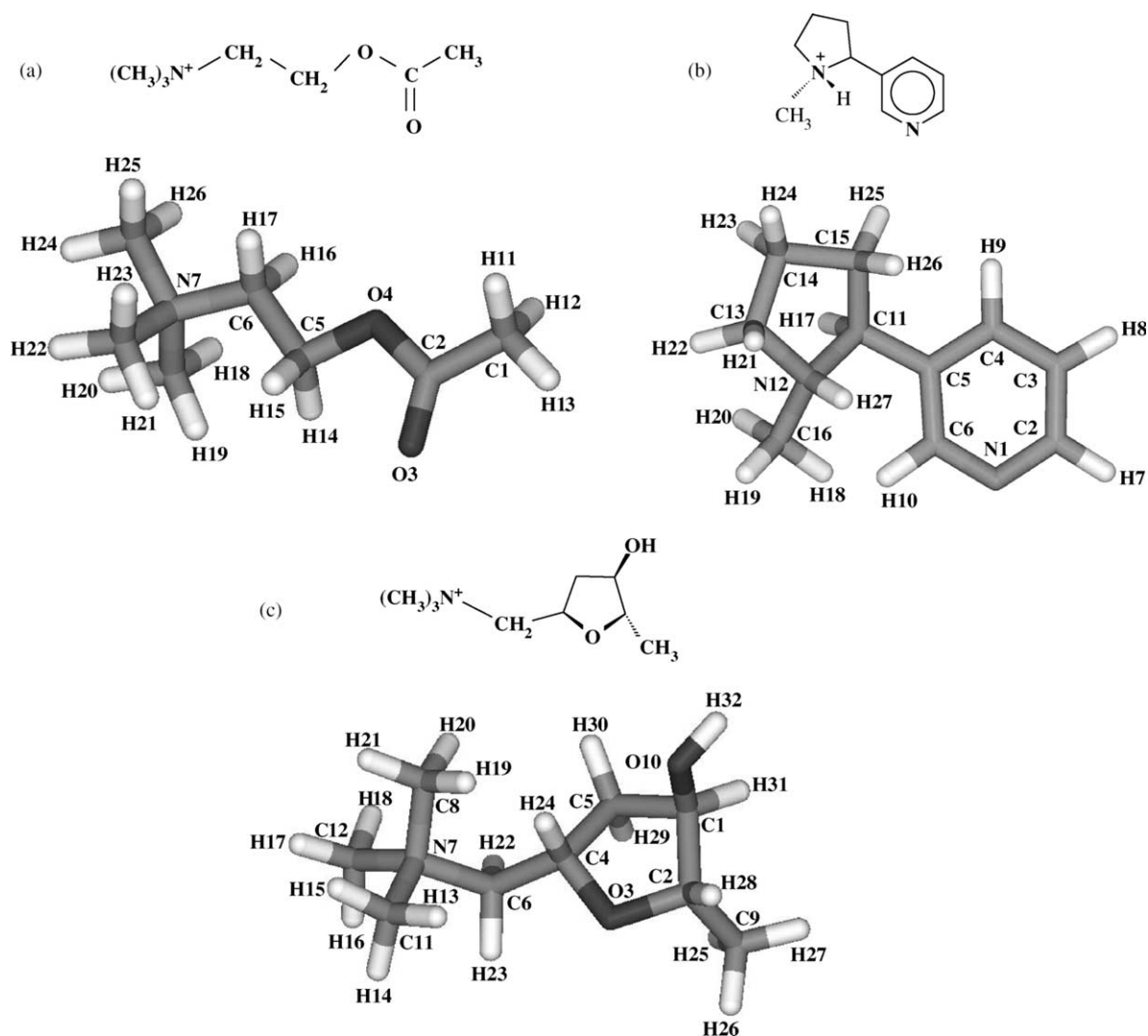


Fig. 1. Structure and numbering convention of the molecules considered in this work. (a) Acetylcholine; (b) protonated nicotine; (c) muscarine.

From the grid, the local minima are identified and localized by full relaxation of the closer structures. The algorithmic limitations of the software employed forces us to freeze the geometries for the solvated molecules at the values optimized in vacuum.

Population of conformers is obtained at physiological temperature (37 °C) using the technique previously described [8]. Thus, the population of a given conformer, $p(\Delta Q)$, is obtained as,

$$P(\Delta Q) = \frac{\left[\int_{Q_1}^{Q_2} |G(Q)|^{-1/2} \exp[-V(Q)/kT] \prod_i^m dq_i \right]}{Z_{rv}} \quad (1)$$

where the population of the conformer is defined by an interval ΔQ with limiting values of the conformational coordinates of Q_1 and Q_2 . $G(Q)$ is the rotovibrational G matrix at the conformation Q , V is the potential energy function, m the number of conformational coordinates considered, and Z_{rv} is the conformational (rotovibrational) partition function defined as [8],

$$Z_{rv} = 8\pi^2 \left(\frac{2\pi kT}{h^2} \right)^{(m+3)/2} \int_Q |G(Q)|^{-1/2} \exp[-V(Q)/kT] \times \prod_{i=4}^{m+3} dq_i \quad (2)$$

The rotovibrational G matrix is computed as described in [32] from the relaxed geometry obtained at each grid point. The integrations in Eqs. (1) and (2) are performed numerically. For the one dimensional cases, we apply a Romberg extrapolation using the trapezoidal rule [33]. The two-dimensional numerical integration in acetylcholine is performed using bicubic splines [34].

