



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO QUÍMICA ANALÍTICA E INORGÁNICA

ENTENDIENDO LOS PUENTES DE HALÓGENO DESDE UN PUNTO DE VISTA TEÓRICO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

LESLIE HELENA SAAVEDRA RIVAS

DIRECTOR Y PATROCINANTE DE MEMORIA:
GERALD ZAPATA TORRES

CO-DIRECTOR DE MEMORIA:
BRUCE K. CASSELS

SANTIAGO DE CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

Habiendo terminado este proceso tan importante en mi vida quiero aprovechar para agradecer a la gran cantidad de personas que aportaron a que este proyecto llegará a puerto con enormes satisfacciones.

Primero que todo agradezco profundamente a toda mi familia, en especial a mis padres Juan Alberto y Elena por darme la mejor educación académica, pero más que todo por haberse involucrado en cada paso de mi vida, lo que me ha llevado a transformarme en la persona que soy hoy.

Al Profesor Gerald Zapata Torres y el grupo de la Unidad de Gráfica Molecular que además de ser un muy buen guía en mi carrera y en la culminación de ésta, lograron que todo este proceso de aprendizaje fuera a la vez de compañerismo y diversión.

Al Profesor Bruce Cassels que me orientó y acompañó constantemente en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros y amigos, con los que compartimos numerosas jornadas de estudio e indudablemente muchas jornadas de distracción.

Y por supuesto a Raphael que ha estado conmigo los últimos 6 años.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Sistema de estudio	2
1.3. Resolviendo el problema	5
2. Metodología	7
2.1. Programas	7
2.2. Obtención de las estructuras	7
2.3. Mapas de potencial electrostático	7
2.4. Optimización de distancias Halógeno-Base de Lewis	9
2.5. Cálculo de cargas parciales usando RESP	10
2.6. Simulaciones de dinámica molecular	12
3. Resultados y Discusiones	15
3.1. Moléculas utilizadas en este estudio	15
3.2. Interacciones observadas en los inhibidores	16
3.2.1. Interacciones en inhibidores sustituidos con flúor (IA3-IB3)	17
3.2.2. Interacciones en inhibidores sustituidos con cloro, bromo o yodo	19
3.2.3. Interacciones en inhibidores sustituidos con metilo (IA2, IB2)	23
3.2.4. Efecto de la sustitución con flúor en la posición meta	25
3.2.5. Puente de halógeno secundario	30
3.3. Comparación de resultados con datos experimentales	32
3.3.1. Comparación con valores de IC ₅₀	32
3.3.2. Comparación datos teóricos con datos cristalográficos	36
4. Conclusiones	41
5. Bibliografía	43
6. Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Inhibidor en el sitio activo de la catepsina L	4
Figura 2	Mapas de potencial electrostático de halo-bencenos	8
Figura 3	Dinámica molecular inhibidores IA3-IB3	18
Figura 4	Dinámica molecular inhibidores IA4-IB4	19
Figura 5	Dinámica molecular inhibidores IA5-IB5	21
Figura 6	Dinámica molecular inhibidores IA6-IB6	22
Figura 7	Dinámica molecular inhibidores IA2-IB2	24
Figura 8	Efecto de la sustitución de flúor en la posición meta	27
Figura 9	Mapas de potencial electrostático de los inhibidores	29
Figura 10	Puentes de halógeno secundario	31
Figura 11	Comparación de valores calculados y valores de IC ₅₀	35
Figura 12	Comparación de valores calculados con datos cristalográficos para el puente de halógeno principal	37
Figura 13	Comparación de valores calculados con datos cristalográficos para el puente de halógeno secundario	39

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Valores de radios van der Waals	2
Tabla 2	Identificación de los inhibidores y valores de IC ₅₀ .	15
Tabla 3	Valores de IC ₅₀ obtenidos de la literatura y valores de distancia y ángulos promedio de enlace obtenidos con dinámica molecular para los inhibidores en estudio	33

RESUMEN

Los puentes de halógeno son interacciones estables entre un átomo de halógeno y otro átomo electronegativo cercano. Esta interacción se produce por la presencia del denominado agujero σ ; una región positiva originada por la anisotropía en la distribución de la densidad electrónica en los halógenos.

En esta tesis, se desarrolló una nueva metodología para estudiar la naturaleza de estos puentes de halógeno en sistemas biológicos usando resultados experimentales donde estas interacciones están presentes. Mediante cálculos mecano cuánticos y simulaciones de dinámica molecular se estudiaron dos series de inhibidores de la enzima catepsina L. A través de la aplicación de esta metodología se explica el aumento de afinidad observado de estos inhibidores halogenados comparado con otros sin sustitución con halógeno.

La fuerza de los puentes de halógeno reproducen la tendencia experimental observada en el orden $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$. Esta interacción no está presente en compuestos sustituidos con flúor o grupo metilo. Además se reporta una correlación entre los valores experimentales de IC_{50} y datos cristalográficos disponibles.

ABSTRACT

UNDERSTANDING HALOGEN BONDS FROM A THEORETICAL VIEW

Halogen bonds are stable interactions between a halogen atom and a close electronegative atom. This interaction is produced by the presence of σ hole; a positive region caused by the anisotropic distribution of the charge density on the halogen atom.

In this thesis, a new methodology was developed to study the nature of these halogen bonds in biological systems using experimental results where these interactions are present. Through quantum mechanics along with molecular dynamics simulations two series of cathepsin L inhibitors were studied aiming to explain the observed enhanced affinity of various halogenated ligands compared with those without halogen substitution.

The strength of halogen bonds reproduced the increased observed experimental trend in the order of $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$. It is worth to mention that this interaction is absent in compounds bearing fluorine and methyl groups. Our results correlate in good agreement with experimental IC_{50} values and the crystallographic data available.

1. Introducción

1.1. Antecedentes

El enlace por halógeno es una interacción estable entre un átomo de halógeno enlazado covalentemente y un átomo electronegativo cercano (base de Lewis), cuya estructura general es $A-X\cdots Y$ (Y ; base de Lewis y X ; Cl, Br, I). Esta interacción se produce por la anisotropía en la distribución de la densidad de carga sobre el átomo de halógeno, dando como resultado una región positiva, denominado agujero σ , en el eje del enlace $A-X$.

La fuerza de estos puentes de halógeno crece en el orden de $Cl < Br < I$, en relación con el tamaño de cada átomo. A pesar que el átomo de flúor es un halógeno, no tiene la capacidad de formar estas interacciones, pues carece de la región positiva en el eje del enlace probablemente debido a su gran electronegatividad.¹⁻³ Los enlaces por halógeno comparten características con los puentes de hidrógeno, como que son fuertemente direccionales, con un ángulo $A-X\cdots Y$ óptimo de 180° , y una distancia $X-Y$ idealmente menor que la suma de sus radios van der Waals³ (Tabla 1).

Se han realizado numerosos estudios con respecto a este tipo de enlaces, inicialmente en la búsqueda de posibles aplicaciones en ingeniería de cristales y en el desarrollo de materiales sólidos con propiedades electrónicas deseables.^{4,5} Recientemente, estos

enlaces también han sido observados en sistemas biológicos donde podrían cumplir un papel importante en la afinidad que muestran algunas moléculas.⁶⁻¹¹

Tabla 1. Valores de radios van der Waals (Å) para los átomos involucrados en este estudio. Valores publicados.¹⁶

H	C	O	S
1,06	1,53	1,42	1,80
F	Cl	Br	I
1,40	1,75	1,87	2,04

Se ha descrito correctamente la anisotropía de densidad electrónica que origina estos enlaces por halógeno con métodos mecánico-cuánticos como DFT o MP2,^{3,7,18} con la idea de desarrollar distintas metodologías para dar cuenta de esta interacción a nivel biológico y obtener así resultados concluyentes respecto a la participación de estos enlaces en la afinidad de algunas moléculas halogenadas por sus blancos biológicos.⁹⁻

¹¹ Estos esfuerzos requieren de datos bioquímicos y/o farmacológicos que permitan comparar afinidades experimentales y parámetros teóricos calculados; sin embargo, estos datos han sido escasos para determinar una real correlación y aplicabilidad de las metodologías propuestas.

1.2. Sistema de estudio

En los últimos años, la cuantificación de la inhibición de la catepsina L por dos extensas series de moléculas sustituidas con hidrógeno, metilo, flúor, cloro, bromo o iodo en una posición específica,⁸ ha entregado una serie de resultados útiles que permiten que una metodología desarrollada haga de puente entre los datos experimentales y teóricos de forma tal de no tan sólo modelar la interacción de enlace por halógeno sino que además describir las bases que sustentan la interacción con aplicación en otros sistemas.

Las catepsinas son proteasas del tipo cisteína que son parte clave de eventos patológicos y biológicos. Son consideradas dianas terapéuticas, pues es posible inhibir su actividad enzimática con pequeñas moléculas y son, por esto, de gran interés para la industria farmacéutica.^{12,13} La catepsina L es una proteasa lisosomal que está distribuida en diversas células y tejidos y es la principal responsable del catabolismo intracelular de proteínas,¹⁴ está asociada a enfermedades como la arteriosclerosis, el síndrome metabólico y el cáncer, y ha sido relacionada con la resorción ósea, la maduración de los espermatozoides y la patobiología de los macrófagos.^{14,15}

Recientemente se ha estudiado una familia de inhibidores (Figura 1) de la catepsina L que se unen covalentemente con al residuo Cys25 en el bolsillo denominado S1.¹⁵ Uno de estos inhibidores, que contiene un átomo de cloro en el anillo bencénico en la región que se une al bolsillo S3, resultó ser un orden de magnitud más potente que su análogo no sustituido. Esto llevó a la hipótesis que los puentes de halógeno pueden

estar implicados en el mejoramiento de la afinidad de compuestos halogenados en general.

L. Hardegger y colaboradores del grupo de François Diederich procedieron a sintetizar y probar una gran cantidad de derivados de las estructuras iniciales, en las cuales el anillo aromático que se espera interaccione con el bolsillo S3 no está sustituido o lo está con átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, entre otros.⁸

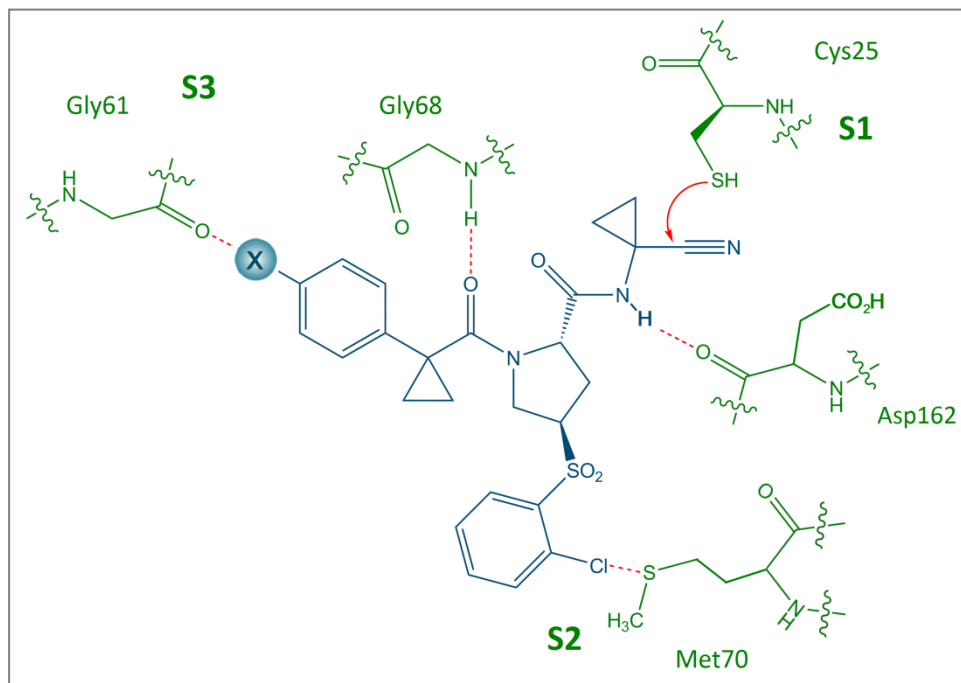


Figura 1. Interacciones de un inhibidor en el sitio activo de la catepsina L. El inhibidor se une covalentemente a la cadena lateral de la Cys25 formando el iminotioéster, y se encuentra estabilizado por puentes de hidrógeno con los grupos N-H y C=O de la Gly68 y Asp162 respectivamente.

De acuerdo a estos autores, la introducción de un átomo de cloro en la posición X del anillo unido al ciclopropil disminuye el valor del IC_{50} notablemente (es decir aumenta la afinidad), incluso hasta 20 veces en algunos casos.

Para ambas series análogas los autores calcularon que la ganancia en la energía libre de enlace al ir desde un anillo sin sustitución a la sustitución con cloro es cercana a las 1,5 kcal/mol. La estructura cristalina de uno de los compuestos sustituidos con cloro muestra que el átomo de cloro se encuentra a 3,1 Å de distancia del oxígeno carbonilo del residuo Gly61 (la suma de radios van der Waals es de 3,27 Å), formando un ángulo C-Cl...O de 174°, otorgando mayor soporte a la hipótesis de que el puente de halógeno participa en la estabilización del complejo enzima-inhibidor.⁸

Debido a que los programas utilizados para simular interacciones entre ligandos y proteínas ya sea de docking o de dinámica molecular no consideran la existencia de enlaces por halógeno y que existe la necesidad de poder representar datos cristalográficos u otros experimentales como los mencionados previamente, es necesario desarrollar metodologías para simular las interacciones entre los átomos de halógeno y los pares de electrones en bases de Lewis.

1.3. Resolviendo el problema

El objetivo de esta tesis fue desarrollar una metodología que permitiera, utilizando simulaciones de dinámica molecular, considerar la presencia de puentes de halógeno tanto en el aspecto electrónico como en las interacciones droga-receptor, para aplicarlo

satisfactoriamente a sistemas biológicos que presentan cambios en la afinidad debido a la presencia de estos átomos como es el caso de los inhibidores de catepsina L humana descritos previamente.