All computations have been carried out using an Origin 2300 workstation with eight R12000 processors, and a cluster of eight compatible PC's. Each node of the cluster incorporates a 2.4 GHz Pentium® 4 processor, 1 GB of DDR RAM, and a 60 GB ATA/100 hard disk. The nodes run under Red Hat Linux 8.0. Internetworking is achieved using a switch on a fast ethernet network.

3. Results and discussion

3.1. Conformational behaviour

3.1.1. Muscarine

Fig. 2 shows the potential energy variation for muscarine as a function of the torsion angle θ (N7C6C4O3). In vacuum, four minima appear, and they are labelled as I, II, III, and IV in increasing order of energy, see Table 1. After full relaxation of the geometry, these minima are found for values of the θ angle of 54.1, 325.0, 290.4 and 151.1°, respectively. Minimum II is placed 20.6 kJ mol⁻¹ above the global minimum. Minima III and IV are very shallow,

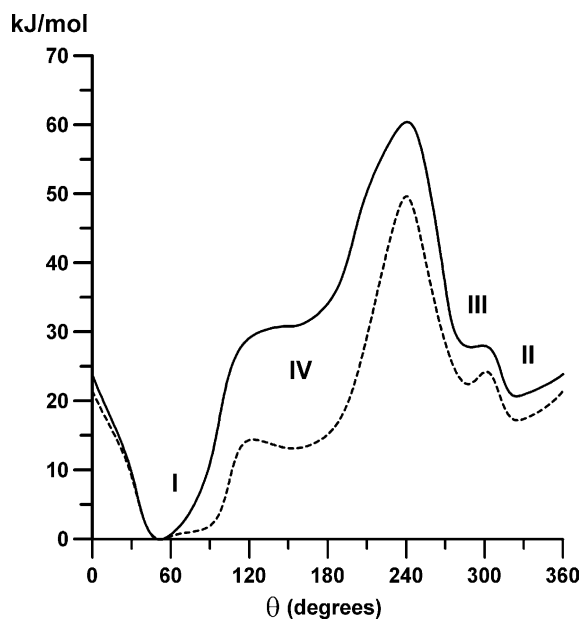


Fig. 2. Potential (conformational) energy variation of muscarine as a function of the θ (N7C6C4O3) torsional angle. Angles in degrees and energies in kJ mol⁻¹. Continuous line, data in vacuum. Dashed line, data in aqueous solution.

reaching 27.8 and 30.8 kJ mol⁻¹, respectively. Our results agree with previous data in vacuum obtained at the INDO semiempirical level [16], and with molecular mechanics calculations obtained using the MM2(85) package [27]. At the INDO level, using a constrained geometry, the global minimum appears at $\theta=60^\circ$ [16]. This study found our minimum IV at $\theta=160^\circ$, placed about 29 kJ mol⁻¹ (close to our result: 30.8 kJ mol⁻¹) above the global minimum. Molecular mechanics [27] found the global minimum at $\theta=78^\circ$. Minimum IV is found, for $\theta=161^\circ$. This last minimum is placed 8.7 kJ mol⁻¹ from the first one. This molecular mechanics value is about three times smaller than our MP2/cc-pVDZ result. Finally, our minima II and III appear located near $\theta=300^\circ$ for an energy value about 6 kcal mol⁻¹ (25.1 kJ mol⁻¹). In the INDO calculations [16] a decrease in energy around $\theta=320\text{--}360^\circ$ is found, but no minima appear at this level of theory.

On the other hand, Fig. 2 and Table 1 show a slightly different picture in aqueous solution. It is observed that the energy difference between the minima decreases. In particular, minimum IV decreases in energy under the values of minima II and III. The energy differences for

Table 1
Energy differences (in kJ mol⁻¹) between the minimum energy conformers found for muscarine in vacuum and solution

Conformer	Vacuum	Solution
I	0.0	0.0
II	20.6	17.1
III	27.8	22.6
IV	30.8	13.1

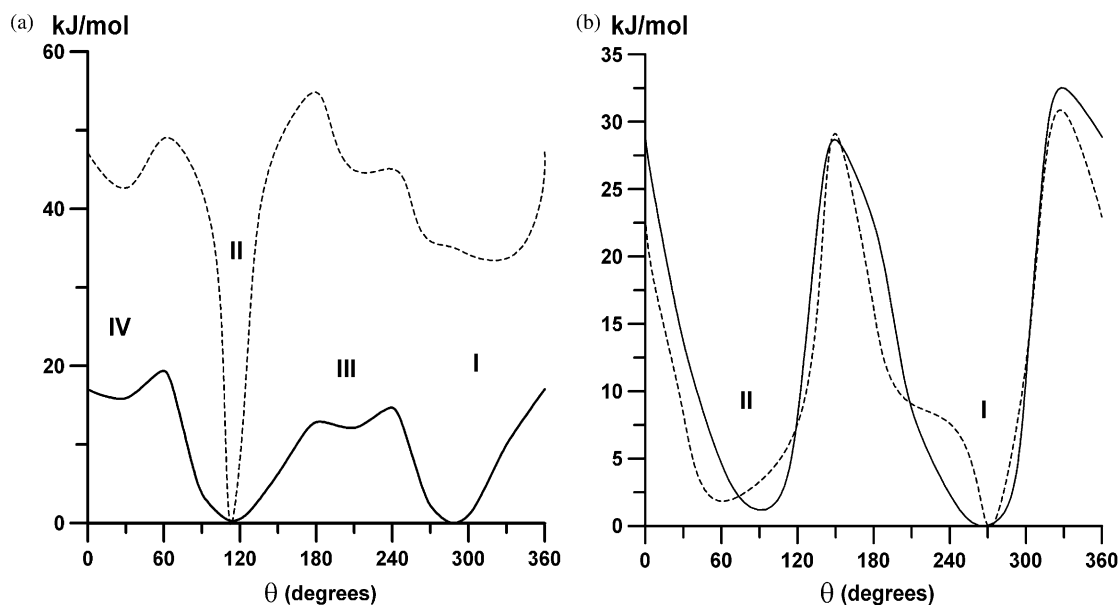


Fig. 3. Potential (conformational) energy variation of nicotine as a function of the θ (N12C11C5C4) torsional angle. Angles in degrees and energies in kJ mol^{-1} . Continuous line, data in vacuum. Dashed line data, in aqueous solution. Case (a), *trans*-nicotine. Case (b), *cis*-nicotine.

minima II, III and IV, relative to minimum I, are now 17.1, 22.6 and 13.1 kJ mol^{-1} , respectively. Therefore, conformer I is the most energetically stable species in vacuum as well as in solution. This result agrees with crystallographic data, which found a value of 73° for the angle θ [35]. It is of interest to compare our results with the Bikádi and Simonyi [28] structural proposal for muscarinic activity. In this work, its τ_1 angle corresponds to our θ torsional angle. Interestingly, the value obtained in Ref. [28] for τ_1 is 153.0° , which corresponds to our minima IV. This can be due to a wrong location of the global minimum by the random search procedure applied in Ref. [28] with the MMFF94 force field. Despite this, our conformer I exhibits a θ angle (54.1°) in the range of $45\text{--}170^\circ$ suggested by Bikádi and Simonyi [28] for muscarinic activity, and obtained from the results of a battery of different muscarinic agonists.

3.1.2. Protonated nicotine

Two forms of protonated nicotine, *cis* and *trans*, can exist as a function of the relative orientation of the N methyl substituent with respect to the pyridine ring. Previous data [26] from molecular mechanics and from calculations at the MP2/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p) and B3LYP/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p) levels show that the *trans* isomer is the minimum energy arrangement.

Fig. 3(a) shows the potential energy variation of *trans*-nicotine as a function of the torsion angle θ (N12C11C5C4). As described in [8], we observe in vacuum the existence of four minima labelled as I, II, III, and IV in increasing order of energy, see Table 2. The III and IV minima are found at 218.9 and 30° , for energy values of 11.9 and 15.9 kJ mol^{-1} , respectively. The global minimum, I, appears at 288.4° . The minimum II appears at 113.7° and is placed

0.3 kJ mol^{-1} above the global minimum. In these two minima, the pyrrolidine and pyridinic rings are placed almost perpendicular to each other. This result is in agreement with NMR observations [36] and recent ab initio data obtained at the HF/6-31G(d,p) level [26]. In this last work, the torsion angle corresponds to dihedral H17C11C5C6 in our numbering convention, see Fig. 1. The global/secondary minima are found by these authors for values of the torsion angle of $-5.9^\circ/178.0^\circ$. These Hartree–Fock data are in good agreement with our correlated results, which are calculated to be $-7.2^\circ/178.6^\circ$. Similar results are obtained for nicotine (unprotonated) at the MP2/6-31G(d,p) level by Takeshima et al. [24].

In solution, Fig. 3(a) dashed line, and Table 2, conformer II becomes the global minimum. The closest local minimum (minimum I) is placed about $\theta = 330^\circ$, and is 33.7 kJ mol^{-1} above minimum II. Thus, in solution the conformational mobility is greatly reduced.