En 2011 Mahmoud desarrolló el concepto de punto extra de carga con el objeto de representar la naturaleza de la anisotropía presentada por los átomos de halógeno.¹⁰ En esta tesis se utilizó este mismo concepto para representar el agujero σ observado en los halógenos en el eje del enlace A—X.

Se analizó en este estudio la existencia y naturaleza de las interacciones entre el sustituyente X y el residuo Gly61. Paralelamente se estudió la posible existencia de un puente de halógeno secundario formado por el átomo de cloro del anillo bencénico inferior (ver Figura 1) y el azufre de la Met70.

2. Metodología.

2.1. Programas.

- Gaussian, versión 98. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.²¹
- Gauss View. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.²²
- AMBER, versión 12 .(Antechamber, RESP, xLeaP,) ²³
- VMD, versión 1.9.1. Desarrollado por el Grupo de Biofísica Teórica y Computacional en el Instituto Beckman, Universidad de Illinois.

2.2. Obtención de las Estructuras.

Todas las estructuras cristalinas obtenidas como base para este estudio fueron descargadas del RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org), códigos PDB: 2XU4, 1XU2, 2YJ2, 2YJ8.

2.3. Mapas de Potencial Electroestático.

El potencial electroestático molecular (MEP) es un campo electrostático creado a partir de la distribución de carga electroestática y nuclear, derivado de las cargas atómicas. Es útil para determinar posibles trayectorias de acercamiento de un reactivo.

Un mapa de potencial electrostático permite visualizar la manera en que se distribuyen los electrones en una molécula, por lo que es una buena manera de observar la

anisotropía en la distribución de la densidad de carga sobre el átomo de halógeno que se ha definido como agujero σ .

En la Figura 2 se observan los mapas de potencial electrostáticos calculados para bencenos sustituidos con halógenos.¹⁰ En esta figura se observa la naturaleza del agujero σ y se observa como aumenta su tamaño conforme aumenta el tamaño del halógeno.

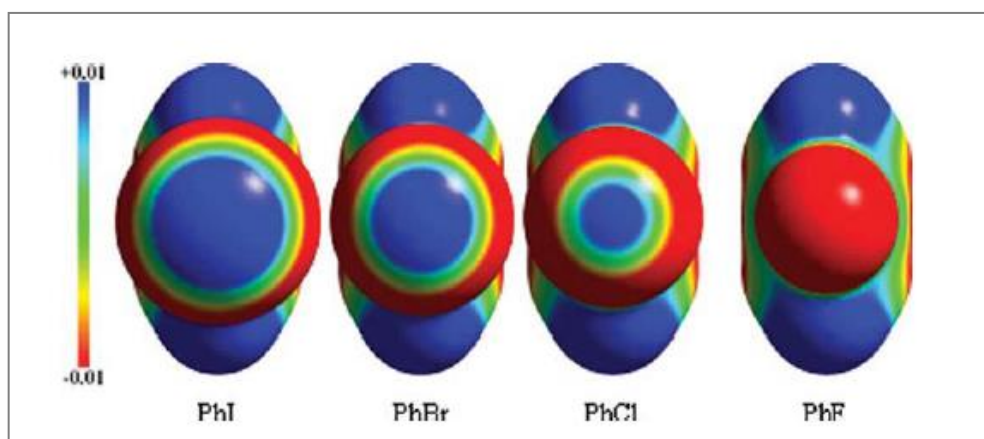


Figura 2. Superficie de potencial electrostático de halo-bencenos. Las regiones rojas representan mayor densidad electrónica, mientras las azules representan regiones con menor población electrónica. Imagen obtenida de Mahmoud A. A. I., *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 2564-2574.

Para el caso de esta investigación se obtuvieron mapas de potencial electrostático mediante Gaussian98 y GaussView para algunos de los inhibidores en estudio, específicamente los sustituidos con Cl, Br y I para observar la existencia y características del agujero σ .

2.4. Optimización de la Distancia Halógeno – Base de Lewis.¹⁰

Para conocer la distancia de equilibrio entre el halógeno y la base de Lewis (oxígeno en este caso) se optimizaron los complejos utilizando halógenobencenos y formaldehído como compuesto modelo (sustitución con Cl, Br, I), para utilizar esta distancia como referencia en posteriores cálculos. Estos cálculos mecano-cuánticos se llevaron a cabo en Gaussian98.

Para los compuestos substituidos con Cl se utiliza la funcional *MPWLYP* y para los compuestos con Br y I se usa la funcional *B3LYP*. Se utiliza el conjunto de bases *6-311+G*** para los átomos de C, H, O y Cl.

Debido a la gran densidad electrónica de los átomos de iodo y bromo es necesario usar el conjunto de bases *aug-cc-pVDZ-PP*¹⁷

¹⁸ para lograr una buena descripción de ellos. Se debe utilizar el comando *GEN* para la utilización de mezcla de bases y el comando *Pseudo=Cards* para considerar correctamente los pseudo-potenciales. Para las optimizaciones se utilizó el comando *modredundant* para mantener el ángulo del enlace por halógeno fijo en 180°.

2.5. Cálculo de Cargas Parciales Usando el Ajuste Restringido del Potencial Electroestático (RESP)

El método más preciso que ofrece AMBER para definir las propiedades electrostáticas de un sistema es el ajuste restringido del potencial electrostático (Restrained Electrostatic Potential fit o RESP). El método RESP ajusta el potencial electroestático calculado mecano-cuánticamente a superficies moleculares, usando un modelo de carga puntual centrada en el átomo. Para generar el archivo de entrada del potencial electroestático para ejecutar el RESP, debe ser usado un programa como Gaussian98.

CONSTRUCCIÓN DE LOS INHIBIDORES

Se obtiene la estructura en formato PDB de la proteína y el inhibidor (código PDB: 2XU1). Mediante GaussView y a partir de esta estructura descargada de la base de datos se crean los archivos de entrada para Gaussian.

En este caso en particular, el ligando se une covalentemente al residuo Cys25 de la catepsina, por lo que se incluye la Cys25 para realizar los cálculos de optimización y energía del inhibidor. Además se agregan los “cap” (acetilo y metilamino), utilizados para que el cálculo de optimización de energía sea correcto, pues simulan los enlaces que unirían la Cys25 con el resto de la proteína.

CÁLCULO DE CARGAS PARCIALES

Una vez construidas las moléculas necesarias se realiza una optimización del complejo ligando-Cys25 con Gaussian98 usando el conjunto de bases B3LYP/6-31G** para todos los átomos excepto el yodo que es tratado con el conjunto de bases aug-cc-pVDZ-PP. De esta forma se obtienen las coordenadas de los átomos optimizados y las cargas ESP.

OBTENCIÓN DE CARGAS RESP

Se extraen los puntos de carga calculados previamente en Gaussian98 mediante el programa ESPGEN de AMBER y se agregan las coordenadas de los puntos extras a las distancias de equilibrio para cada halógeno. Por otra parte, usando las herramientas de ANTECHAMBER se obtiene un archivo de entrada para RESP (archivo .ac). A este archivo se le agregan también las coordenadas de los puntos extras (denominados Bq en Gaussian) de forma manual mediante un editor de texto.

Posteriormente usando el programa RESPGEN se obtienen los archivos necesarios para ejecutar RESP que contienen número atómico y el tipo de cálculo de carga que se aplicará. Con estos archivos se obtiene la asignación de las cargas a cada átomo usando el programa RESP, se realiza esto en 2 etapas; usando criterio resp1 primero y luego resp2 basado en el primer cálculo.

Una vez obtenidos los archivos que contienen las cargas RESP, se utiliza el programa PREPGEN para convertir el archivo antechamber .ac en un archivo .prepin que es compatible con xLeap.

Para utilizar xLeap y continuar con la creación de archivos de topología y coordenadas, es necesario tener un archivo que contenga los parámetros no conocidos de la molécula. Para eso se crea el archivo de parámetros (.frcmmod) a partir del archivo .prepin usando la utilidad ParmChk de Amber. Este archivo .frcmmod contiene parámetros de los átomos, como enlaces y ángulos, y es necesario agregar manualmente los parámetros que definen el Bq.

2.6. Cálculos de Dinámica Molecular.

Una vez asignadas las cargas RESP, el siguiente paso para llegar al cálculo de dinámica molecular es la creación de archivos de topología y coordenadas, estos archivos .prmtop e .inpcrd pueden ser obtenidos mediante el programa xLeap a partir de la creación de las librerías y los archivos de parámetros de cada molécula (.lib y .frcmmod).

xLeap es un programa que toma información de campos de fuerza, topología y coordenadas y produce los archivos necesarios para cálculos de producción como minimizaciones, dinámica molecular, etc.

CREACION DE ARCHIVOS DE TOPOLOGÍA Y COORDENADAS

Usando el programa xLeap, el archivo .prepin creado en los pasos anteriores se edita para eliminar los "caps" y modificar la carga de la molécula para que sea neutra. Así, se crean las librerías del residuo Cys25, y del ligando sin la Cys25.

Con los archivos de parámetros (.frmod), y las librerías (.lib) del residuo y ligando, puede construirse la librería del complejo a partir del archivo PDB original. Se carga el PDB, las librerías y el archivo *.frmod* y se definen los enlaces peptídicos y el enlace entre el inhibidor y la catepsina. Con esto puede crearse la librería del complejo catepsina-inhibidor.

La última parte del proceso consiste en crear los archivos de topología y coordenadas (.prmtop e .inpcrd). El complejo se solvata utilizando un octaedro de agua con aguas tipo TIP3TBOX con un radio de 10 Å y se neutraliza con iones sodio (Na^+) para llevar la carga del complejo a 0. Una vez terminado este proceso, se crean los archivos necesarios que contienen las coordenadas y los parámetros del sistema solvado (.prmtop y .inpcrd).

CÁLCULOS DE DINÁMICA MOLECULAR

Para observar las interacciones que se producen en el sistema que se investiga en esta tesis es necesario llevar a cabo cálculos de dinámica molecular, de esta forma se puede obtener información relevante acerca de la relación entre los puentes de halógeno y el aumento de afinidad de los compuestos halogenados por la catepsina L.

Sander es parte de los programas de AMBER y es el principal programa para realizar cálculos de dinámica molecular. La simulación se llevó a cabo usando este programa en cuatro etapas, las primeras 2 son de minimización donde se busca llegar al mínimo de energía local sin calentamiento, luego una etapa de equilibrado para aumentar la

temperatura del sistema y finalmente una etapa de producción o dinámica molecular donde se generará la información del sistema.

1ª ETAPA: MINIMIZACIÓN DE CONTRAIONES Y AGUAS.

Para mantener fijos los átomos de la proteína y del ligando se utilizan restricciones posicionales en cada átomo, logrando así solo minimizar los contraiones agregados (Na^+) y las moléculas de agua presentes. Esta restricción especifica una estructura de referencia y luego restringe el movimiento de los átomos seleccionados mediante una constante de fuerza. El efecto puede aumentar o decrecer dependiendo de la magnitud de esta constante de fuerza. Se realizaron 250 pasos iniciales de “*steepest descent*” y luego 500 pasos de minimización (*conjugate gradient*) con un radio de 10 Å de *cutoff*. La constante de fuerza utilizada fue de 100 kcal/mol.

2ª ETAPA: MINIMIZACIÓN DEL SISTEMA COMPLETO.

Una vez optimizadas las aguas y los contraiones, en esta etapa se realiza una minimización libre en el sistema completo de 500 pasos.

3ª ETAPA: EQUILIBRADO.

Durante la etapa de equilibrio el sistema se calentó desde 0 a 300 K, utilizando el esquema de equilibrio de temperatura Langevin.

4ª ETAPA: DINÁMICA MOLECULAR.

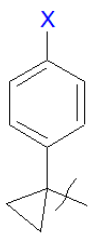
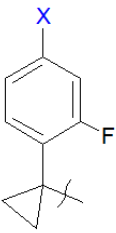
Se llevó a cabo una dinámica molecular para cada uno de los inhibidores en estudio. La dinámica se realizó por 10 ns.

3. Resultados y Discusiones

3.1. Moléculas utilizadas en este estudio

Los inhibidores en estudio, detallados en la Tabla 2, están sustituidos con un grupo metilo, flúor, cloro, bromo y yodo en el anillo bencénico de forma de poder comparar entre átomos con distintas densidades electrónicas y comparar el comportamiento de los inhibidores con o sin halógenos.

Tabla 2. Identificación de las dos series de inhibidores analizados en esta investigación A y B. Se incluyen los valores de IC_{50} en μM para cada inhibidor obtenidos utilizando ensayos basados en el cambio de la emisión generado por hidrólisis de un sustrato fluorescente.⁸

	X:	CH ₃	F	Cl	Br	I
Serie A		IA2	IA3	IA4	IA5	IA6
		$IC_{50} = 0,13$	$IC_{50} = 0,34$	$IC_{50} = 0,022$	$IC_{50} = 0,012$	$IC_{50} = 0,0065$
Serie B		IB2	IB3	IB4	IB5	IB6
		$IC_{50} = \dots$	$IC_{50} = 0,35$	$IC_{50} = 0,030$	$IC_{50} = 0,0065$	$IC_{50} = 0,0043$

La serie A corresponde al inhibidor con sustitución en la posición ipso X. La serie B corresponde a inhibidores sustituidos además con un átomo de flúor en la posición *meta*, lo que permitirá estudiar el efecto de este sustituyente en la interacción principal.

3.2. Interacciones observadas en los inhibidores.

Se llevaron a cabo cálculos de dinámica molecular de 10 ns para todos los inhibidores en estudio y se analizaron parámetros como las distancias y ángulos de enlace de manera de comprobar si los inhibidores bajo estudio poseen puentes de halógeno (dinámicas e histogramas se observan en los Anexos 1-8).