Comparison of the *trans*-nicotine results with the Bikádi and Simonyi [28] data, must be done considering dihedral N12C11C5C6, in our numbering convention, which corresponds to the τ_1 angle in Ref. [28]. The torsional angle τ_1 for *trans*-nicotine in vacuum is found to be 136.2° by Bikádi

Table 2
Energy differences (in kJ mol^{-1}) between the minimum energy conformers found for *trans*- and *cis*-nicotine in vacuum and solution

Conformer	Trans-nicotine		Cis-nicotine	
	Vacuum	Solution	Vacuum	Solution
I	0.0	33.7	0.0	0.0
II	0.3	0.0	1.2	1.8
III	11.9	44.6	–	–
IV	15.9	42.6	–	–

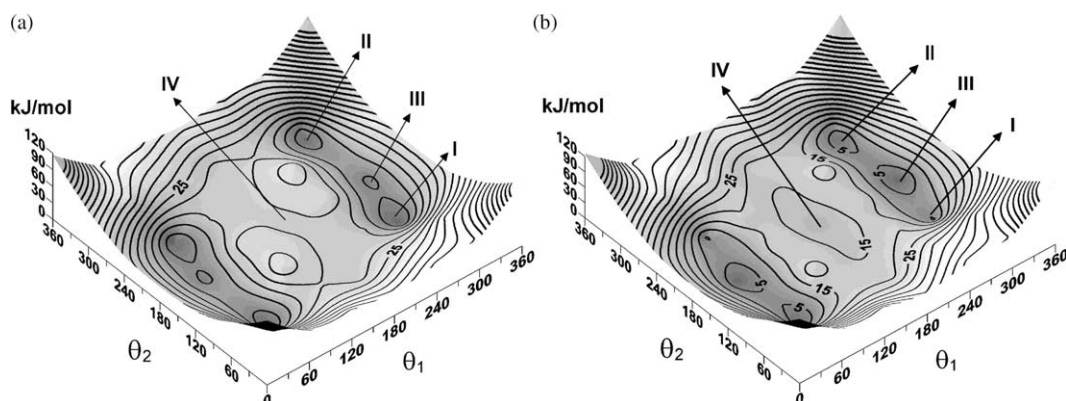


Fig. 4. Potential (conformational) energy variation of acetylcholine as a function of the θ_1 (N7C6C5C4) and θ_2 (C6C5O4C2) torsional angles. Angles in degrees and energies in kJ mol^{-1} . Interval between isocontour lines 5 kJ mol^{-1} . Case (a), data in vacuum. Case (b), data in aqueous solution.

and Simonyi [28]. This datum must be compared with the most stable minima found by us: conformer I at an equivalent τ_1 of 107.8° , and conformer II at -66.0° . It is clear that our conformer I corresponds to the conformer found in reference [28]. However, the range of τ_1 values identified by considering several nicotinic agonists at the AM1 level is -80 to -140° [28]. Conformer I falls out of this range, but conformer II (-66.0°) is very close to the higher limit (-80°). Interestingly, as can be seen in Table 2, conformers I and II in vacuum are very close in energy, but conformer II is by far the most stable one in solution.

In vacuum, the global minimum for the *cis* form is found 9.0 kJ mol^{-1} above the global minimum of the *trans* form. However, in solution the corresponding value increases to 44.3 kJ mol^{-1} . Taken into account the lack of geometry optimization in our calculations in solution, this datum must be considered as a qualitative overestimation. However, the value is so high (about 10 kcal mol^{-1}) that could be reasonable to conclude that the difference between the *trans-cis* isoforms is higher in solution. Considering this energy difference as an approximation to the Gibbs free energy, ΔG , for the *trans-cis* equilibrium, the *trans* form seems to be dominant in solution. This result, is in agreement with the 10:1 *trans-cis* ratio evaluated by Whidby and Seeman from NMR data [25].

The results for the *cis* form, are shown in Fig. 3(b) and Table 2. In this case, the behaviour is very similar in vacuum and solution. Only two minima are found in both cases. In vacuum, the global minimum, minimum I, is found for $\theta = 267.5^\circ$, after fully relaxing the geometry. In solution, a similar result is found. The secondary minimum, minimum II, is located in vacuum at $\theta = 90.9^\circ$ with an energy increase over minimum I of 1.2 kJ mol^{-1} . In solution, minimum II is displaced to $\theta = 60^\circ$ with a $\Delta E = 1.8 \text{ kJ mol}^{-1}$. Therefore, *cis*-nicotine exhibits a similar conformational behaviour in vacuum and solution. The conformational potential energy variation of *cis*-nicotine in vacuum is very similar to the molecular mechanics results of Elmore and Dougherty obtained with the MMFF94 force field [26].