A continuación se describen los parámetros geométricos que se utilizan en la búsqueda de la formación de puentes de halógeno al observar las simulaciones de dinámica molecular de cada inhibidor.

ANGULOS DE ENLACE

De acuerdo a la literatura se espera que el ángulo para un puente por halógeno sea de 180° , considerando que ángulos en el rango de 160° a 180° son aceptables al momento de discriminar si la interacción corresponde o no a un denominado puente por halógeno. Así, el ángulo formado por el carbono del anillo aromático, el sustituyente y el O de la Gly61 debería cumplir este requisito para establecer la existencia de un puente por halógeno.

DISTANCIAS DE ENLACE

Se considera importante la distancia entre el halógeno y el oxígeno. Un parámetro útil para esta evaluación es el radio de van der Waals que indica la distancia mínima a la cual se puede acercar un átomo que no forma un enlace con otro. Si sumamos los radios de van der Waals del átomo sustituyente y del O se obtiene la distancia máxima a la que se podría identificar una interacción relevante. De esta forma, si la suma de los radios van der Waals de dos átomos es mayor que la distancia calculada entre ambos, podría deducirse que existe una interacción entre ellos.

3.2.1. Interacciones en inhibidores sustituidos con flúor (IA3-IB3)

De acuerdo a los histogramas confeccionados a partir de los cálculos de dinámica molecular, la distancia entre el oxígeno y el flúor se mantiene casi completamente por sobre la suma de los radios de van der Waals (2,82 Å) para ambos inhibidores (ver Anexos 1 y 2). La distancia de enlace promedio para estas interacciones es de 3,25 Å y 3,30 Å para IA3 e IB3 respectivamente, lo que indicaría que no hay interacción del tipo puente por halógeno en la caso del flúor, tal como se ha reportado en la literatura.¹

En cuanto a los ángulos de enlace, los inhibidores sustituidos con flúor tienen una alta dispersión de ángulos de enlace C-F-O que varía entre los 100° y 180°, como se observa en la Figura 3, alejándose considerablemente del rango de ángulos definido para puentes de halógeno que se encuentra entre los 160° y 180°. Los ángulos promedios para C-F-O son 147,7° y 151,5° para los inhibidores IA3 e IB3, respectivamente.

Entre ambos inhibidores se observan pocas diferencias en cuanto a dispersión de datos, lo que parece correlacionarse con los valores de IC_{50} , pues estos son prácticamente idénticos ($0,34 \mu\text{M}$ para IA3 y $0,35 \mu\text{M}$ para IB3).

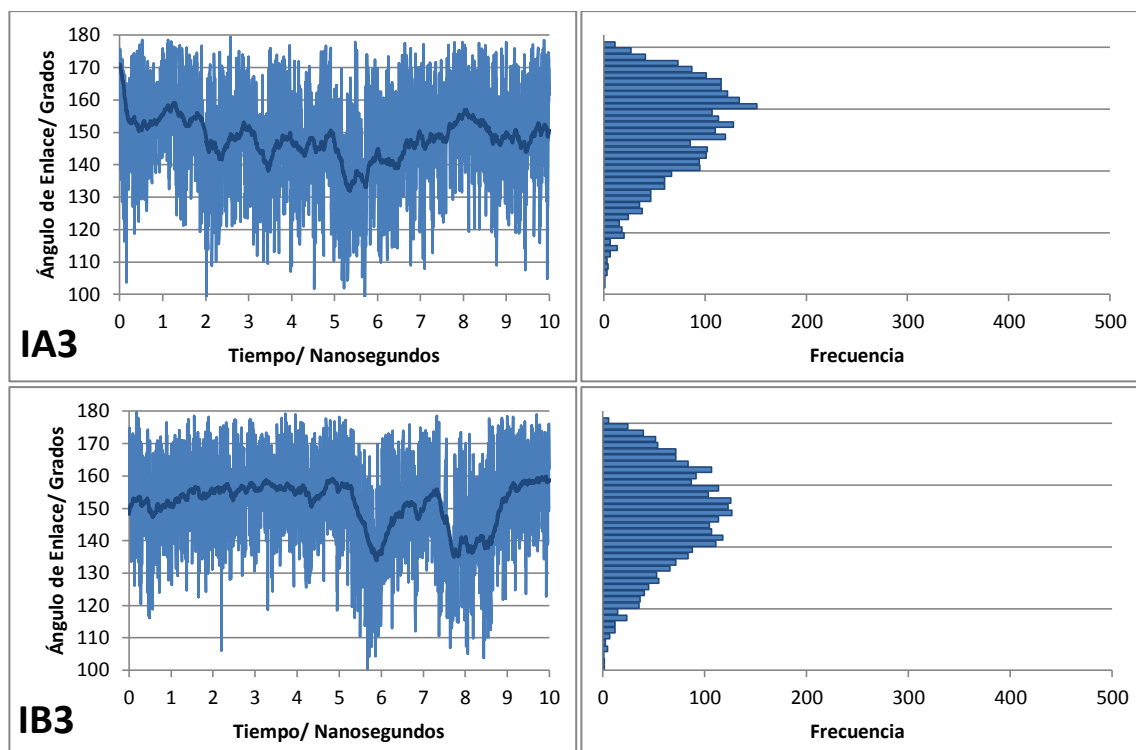


Figura 3. Dinámica molecular e histogramas para el ángulo C-F-O para los inhibidores IA3 (arriba) e IB3 (abajo). En ambos casos se observa la alta dispersión de los valores del ángulo entre los 100° y 180° .

3.2.2. Interacciones en inhibidores sustituidos con cloro, bromo o iodo.

COMPUESTOS SUSTITUIDOS CON CLORO (IA4-IB4)

Para los inhibidores sustituidos con cloro la distancia de enlace se mantiene cercana al valor de la suma de radios van der Waals (3,17 Å), lo que podría indicar la presencia de un puente de halógeno relativamente débil (ver Anexos 1 y 2). Las distancias promedio de enlace para los inhibidores IA4 e IB4 son 3,28 Å y 3,48 Å respectivamente, promedios levemente mayores que la suma de los radios van der Waals.

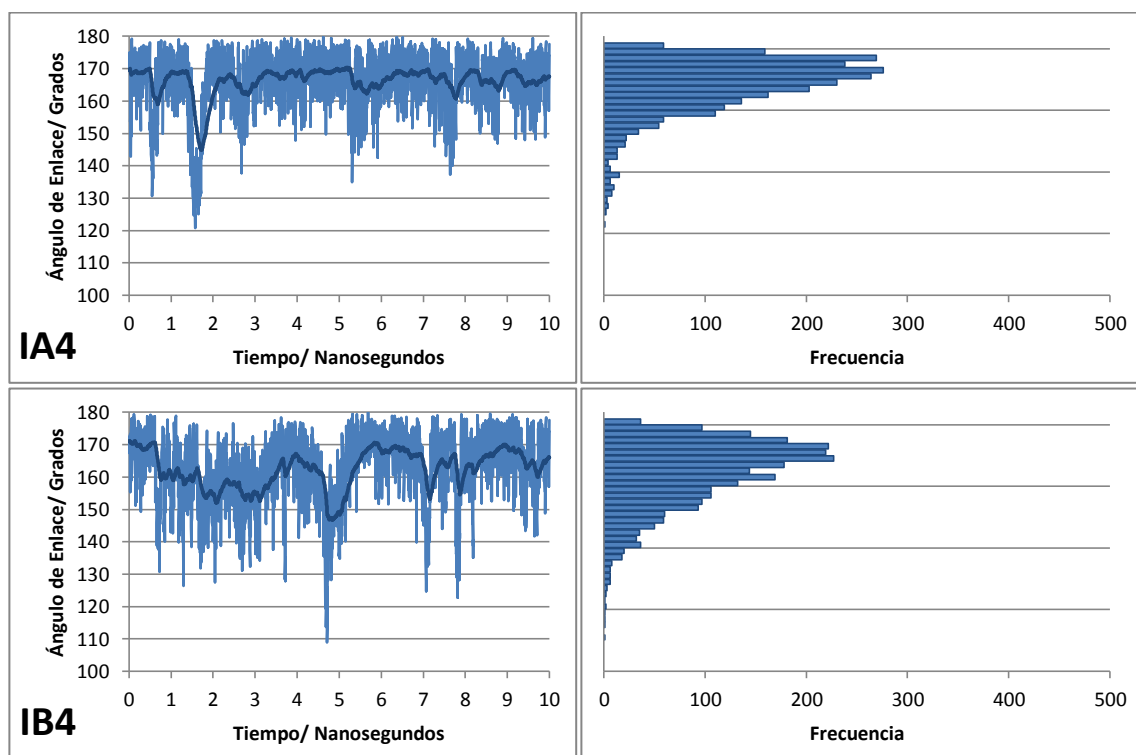


Figura 4. Dinámica molecular e histogramas para el ángulo C-Cl-O para los inhibidores IA4 (arriba) e IB4 (abajo). Los resultados muestran una menor dispersión que para los inhibidores con F (IA3-IB3, Figura 2) y se observa que la mayoría de los valores se encuentran en el rango 140° a 180°. Además se observa una mayor dispersión para IB4 comparada con IA4, lo que indicaría que la inclusión de flúor en la posición meta desfavorece la interacción.

Los ángulos promedio calculados para estos inhibidores son $166,3^\circ$ para IA4 y $162,2^\circ$ para IB4. Como se observa en la Figura 4, los ángulos se encuentran en su mayoría en el rango de 140° a 180° , pero con una alta dispersión y los valores promedio de ángulo de enlace es bajo.

De estos resultados se puede desprender que la sustitución de flúor en la posición *meta* desfavorece la débil interacción existente entre el átomo de cloro y oxígeno de la Gly61, y como se observa en los histogramas de la Figura 3 hay una mayor dispersión de datos en el caso de IB4 comparado con IA4.

COMPUESTOS SUSTITUIDOS CON BROMO (IA5-IB5)

En el caso de los inhibidores sustituidos con bromo se observa que las distancias de enlace tienden a mantenerse en valores por debajo de la suma de los radios de van der Waals ($3,29 \text{ \AA}$), donde los promedios de distancia de enlace ($3,14 \text{ \AA}$ para IA5 y $3,19 \text{ \AA}$ para IB5), también son menores que la suma de los radios de van der Waals (ver Anexos 1 y 2).

Como se observa en la Figura 5, los ángulos de enlace formados por estos inhibidores se mantienen en su mayoría por sobre los 160° y sus promedios calculados son $170,6^\circ$ para IA5 y $170,2^\circ$ para IB5. Los valores promedios de ángulo están sobre los 170° , lo que indicaría una interacción tipo puente de halógeno. Por otra parte la diferencia entre IA5 e IB5 es menor que la observada en los compuestos sustituidos con cloro, aunque permanece una interacción levemente mejor del inhibidor sin sustitución con flúor.

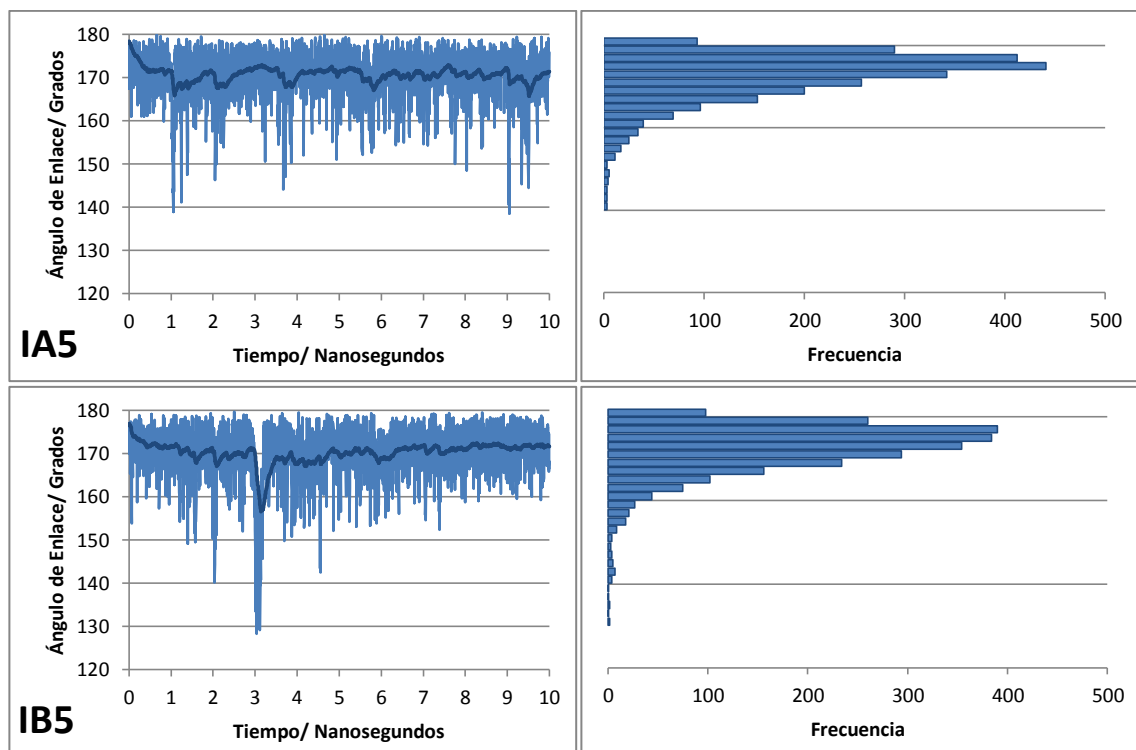


Figura 5. Dinámica molecular e histogramas para el ángulo C-Br-O de los inhibidores IA5 (arriba) e IB5 (abajo). La mayoría de los resultados se encuentra por sobre los 160° y se observa una mayor similitud entre los inhibidores de ambas series.

COMPUESTOS SUSTITUIDOS CON IODO (IA6-IB6)

Para los inhibidores sustituidos con Iodo se observa una interacción mucho más fuerte que para los inhibidores con otros sustituyentes considerando que casi todos los resultados de distancia de enlace son menores que la suma de los radios de van der Waals (3,46 Å). Las distancias promedio de enlace son 3,37 Å y 3,14 Å para IA6 e IB6 respectivamente (ver Anexos 1 y 2). En este caso se observa que la interacción mejora con la inclusión del átomo de flúor en la posición meta (IB6), a diferencia de los casos anteriores donde la interacción se ve favorecida en los inhibidores sin esta sustitución.

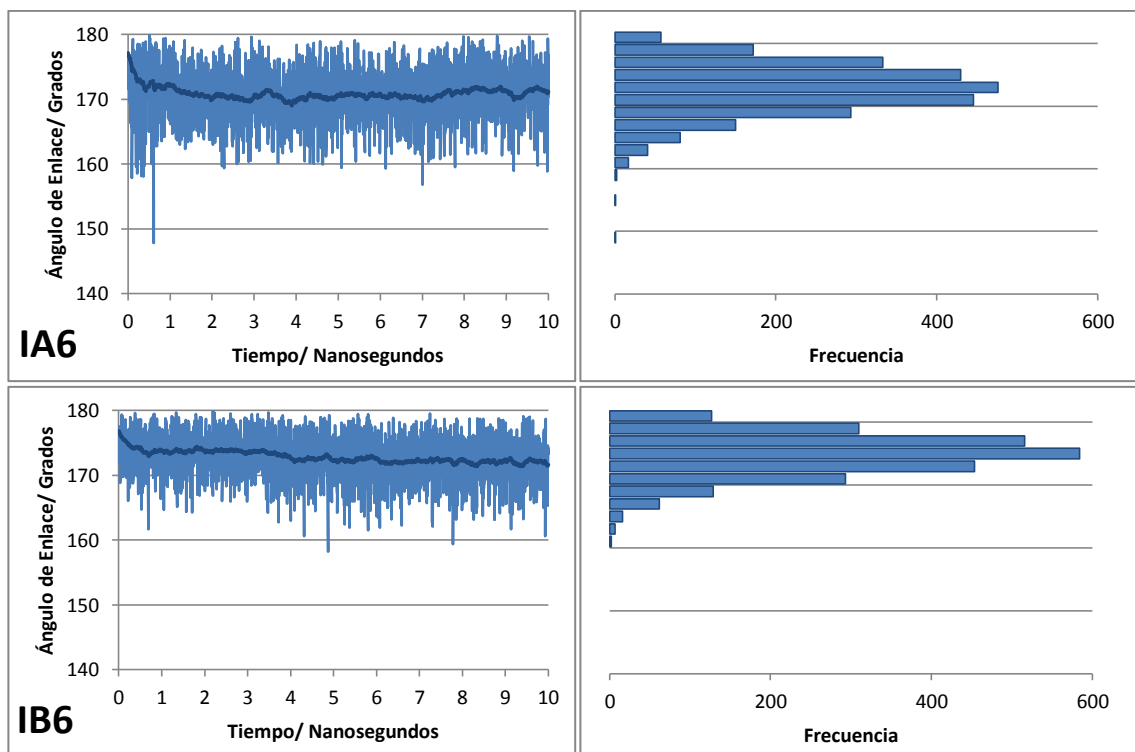


Figura 6. Dinámica molecular e histogramas para el ángulo C-I-O en los inhibidores IA6 (arriba) e IB6 (abajo). Casi todos los resultados se encuentran por sobre los 160° , y los ángulos promedio de estos inhibidores son $170,8^\circ$ y $172,8^\circ$ respectivamente.

Estas mismas características se observa en los ángulos del enlace en la Figura 6, pues los valores de ángulo de enlace se mantienen casi exclusivamente por sobre los 160° . Los promedios son $170,8^\circ$ para IA6 y $172,8^\circ$ para IB6, lo que indica una mejor interacción del tipo puente por halógeno comparada con los inhibidores sustituidos con F, Cl o Br. Se observa una interacción mejorada por la sustitución con flúor en la posición meta de forma más acentuada que en el caso de los inhibidores IA5/IB5.

Comparando estos resultados con los inhibidores revisados anteriormente se puede predecir que los inhibidores con Iodo tendrán mejores capacidades inhibitorias que sus homólogos sustituidos con F, Cl, o Br, pues los valores observados indican interacciones más fuertes.

3.2.3. Interacciones en inhibidores sustituidos con metilo (IA2, IB2)

Es interesante estudiar la sustitución con metilo, puesto que es un grupo funcional cuyo tamaño es muy similar al del átomo de cloro. Esto permite comparar ambos conjuntos de resultados y determinar que las interacciones existentes entre el ligando y la proteína no se deben al tamaño de la cavidad en la catepsina L o al tamaño específico del átomo interactuante del ligando, sino que a una interacción específica debido a la anisotropía de la densidad de carga sobre los átomos de halógeno actuando como ácidos de Lewis.

Como antecedente se conoce que el valor de IC_{50} del inhibidor IA2 es bastante alto en comparación al de su análogo sustituido con cloro ($0,13 \mu\text{M}$ para IA2 comparado con $0,022 \mu\text{M}$ de IA4), por lo que se espera que los resultados obtenidos de la dinámica molecular indiquen una nula interacción entre el grupo metilo y el oxígeno del residuo Gly61.

Las dinámicas de los ligandos sustituidos con metilo, tanto con o sin sustitución de flúor en la posición meta, demuestran una mayor dispersión de datos comparadas con las dinámicas de ligandos sustituidos con cloro. Las distancias de enlace son en promedio

fluctúan entre 3,49 y 3,47 Å para los inhibidores IA2 e IB2, respectivamente, siendo la suma de los radios van der Waals 2,95 Å (ver Anexos 1 y 2).

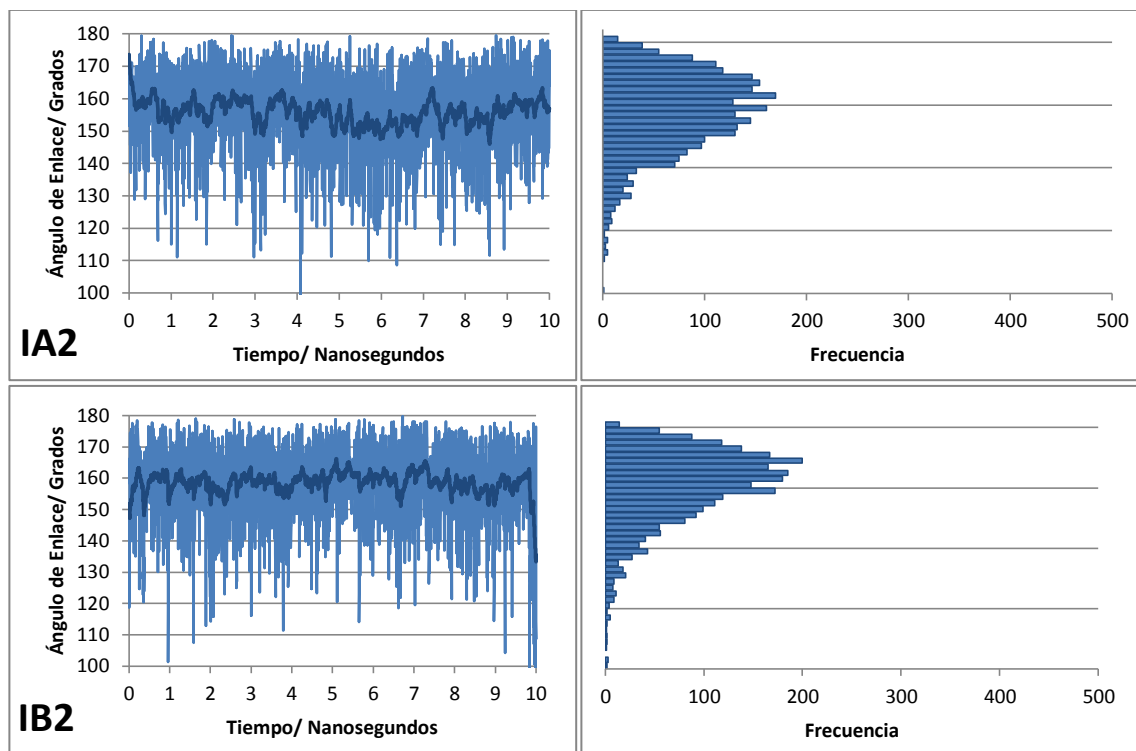


Figura 7. Dinámica molecular e histogramas para el ángulo C-C-O para los inhibidores IA2 (arriba) e IB2 (abajo). Los valores de los ángulos de enlace varían entre 100° y 180° y se observa que la dispersión de los resultados es alta.

En la Figura 7 se grafican las dinámicas e histogramas del ángulo C-C-O de IA2 e IB2. Los ángulos promedio de enlace son 155,7° y 146,9°, respectivamente. Ambos resultados reflejan que no hay una interacción específica entre el grupo metilo y la proteína en estudio, confirmando que una interacción relevante sólo se presenta con los halógenos de mayor densidad electrónica (Cl, Br, I).

Por otra parte se podría esperar que el valor de IC_{50} para el inhibidor IB2 (no determinado) fuera similar al valor obtenido para el inhibidor IA2 ($0,13 \mu\text{M}$) considerando los valores de los parámetros observados.

3.2.4. Efecto de la sustitución con flúor en la posición meta

Como se mencionó en puntos anteriores, la introducción de un átomo de flúor en la posición *meta* tiene diversos efectos en los inhibidores en estudio. En la Figura 8 se grafican los ángulos promedios de enlace y las distancias promedios normalizadas para cada inhibidor sustituido con F, Cl, Br o I.

NORMALIZACION DE VALORES PARA DETERMINAR DISTANCIAS.

Para poder hacer una comparación correcta entre las distancias de enlace se necesita normalizar los valores entre las moléculas estudiadas, ya que a medida que disminuye la densidad electrónica del sustituyente es necesaria una menor distancia de enlace en comparación con la que necesita un átomo de alta densidad electrónica como el yodo. De esta forma, una distancia que implica una interacción fuerte para un átomo como yodo puede significar una nula interacción para otro de menor o nulo agujero σ como el flúor.

Un parámetro que sirve para normalizar los resultados y hacerlos comparables entre si es el radio de van der Waals. Se divide cada valor de distancia por el valor de la suma de radios de van der Waals de los átomos involucrados. Así, el límite de interacción sería 1. Cuando el factor obtenido es mayor que 1 esto implica que hay una débil o

nula interacción, puesto que la distancia calculada es mayor que el radio de van der Waals. Si por el contrario este valor es menor que 1 esto indica que hay una interacción considerable entre los átomos involucrados.

En la Figura 8 se observa que para los inhibidores con flúor en la posición cercana al oxígeno carbonílico de la Gly61 los valores promedio de distancia normalizada están cercanos entre sí y por sobre el valor definido como límite para la interacción. También los ángulos promedio son bastante cercanos rodeando ambos los 150°.

Para los inhibidores sustituidos con cloro o bromo, la serie B presenta mayores valores de distancia que los de la serie A. Por el contrario, para los inhibidores con yodo el valor de distancia es menor para el inhibidor con flúor en la posición meta (IB6), lo que indica que el puente de halógeno es más fuerte. Al igual que con las distancias de enlace, se observa en la Figura 8b una mejor interacción para los inhibidores sin sustitución adicional por flúor excepto en el caso de los inhibidores con yodo, donde el ángulo es mayor para el inhibidor IB6.

La sustitución adicional por un átomo de flúor en posición *meta* debilitaría la interacción por puente de halógeno con Cl, la reforzaría con I y no tendría un efecto apreciable con Br. De forma general se observa en la Figura 8 que la fuerza de la interacción basada en los cálculos de distancias y ángulos de enlace sigue el orden $Cl < Br < I$, lo que tiene relación con lo conocido acerca de los puentes de halógeno que aumentan su fuerza al aumentar el tamaño del agujero σ .

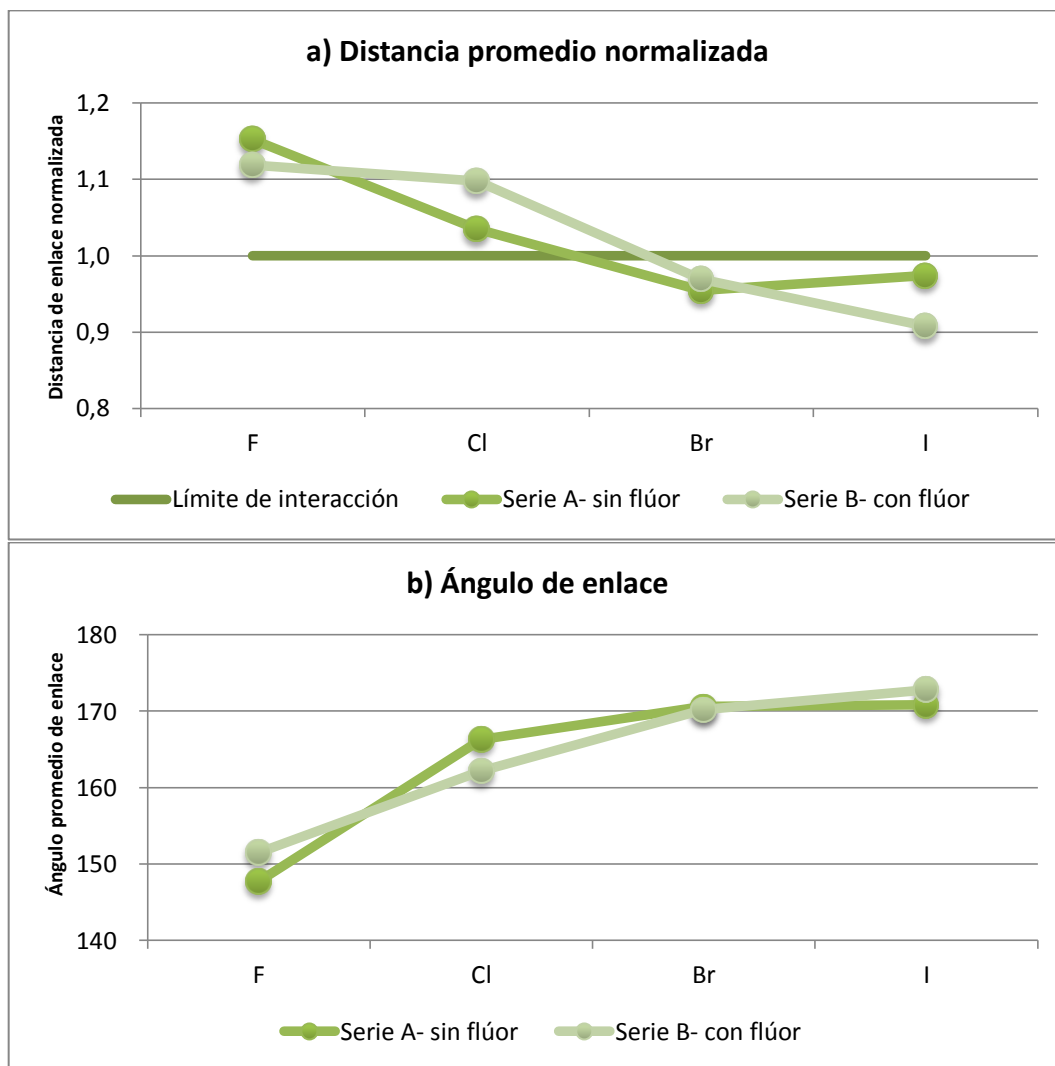


Figura 8. Efecto de la sustitución con flúor en la posición *meta*. a) Distancia de enlace promedio normalizada por la suma de radios de van der Waals. El límite de interacción en verde oscuro es un buen parámetro para determinar interacciones del tipo del puente de halógeno. b) Ángulo promedio de enlace en inhibidores con y sin sustitución de flúor en *meta*. Un ángulo más cercano a 180° correspondería a una mejor interacción.