3.1.3. Acetylcholine

Fig. 4 shows the potential energy surface obtained for acetylcholine in vacuum and solution, expanding from 0 to 360° the two conformational degrees of freedom, θ_1 (N7C6C5O4) and θ_2 (C6C5O4C2). The G_2 non-rigid group symmetry of acetylcholine is reflected in the equivalence of conformations with respect to the inversion on any of the diagonals of the potential energy hypersurface. In vacuum, a total of four minima are found on the hypersurface, see Table 3. The global minimum (conformer I) appears for a value of $\theta_1 = 283.8^\circ$, $\theta_2 = 112.3^\circ$. A secondary minimum (conformer II) appears for $\theta_1 = 298.6^\circ$, $\theta_2 = 282.5^\circ$, placed at 0.7 kJ mol^{-1} . A third minimum (conformer III) is found at $\theta_1 = 301.4^\circ$, $\theta_2 = 188.7^\circ$, placed at 3.8 kJ mol^{-1} . The last local minimum (conformer IV) appears at $\theta_1 = 180.3^\circ$, $\theta_2 = 180.0^\circ$, placed at 17.9 kJ mol^{-1} . These data agree qualitatively with the classical INDO results of Radna and Beveridge [15,16] and the recent DFT study of Segall et al. [20]. However, the energies relative to the minimum in the INDO results are higher than those found in the present study. This can be attributed to the lack of molecular relaxation in the INDO calculations. As pointed out in reference [15], minimum II can be identified with the geometry of acetylcholine in the bromide crystal, whereas minimum III can be implicated in the nicotinic and muscarinic activity as proposed by Chothia and Pauling [11,12]. In addition, minimum IV could be associated to the acetylcholine receptor in acetylcholinesterase [37] and to the nicotinic activity [38]. It is remarkable that minima I to III are found in a zone where θ_1 is close to 300° and θ_2 varies in an interval around

Table 3
Energy differences (in kJ mol^{-1}) between the minimum energy conformers found for acetylcholine in vacuum and solution

Conformer	Vacuum	Solution
I	0.0	4.4
II	0.7	1.7
III	3.8	0.0
IV	17.9	11.4

100–300°. In other words, the three smaller minima interconvert as a function of the θ_2 angle, which describes the relative orientation of the acetoxy group.

In solution, the same four minima are found, see Table 3. However, the relative energies for conformers I, II, III, and IV are now, 4.4, 1.7, 0.0 and 11.4 kJ mol⁻¹, respectively. Thus, conformer IV is stabilized by a decrease of energy. The result is that the gauche conformers (I, II, and III) are destabilized with respect to the conformer IV. However, the destabilization is not enough to make conformer IV become the global minimum. Conformer II changes slightly, whereas conformers I and III interchange their role. In fact, conformer III becomes the global minimum. As in vacuum, the three lowest minima correspond to a gauche conformation (θ_1 angle close to 300°), interconverting as a function of the acetoxy group orientation (θ_2 angle). This result agrees with the two-dimensional NMR study of Behling et al. in solution [39] showing a preferred gauche arrangement between the trimethylammonium and the acetoxy groups. In general terms, the conformational behaviour of acetylcholine seems to be maintained when going from vacuum to solution. Although more sophisticated, our results can be compared with the classical calculations in solution, at the INDO level, of Beveridge et al. [17]. These authors applied a solvation model which is a variant of the simple Onsager's spherical cavity model. In this classical work, minimum IV appears clearly and also minimum III, which, as in our present results, corresponds to the global minimum. No additional minima were found at the INDO level, probably due to the rigidity of the molecular structure used and to the limitations of the solvent model employed.

3.2. Conformational distribution population

The previous results are energetic, essentially enthalpic, data relative to the conformational behaviour. To account for entropic effects, a thermo-statistical analysis is performed applying Eqs. (1) and (2), at physiological temperature (37 °C), on muscarine, *trans*-nicotine (the most abundant isoform in vacuum and solution), and acetylcholine.

3.2.1. Muscarine

Fig. 5 shows the conformational population distribution of muscarine in vacuum and solution. In vacuum, it is observed that only conformer I is populated, as a consequence of the high-energy difference with conformers II, III and IV. In solution, conformer I is still the most populated (98.7%), but conformer IV is slightly populated (1.3%) as a consequence of its energetic stabilization with respect to the case in vacuum, see Fig. 2. Conformer II and III are not populated, neither in vacuum nor in solution.

3.2.2. Protonated nicotine

The conformational distribution of the most stable, *trans*, conformer of nicotine is shown in Fig. 6. As described in

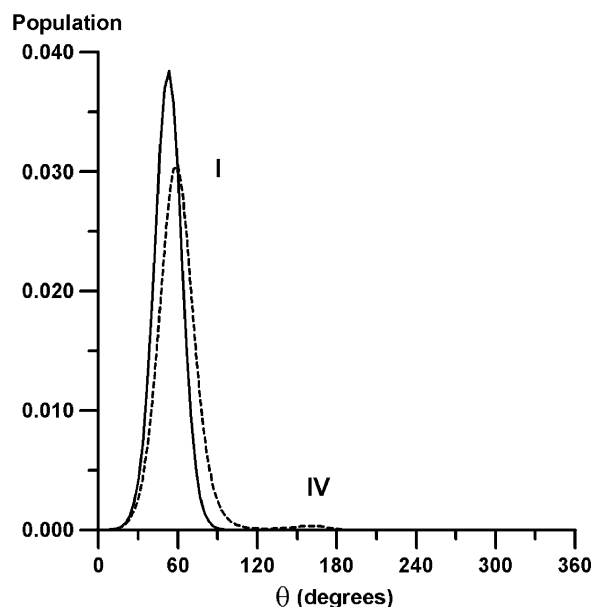


Fig. 5. Conformational population distribution of muscarine at physiological temperature (37 °C), as a function of the $\theta(\text{N7C6C4O3})$ torsional angle. Continuous line, data in vacuum. Dashed line, data in aqueous solution.