MAPAS DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

Para observar el efecto del flúor como sustituyente desde el punto de vista de la distribución electrónica, se obtuvieron mapas de potencial electroestático para algunos de los inhibidores.

En la Figura 9 se encuentran los mapas de potencial electrostático para los inhibidores sustituidos con Cl, Br o I de la serie A y B. Se aprecia que todas las sustituciones de flúor en la posición *meta* generan un aumento del agujero σ , lo que debería traducirse en puentes de halógeno más fuertes por lo tanto en mayores afinidades del ligando por la catepsina L.

Estos mapas se contraponen con los resultados graficados en la Figura 8, donde se observa que la sustitución de flúor en el inhibidor con cloro disminuye la interacción del puente por halógeno considerablemente (inhibidores IA4/IB4).

Este comportamiento distinto a lo proyectado por los mapas de potencial electrostático podría deberse a la existencia de otras interacciones dentro del sistema biológico, ya que respaldado por los valores de IC_{50} se conoce que el inhibidor IB4 sustituido con flúor en la posición *meta* efectivamente tiene un valor de afinidad menor que su análogo sin sustitución (0,022 μ M para IA4 y 0,03 μ M para IB4).

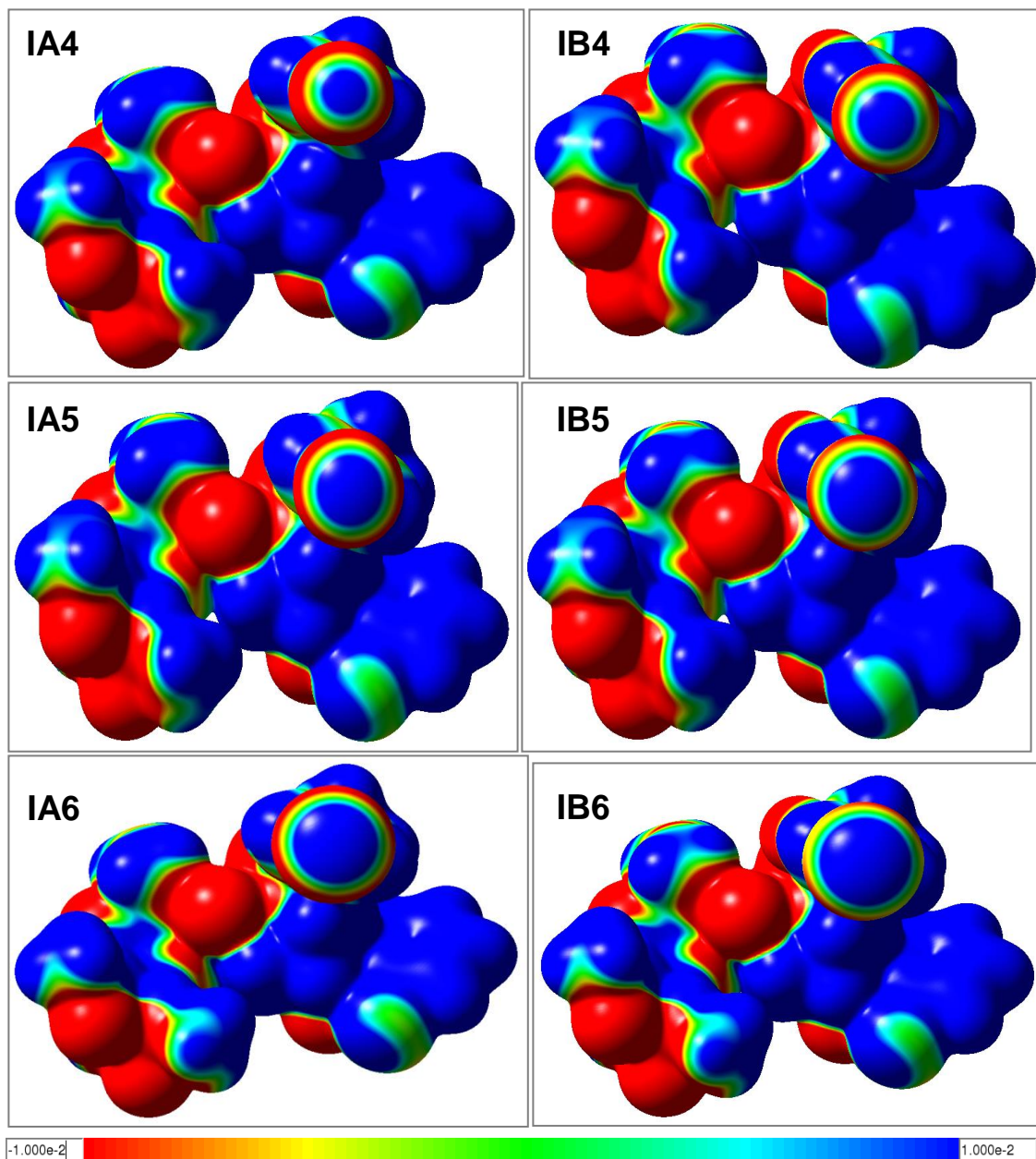


Figura 9. Mapas de potencial electrostático para los inhibidores sustituidos con Cl, Br o I, series A y B. El color rojo corresponde a regiones con alta población de electrones, mientras que las regiones azules corresponden a regiones más electropositivas.

3.2.5. Puente por halógeno secundario

De forma similar a los análisis anteriores, se estudió un posible puente de halógeno secundario entre el átomo de cloro en el anillo bencénico inferior del inhibidor y un átomo de S de la cadena lateral del residuo Met70 de la catepsina L (ver Figura 1). Los parámetros para discriminar la existencia o no de este puente de halógeno fueron los mismos utilizados anteriormente, a saber, un ángulo de enlace cercano a los 180° y una distancia entre átomos menor que la suma de los radios de van der Waals del halógeno y, en este caso, del azufre.

En la Figura 10 se observa que los ángulos promedio se mantienen entre 140° y 160° , esto podría ser un indicio que no existe un puente de halógeno, pues se encuentra por debajo de los valores esperados.

La suma de los radios de van der Waals del cloro y el azufre es $3,55 \text{ \AA}$, por lo que para poder determinar la existencia de una interacción relevante, la distancia calculada debería ser menor que este valor. Los promedios de distancia de enlace están, casi en su totalidad, por sobre la suma de los radios de van der Waals ($3,55 \text{ \AA}$) y se observa una tendencia similar en ambas series A y B.

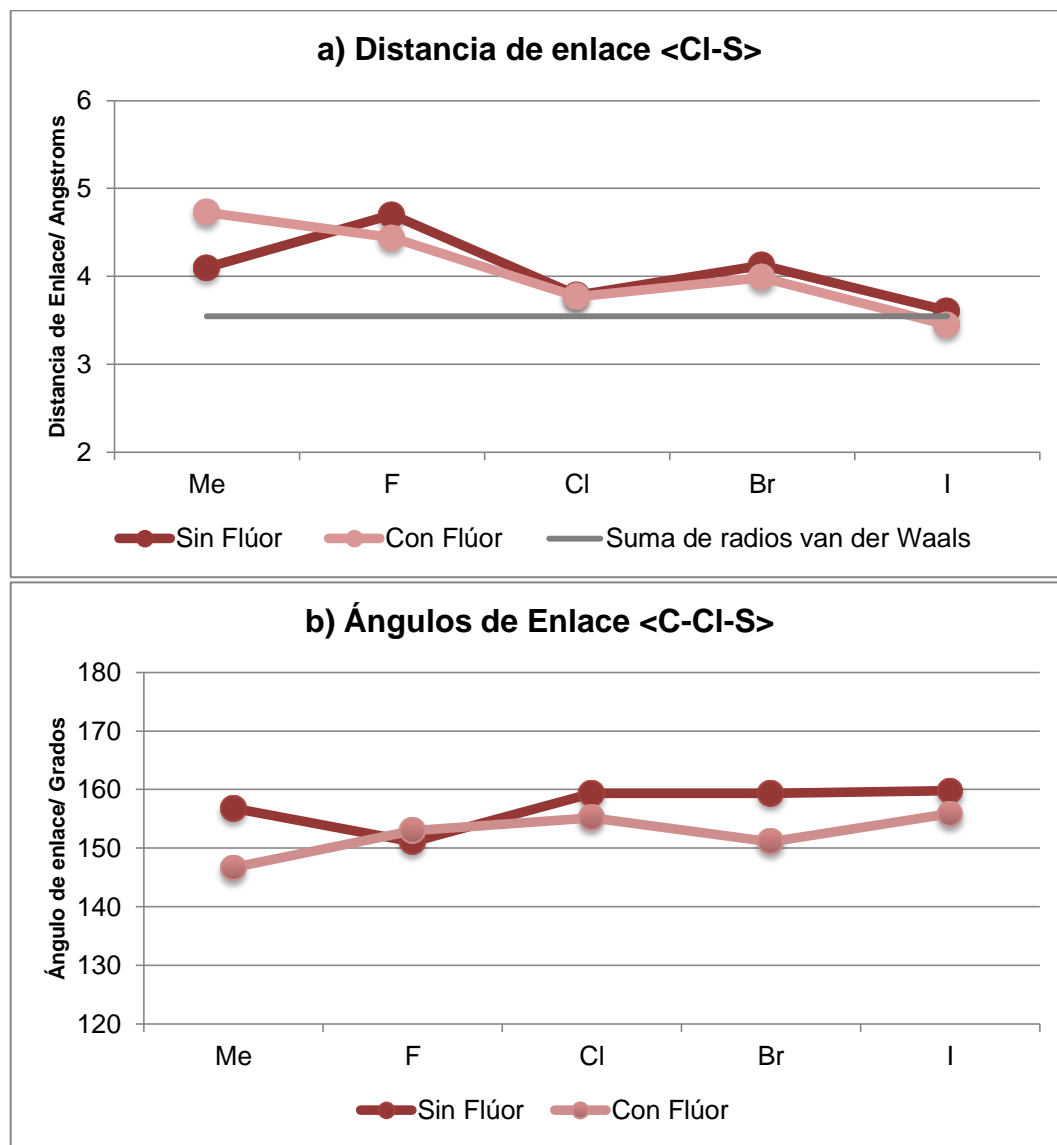


Figura 10. Puente por halógeno secundario. a) Distancias de enlace Cl—S. Casi la totalidad de las distancias promedio de enlace se mantienen por sobre la suma de radios van der Waals b) Ángulos de enlace C—Cl—S. Se encuentran en el rango de 140° a 160° lo que descarta la existencia de una interacción del tipo puente por halógeno.

Se observa que la menor distancia para el puente por halógeno secundario se encuentra en los inhibidores IA6 e IB6 (Figura 10a), inhibidores en los que se observa una mayor distancia de enlace para el puente por halógeno principal. Es posible que la cercanía entre los átomo de Cl y S en este caso se deba al mayor volumen atómico del átomo de Iodo en el puente por halógeno principal y que esta distancia menor que la suma de radios van der Waals no implique una interacción del tipo puente por halógeno en este caso.

3.3. Comparación de resultados con datos experimentales.

3.3.1. Comparación con valores de IC₅₀

Ya se han comparado los valores obtenidos por los cálculos de dinámica molecular con las sumas de los radios de van der Waals para el caso de las distancias de enlace y con el valor ideal de ángulo de enlace (180°) para los posibles puentes por halógeno. Para comprobar que la metodología propuesta en esta investigación da cuenta de las interacciones existentes en estos sistemas, se tomaron los datos experimentales de IC₅₀ publicados por Hardegger y col.⁸ que permiten comparar estos resultados teóricos con valores reales publicados en la literatura.

En la Tabla 3 se detallan los valores de IC_{50} obtenidos mediante ensayos de fluorescencia por los autores citados para los inhibidores investigados en esta tesis,⁸ junto con los resultados teóricos obtenidos de los cálculos de dinámica molecular para las distancias y ángulos promedio de enlace entre los sustituyentes del inhibidor y el oxígeno de la Gly61.

Tabla 3. Valores de IC_{50} obtenidos de la literatura⁸ y valores de distancia y ángulos promedio de enlace obtenidos con dinámica molecular para los inhibidores en estudio.