[8], we observe, in vacuum, conformers I and II similarly populated (49.4 and 50.6%, respectively), whereas in solution only conformer II remains. This result is a consequence of the large energetic stabilization of conformer II in solution, see Fig. 3.

3.2.3. Acetylcholine

The two-dimensional distribution of conformers is shown in Fig. 7. In vacuum, at physiological temperature,

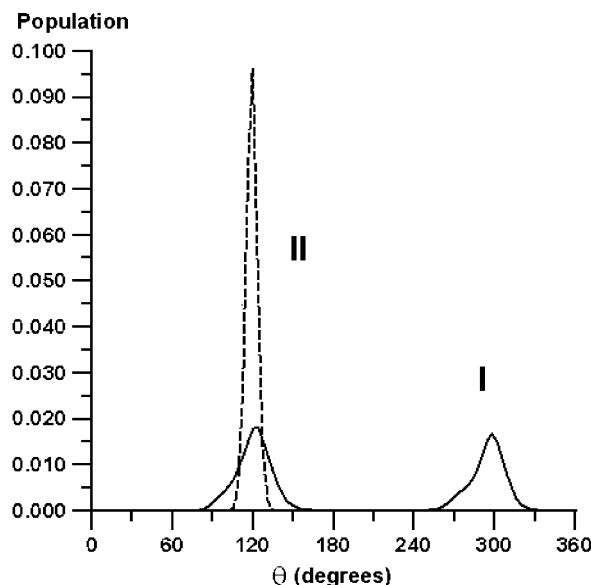


Fig. 6. Conformational population distribution of *trans*-nicotine at physiological temperature (37 °C), as a function of the $\theta(\text{N12C11C5C4})$ torsional angle. Continuous line, data in vacuum. Dashed line, data in aqueous solution.

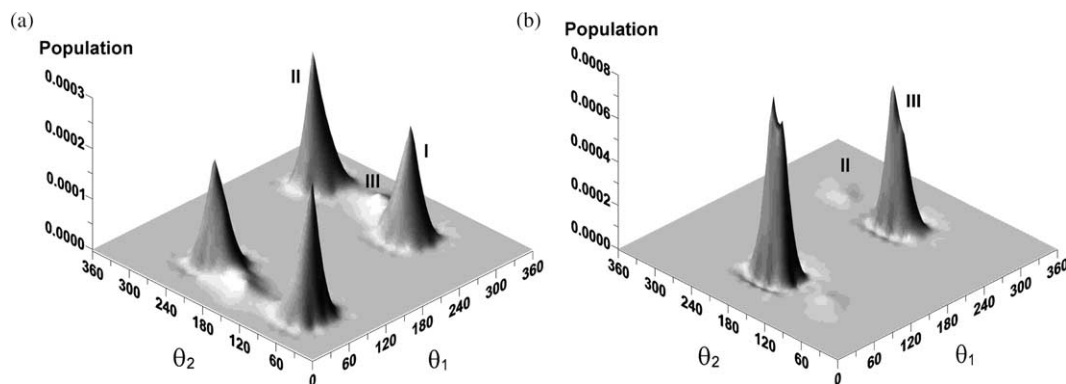


Fig. 7. Conformational population distribution of acetylcholine at physiological temperature (37 °C), as a function of the θ_1 (N7C6C5C4) and θ_2 (C6C5O4C2) torsional angles. Case (a), data in vacuum. Case (b), data in aqueous solution.

the population is concentrated around minima I (the population maximum appears at a θ_2 value of 127.3°) and II (population maximum at $\theta_2=287.3^\circ$). Minimum III is less populated and minimum IV is not populated at all. In solution, the situation differs. Now, the maximum population is placed around minimum III (placed at a θ_2 value of 188.7° in Fig. 4). This maximum population zone is delimited between θ_2 values of 200–127°, considering an isopopulation contour less or equal to 10^{-6} . Thus, the contribution of minimum I is merged with that of minimum III, producing the broad peak observed in Fig. 7(b), which has its maximum at $\theta_2=178.2^\circ$. Minimum II is slightly populated and, as in vacuum, minimum IV is not populated.