Inhibidor	$IC_{50}/ \mu M$	Distancia de Enlace Promedio / Å	Suma de Radios van der Waals/ Å ¹⁶	Ángulo de Enlace Promedio/ °
IA2 <Me – O>	0,13	3,49	2,95	155,7
IA3 <F – O>	0,34	3,25	2,82	147,7
IA4 <Cl – O>	0,022	3,28	3,17	166,3
IA5 <Br – O>	0,012	3,14	3,29	170,6
IA6 <I – O>	0,0065	3,55	3,46	161,8
IA2 <Me – O>	-	3,47	2,95	146,9
IB3 <F – O>	0,35	3,3	2,82	151,5
IB4 <Cl – O>	0,03	3,49	3,17	162,1
IB5 <Br – O>	0,0065	3,19	3,29	170,2
IB6 <I – O>	0,0043	3,14	3,46	172,8

En la Figura 11 se observa la correlación entre los valores de $\log(IC_{50})$ y los parámetros relevantes calculados en este trabajo, como la distancia sustituyente-oxígeno y el ángulo que forma el potencial puente por halógeno. Se observa en el gráfico de la Figura 11a que hay una correlación relativamente lineal entre los valores de $\log(IC_{50})$ y la distancia normalizada de enlace, de forma que a mayor distancia de enlace, mayores son los valores de IC_{50} lo que se traduciría en menor afinidad de los ligandos. Los valores estadísticos de R^2 para las regresiones lineales calculadas se observan en la Figura 11.

Por otra parte el gráfico de la Figura 11b muestra que a menores valores de $\log(IC_{50})$, el ángulo C-X-O se acerca a valores mayores, superando los 170° para los inhibidores con mejores afinidades con la catepsina L. De esta forma se demuestra que el parámetro del ángulo de enlace promedio representa la mejoría de afinidad cuantificada por el valor de IC_{50} .

Con los resultados representados en la Figura 11 se vuelve a confirmar el aumento de afinidad de los inhibidores sustituidos con halógenos de mayor agujero σ por sobre los sustituidos con metilo o flúor.

Los resultados calculados mediante la metodología desarrollada en esta tesis logran representar en gran medida la función inhibitoria mejorada por la inclusión de halógenos como cloro, bromo o iodo.

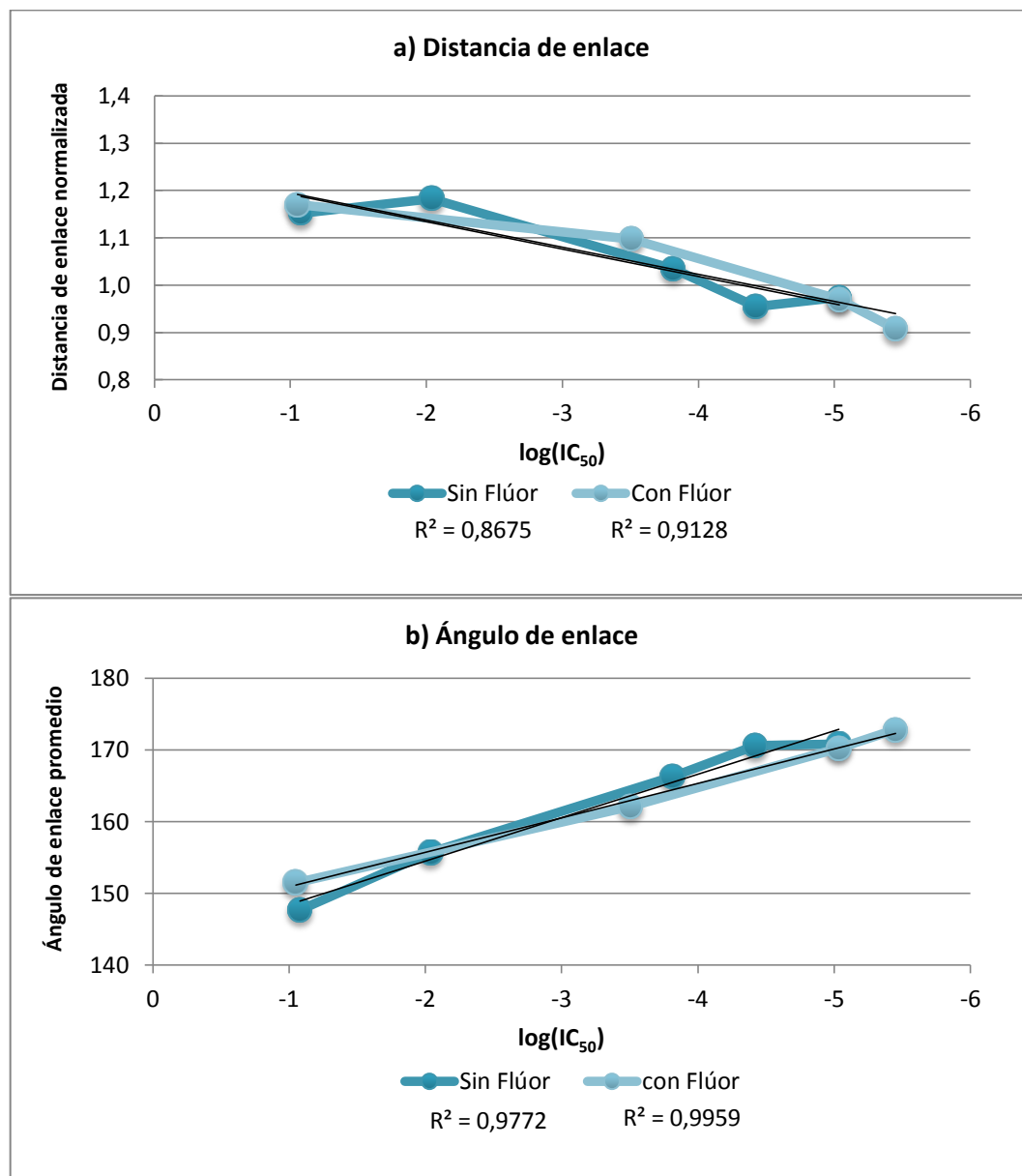


Figura 11. Correlación de parámetros de dinámica molecular con valores de $\log(\text{IC}_{50})$. a) Distancias de enlace promedio normalizadas por la suma de los radios de van der Waals. b) Ángulo de enlace promedio. Se observa en ambos casos que el poder inhibitorio de los ligandos, representado por el valor de $\log(\text{IC}_{50})$, se correlaciona linealmente con los parámetros en estudio.

3.3.2. Comparación con datos cristalográficos

Dispusimos de valores experimentales de IC_{50} para la mayoría de los inhibidores en estudio, lo que nos permitió correlacionar los cálculos realizados con estos datos, y así enlazar el efecto de la distancia y ángulo de enlace sobre el aumento de la afinidad por la catepsina L de los inhibidores halogenados. No obstante puede ser que la afinidad de estos compuestos no sólo se relacione con los posibles puentes por halógeno, por lo que también realizamos una comparación de los parámetros considerados relevantes entre los cálculos realizados y las estructuras cristalinas disponibles de la catepsina L con inhibidores de este tipo. Las estructuras cristalinas son las de la serie A (Códigos PDB: 2XU4, 1XU2, 2YJ2, 2YJ8).

En la Figura 12 se observan comparativamente los valores calculados mediante la metodología propuesta en esta tesis y los valores obtenidos de estructuras cristalinas. Se representan las distancias y ángulos de enlace calculados para los inhibidores IA3, IA4, IA5 e IA6 en verde oscuro, y las distancia y ángulos obtenidos de las estructuras cristalinas de la catepsina L con los mismos inhibidores en verde claro.

DISTANCIAS CRISTALOGRAFICAS

En general se observa que los datos obtenidos con la metodología propuesta en esta tesis son muy cercanos a los valores extraídos de las estructuras cristalinas. Para las distancias de enlace la similitud de los valores es importante exceptuando el caso del ligando IA3, donde la diferencia entre el promedio de distancia de enlace calculado y el cristalográfico es de 1,22 Å. Esta diferencia particular puede deberse a la distancia de

inicio de la dinámica pues todos tienen la misma distancia X-O inicial, y probablemente podría superarse con más tiempo cálculo computacional.

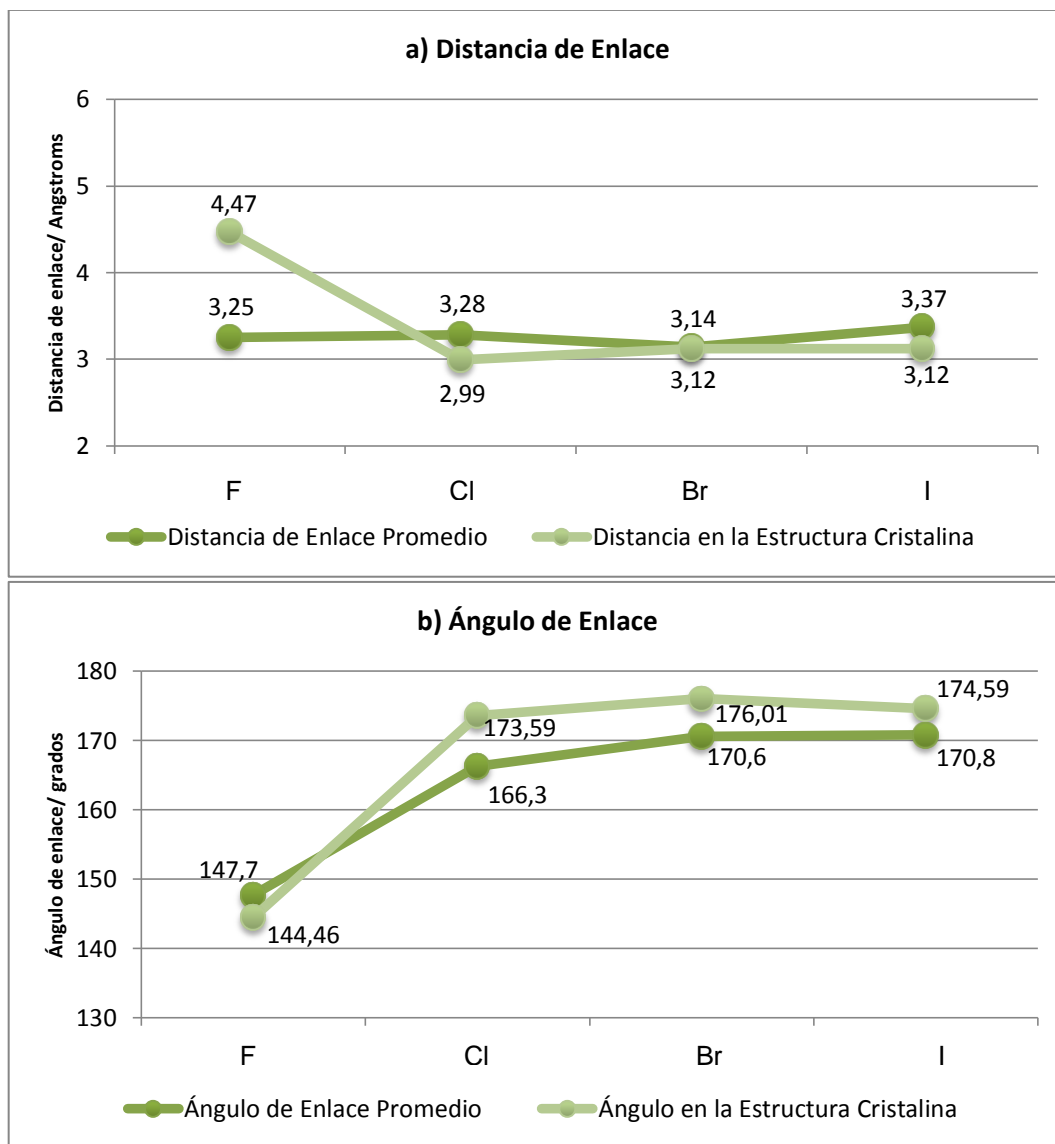


Figura 12. Comparación de distancias de enlace y ángulos de enlace obtenidos por cálculos de dinámica molecular y valores experimentales obtenidos de estructuras cristalinas.

El resto de las distancias de enlace calculadas se acerca mucho a los valores cristalográficos, y las diferencias van desde 0,02 Å para el inhibidor IB5, hasta 0,29 Å para el ligando IA4.

ANGULOS CRISTALOGRAFICOS

En el caso de los ángulos de enlace se observa una cercanía mucho mayor de los valores, donde se demuestra la misma tendencia de los átomos de mayor densidad electrónica a formar ángulos más cercanos a 180°. La diferencia promedio entre los datos calculados por dinámica molecular y los datos cristalográficos es de 4,9°, lo que implica que la metodología aplicada representa de buena manera las estructuras cristalinas disponibles.

También es posible comparar los valores calculados por dinámica molecular con los valores extraídos de las estructuras cristalinas disponibles para el puente por halógeno secundario. Los datos se observan en la Figura 13.

En el caso del puente por halógeno secundario se observa una tendencia similar a lo observado en la Figura 12, ya que los valores calculados mediante dinámica molecular y los datos cristalográficos obtenidos de la literatura son similares.

Las distancias de enlace Cl—S para el puente por halógeno secundario en los inhibidores con Cl, Br o I tienen diferencias de entre 0,08 y 0,3 Å. El inhibidor con flúor, al igual que en el caso anterior presenta una diferencia mayor que el resto de los inhibidores de 1,01 Å.

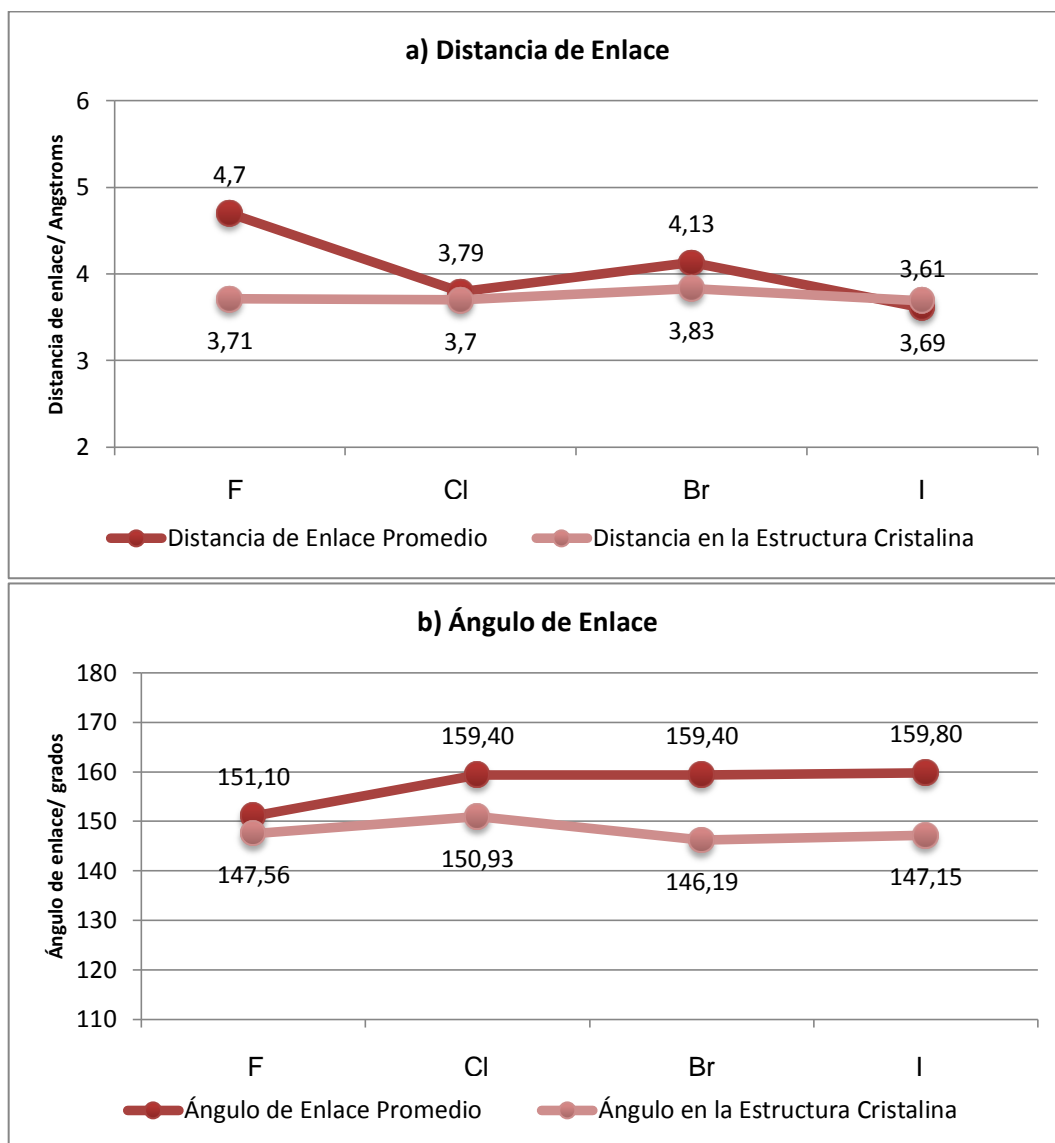


Figura 13. Comparación de distancias de enlace y ángulos de enlace obtenidos mediante cálculos de dinámica molecular versus los valores experimentales obtenidos de estructuras cristalinas para el puente por halógeno secundario.

Los ángulos de enlace C—Cl—S se mantienen cercanos con diferencias entre $3,54^\circ$ para el inhibidor IA3 y $13,21^\circ$ para el inhibidor IA5. El promedio de la diferencia entre valores calculados y datos cristalográficos es de $9,5^\circ$ para el puente por halógeno secundario.

4. Conclusiones

La metodología desarrollada en esta tesis simula adecuadamente los puentes por halógeno observados experimentalmente en dos series de inhibidores de catepsina L, reproduciendo el orden de fuerza de estos enlaces $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$ e indicando la inexistencia de esta interacción para el flúor y para el grupo metilo.

Mediante esta metodología propuesta se ha dado cuenta de la potencia de los diversos inhibidores concordando con los valores publicados de afinidad de los ligandos por la catepsina L, representado en los valores de IC_{50} .

Los resultados de esta simulación reflejan con una buena aproximación las distancias interatómicas y los ángulos involucrados en los puentes de halógeno que se observan en estructuras cristalinas.

El desarrollo de este trabajo permite comprobar que la representación del agujero σ mediante un punto extra de carga o Bq es efectiva y permite acercarnos a una mejor comprensión de los puentes por halógeno.

El desarrollo de esta metodología permite estudiar ligandos halogenados desde un punto de vista nuevo, donde la comprensión de los puentes por halógeno aporta significativamente al entendimiento de las interacciones que afectan positiva o negativamente la actividad biológica.

Se puede esperar, por lo tanto, que la aplicación de esta metodología permita predecir la existencia o no de puentes por halógeno en moléculas halogenadas que interactúan con blancos biológicos, lo que se extendería a la predicción de mayores afinidades y por lo tanto mayores potencias como inhibidores o antagonistas.

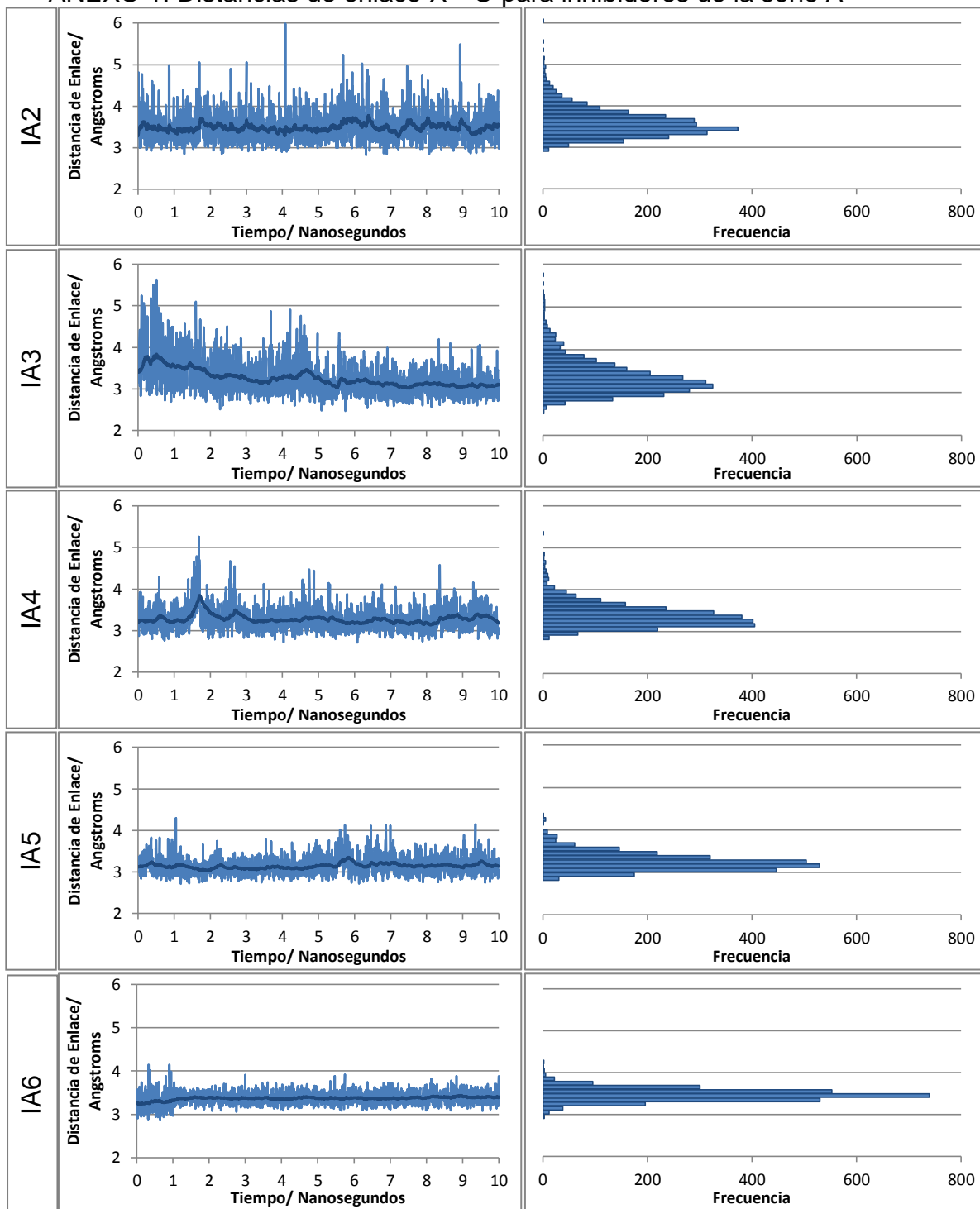
5. Bibliografía

- ^{1.} P. Politzer, P. Lane, M.C. Concha, Y. Ma, J.S. Murray, *J Mol. Model.* 2007, 13, 305-311.
- ^{2.} P. Metrangolo, H. Neukirch, T. Pilati, P. Politzer, G. Resnati, *Acc. Chem. Res.* 2005, 38, 386-395.
- ^{3.} T. Clark, M. Hennemann, J. Murray, P. Politzer, *J. Mol. Model.* 2007, 13, 291-296.
- ^{4.} P. Politzer, J. S. Murray, M. C. Concha, *J. Mol. Model.* 2007, 13, 643-650.
- ^{5.} Halogen Bonding: Fundamentals and Applications; P. Metrangolo, G. Resnati, Springer, Berlin, 2008.
- ^{6.} N. Valadares, L. Salum, I. Polikarpov, A. Andricopulo, R. Garratt, *J. Chem. Inf. Model.* 2009, 49, 2606-2616.
- ^{7.} R. Wasik, M. Lebska, K. Felczak, J. Poznanski, D. Shugar, *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 10601-10611.
- ^{8.} L. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, J. Plancher, G. Hartmann, D.W. Banner, W. Haap, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 314-318.
- ^{9.} S. Rendine, S. Pieraccini, A. Forni, M. Sironi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13, 19508-19516.
- ^{10.} Mahmoud A. A. I., *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 2564-2574.
- ^{11.} Z. Xu, Z. Liu, T. Chen, T. Chen, Z. Wang, G. Tian, J. Shi, X. Wang, Y. Lu, X. Yan, G. Wang, H. Jiang, K. Chen, S. Wang, Y. Xu, J. Shen, W. Zhu, *J. Med. Chem.* 2011, 54, 5607-5611.
- ^{12.} Y. Yasuda, Z. Li, D. Greenbaum, M. Bogoy, E. Weber, D. Brömme, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 36761-36770.
- ^{13.} D. H. Ebert, S. Kopecky-Bromberg, T. Dermody, *J. Biol. Chem.* 2004 279, 3837-3851.
- ^{14.} S. Chauhan, N. Popescus, D. Ray, R. Fleischmann, M. Gottesman, B. Troenn, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 1039-1045.

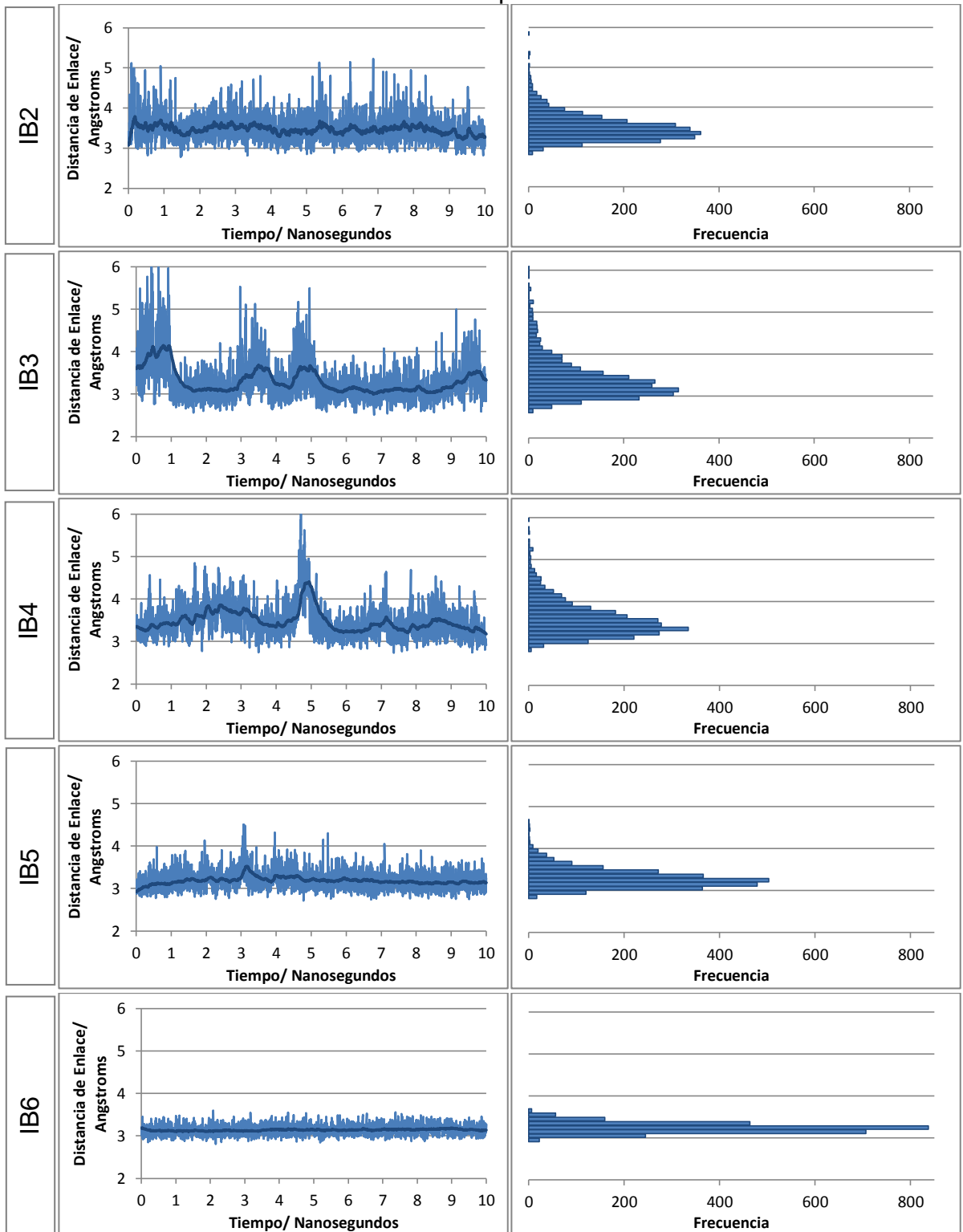
15. R. Alvarez Sanchez, D. Banner, S. M. Ceccarelli, U. Grether, W. Haap, P. Hartman, G. Hartmann, H. Hilpert, H. Kuehne, H. Mauser, J.-M. Plancher (F. Hoffmann-La Roche AG), US 20100267722 (A1), 2010.
16. A. Bondi, *J. Phys. Chem.*, 1964, 68, 441-451.
17. Basis Set Exchange. Schuchardt, K.L., Didier, B.T., Elsethagen, T., Sun, L., Gurumoorthi, V., Chase, J., Li, J., Windus, T.L. *J. Chem. Inf. Model.* 2007, 47, 1045-1052.
18. R. Li, Z. Li, D. Wu, Y. Li, W. Chen, C. C. Sun, *J. Phys. Chem. A.* 2005, 109, 2608-2613.
19. N. F. Valadares, L. B. Salum, I. Polikarpov, A. D. Andricopulo, R. C. Garratt, *J. Chem. Inf. Model.* 2009, 49, 2606–2616.
20. Lu Y., Hualiang Jiang, and Weiliang Zhu, *J. Med. Chem.* 2009, 52, 2854–2862.
21. Gaussian09. 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, P. Salvador, J. J. Dannenberg, 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, 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.
22. Gauss View, R. Dennington, T. Keith, J. Millam,
23. Amber 12, D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B.P. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko and P.A. Kollman.