3.2.4. Equivalence of conformers

From the previous results, some specific conclusions can be drawn with respect to the conformations involved in the nicotinic and muscarinic activity in solution. In the earlier works on acetylcholine activity [11,13], it was proposed that the ester group of acetylcholine is used for the muscarinic activity, acting as the ring oxygen of muscarine. On the other hand, the carbonyl oxygen was assumed to be involved in the nicotinic activity, acting as the pyridinic nitrogen of nicotine. Thus, the pharmacophoric groups are the cationic head and the ester or carbonyl group for the muscarinic or nicotinic activity, respectively. In this context, we have computed the nitrogen-ring oxygen distance (N7O3) in the most populated conformer of muscarine in solution (conformer I). The value obtained is 2.92 Å. In a similar way, for the most populated conformer in solution of *trans*-nicotine (conformer II) the internitrogen distance (N12N1) is 4.65 Å. These data can be compared to the corresponding distances in acetylcholine. Thus, the N7O4 distances (ester oxygen) for the most stable conformers of acetylcholine in solution are 2.97 Å (conformer III) and 3.25 Å (conformer I). On the other hand, the N7O3 (carbonyl) distances for conformer III and conformer I in acetylcholine are 4.95 and 3.58 Å, respectively. Clearly, conformer III for acetylcholine has a N7O4 distance in agreement with the N7O3 distance in muscarine. In

addition, conformer III also exhibits a N7O3 distance very close to the N12N1 distance in *trans*-nicotine. Therefore, the structures close to conformer III in acetylcholine are compatible with the arrangement of the pharmacophoric groups in the most populated conformers of muscarine and nicotine in solution.

3.2.5. Variation of conformational population distribution of acetylcholine

The variation of conformational accessibility of acetylcholine for a given interaction energy is simulated by placing the molecule in solution in a thermal bath. A thermal energy (kT factor) of 5 kcal mol⁻¹ is used. This value is high enough to represent non-covalent interactions, but not so high as to populate indiscriminately all the conformers. The results are shown in Fig. 8. We observe that conformers I, II and III (all of them placed at a θ_1 value close to 300° or to the symmetry equivalent 60°) increase in population. In this zone two well-defined peaks appear corresponding to minimum II and minima (III, I). However, now the central zone, corresponding to a θ_1 value around 180°, is also populated. Thus, the flat high energy zone placed around minimum IV, see Fig. 4(b), is accessible by a

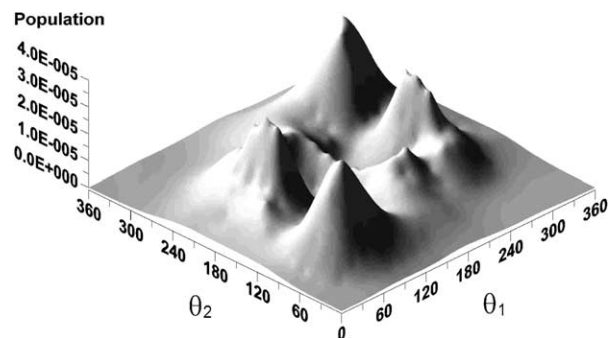


Fig. 8. Conformational population distribution of acetylcholine in solution, in a thermal bath of 5 kcal mol⁻¹, as a function of the θ_1 (N7C6C5C4) and θ_2 (C6C5O4C2) torsional angles.

torsion on the θ_1 angle, which determines the orientation of the trimethylammonium moiety.

4. Conclusions

This work presents a theoretical, thermostistical study of the conformational preferences of acetylcholine, muscarine and nicotine in vacuum and solution. The thermostistical treatment includes the effects of the rotovibrational coupling and the conformational kinetic energy.

In vacuum, at physiological temperature, only conformer I of muscarine (torsion angle $\theta = 54.1^\circ$) is populated. This structure corresponds to a conformation where the oxygen of the ring is placed in a *gauche* conformation with respect to the quaternary nitrogen. In aqueous solution, conformer I is still the most populated (98.7%).

In the case of nicotine, the *trans* isoform is the most stable. For this structure, conformers I and II (torsion angles of 288.4 and 113.7°, respectively) accumulate the population (49.4 and 50.6%). Both conformations correspond to structures where the pyrrolidine and pyridinic rings are placed perpendicular to each other. On the other hand, in solution, conformer II is the most stable one, becoming the only populated form.

With respect to acetylcholine, the population of conformers in vacuum is concentrated in a zone (conformers I and II) where the cationic head is found fixed in a *gauche* conformation (θ_1 angle always close to 300°), with respect to the C6C5O4 plane. In this conformational zone, the orientation of the acetoxy moiety (θ_2 angle) defines the molecular conformation. In solution, we observe a similar behaviour, with the cationic head in the same *gauche* orientation.

Assuming that the oxygen of the ester group of acetylcholine acts as the ring oxygen of muscarine, and that the carbonyl oxygen acts as the pyridinic nitrogen of nicotine, we have analysed the equivalence of conformers in the three molecules in solution. To such end, we have used interatomic distances to account for the equivalence of pharmacophoric groups for the most populated conformers at physiological temperature. The results show that the conformational space of acetylcholine close to conformer III and corresponding to the orientation of the acetoxy moiety, agrees with the most populated conformers in solution for muscarine (conformer I) and nicotine (conformer II).

Simulation of the effect of the acetylcholine interaction with the receptor site, by using a thermal bath of 5 kcal mol⁻¹, shows an increase in the torsional flexibility of the acetoxy moiety. In addition, the zone corresponding to a *trans* orientation of the nitrogen with respect to the ester oxygen increases clearly its population.

Acknowledgements

One of us, M.E.C.S., wishes to thank the CONACyT (México) for a graduate grant (grant # 171982). The authors also thank the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Spain) for financial support (grant # PAI-02-001).

References

- [1] W.G. Richards, Quantum Pharmacology, second ed., Butterworths, London, 1983.
- [2] G.H. Grant, W.G. Richards, Computational Chemistry. Oxford Chemistry Primers, Oxford University Press, New York, 1995.
- [3] L. Farnell, W.D. Richards, C.R. Ganellin, J. Theor. Biol. 43 (1974) 389.
- [4] N. Gö, M. Gö, H.A. Scheraga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59 (1968) 1030.
- [5] N. Gö, H.A. Scheraga, J. Chem. Phys. 51 (1969) 4751.
- [6] P. Flory, J. Macromol. 7 (1974) 381.
- [7] N. Gö, M. Gö, H.A. Scheraga, Macromolecules 9 (1976) 535.
- [8] A. Niño, C. Muñoz-Caro, M. Mora, S. Reyes, J. Phys. Chem. A 107 (2003) 10191.
- [9] (a) H.M. Pickett, J. Chem. Phys. 56 (1972) 1715; (b) J.D. Lewis, T.B. Malloy Jr., T. Chao, J. Laane, J. Mol. Struct. 12 (1972) 427; (c) M.A. Harthcock, J. Laane, J. Phys. Chem. 89 (1985) 4231; (d) C. Muñoz-Caro, A. Niño, Comput. Chem. 18 (1994) 413; (e) A. Niño, C. Muñoz-Caro, Comput. Chem. 4 (1995) 371.
- [10] H.H. Dale, Pharmacol. Exp. Ther. 6 (1914) 147.
- [11] C. Chothia, Nature 225 (1970) 36.
- [12] C. Chothia, P. Pauling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65 (1970) 477.
- [13] W.H. Beers, E. Reich, Nature 228 (1970) 917.
- [14] L.B. Kier, Mol. Pharmacol. 3 (1967) 487.
- [15] D.V. Beveridge, R.J. Radna, J. Am. Chem. Soc. 93 (1971) 3759.
- [16] R.J. Radna, D.L. Beveridge, A.L. Bender, J. Am. Chem. Soc. 95 (1973) 383.
- [17] D.L. Beveridge, M.M. Kelly, R.J. Radna, J. Am. Chem. Soc. 96 (1974) 3769.
- [18] M. Froimowitz, J. Gans, J. Am. Chem. Soc. 94 (1972) 8020.
- [19] A. Pullman, G.N. Port, J. Theoret. Chim. Acta 32 (1973) 77.
- [20] M.D. Segall, M.C. Payne, R.N. Boyes, Mol. Phys. 93 (1998) 365.
- [21] L.B. Kier, Mol. Pharmacol. 4 (1968) 70.
- [22] B. Pullman, P. Courrière, J.L. Coubeils, J. Mol. Pharmacol. 7 (1971) 397.
- [23] M. Berthelot, M. Decouzon, J.F. Gal, C. Laurence, J.V. Le Questel, P.C. Maria, J. Tortajada, J. Org. Chem. 56 (1991) 4490.
- [24] T. Takeshima, R. Fukumoto, T. Egawa, S. Konaka, J. Phys. Chem. A 106 (2002) 8734.
- [25] J.F. Whidby, J.I. Seeman, J. Org. Chem. 41 (1976) 1585.
- [26] D.E. Elmore, D.A. Dougherty, J. Org. Chem. 65 (2000) 742.
- [27] P.J. Carroll, M. De Amici, C. De Mucheli, L. Toma, J. Med. Chem. 35 (1992) 305.
- [28] Z. Bikádi, M. Simonyi, Curr. Med. Chem. 10 (2003) 2611.
- [29] T.H. Dunning Jr., J. Chem. Phys. 90 (1989) 1007.
- [30] (a) M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, J. Tomasi, Chem. Phys. Lett. 255 (1996) 327; (b) V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi, J. Chem. Phys. 107 (1997) 3210.
- [31] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski,

- J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, GAUSSIAN 98, Revision A.7, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [32] A. Niño, C. Muñoz-Caro, *Comput. Chem.* 18 (1994) 27.
- [33] W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery, *Numerical Recipes in Fortran 77*, second ed., Cambridge University Press, New York, 1992.
- [34] G. Engeln-Müllges, F. Uhlig, *Numerical Algorithms with Fortran*, Springer, Berlin Heidelberg, 1996.
- [35] F. Jellinek, *Acta Crystallogr.* 10 (1957) 277.
- [36] T.P. Pitner, W.B. Edwards III, R.L. Bassfield, J.F. Whidby, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 246.
- [37] C. Chothia, P. Pauling, *Nature* 223 (1969) 919.
- [38] M. Martin-Smith, A. Small, J.B. Stenlake, *J. Pharm. Pharmacol.* 19 (1967) 561.
- [39] R.W. Behling, T. Yamane, G. Navon, L.W. Jelinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6721.