6. Anexos

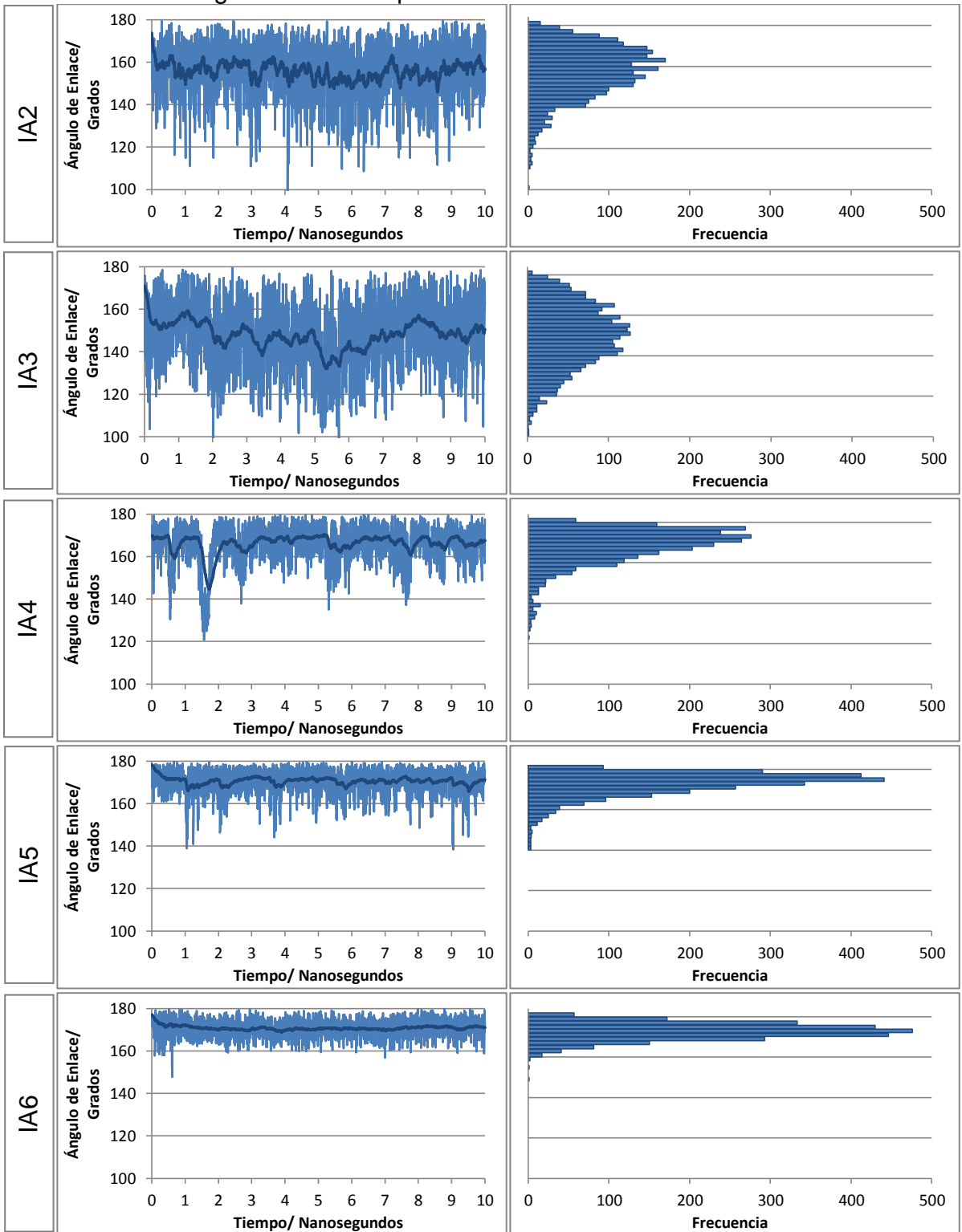
ANEXO 1. Distancias de enlace X—O para inhibidores de la serie A



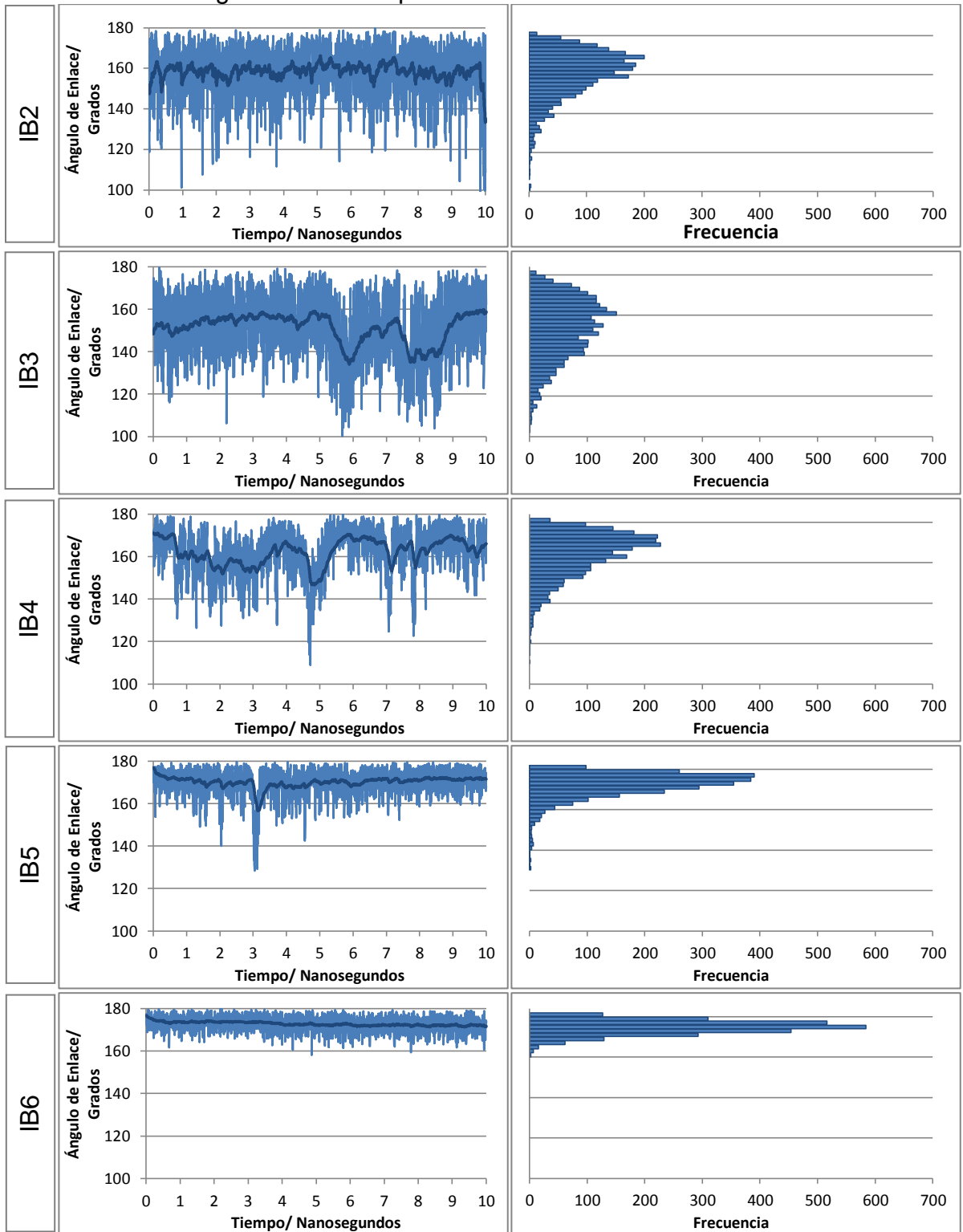
ANEXO 2. Distancias de enlace X—O para inhibidores de la serie B



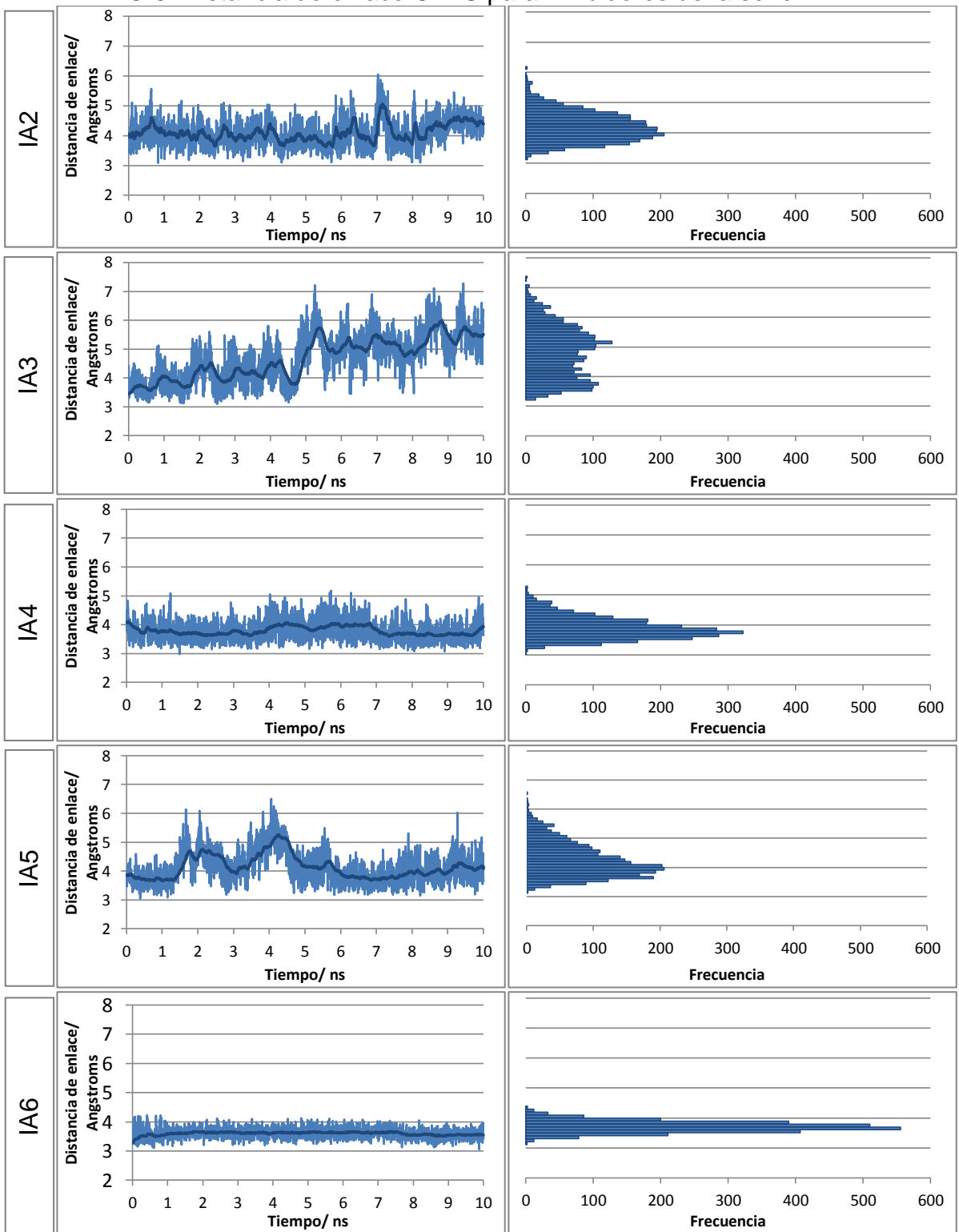
ANEXO 3. Ángulos C—X—O para inhibidores de la serie A



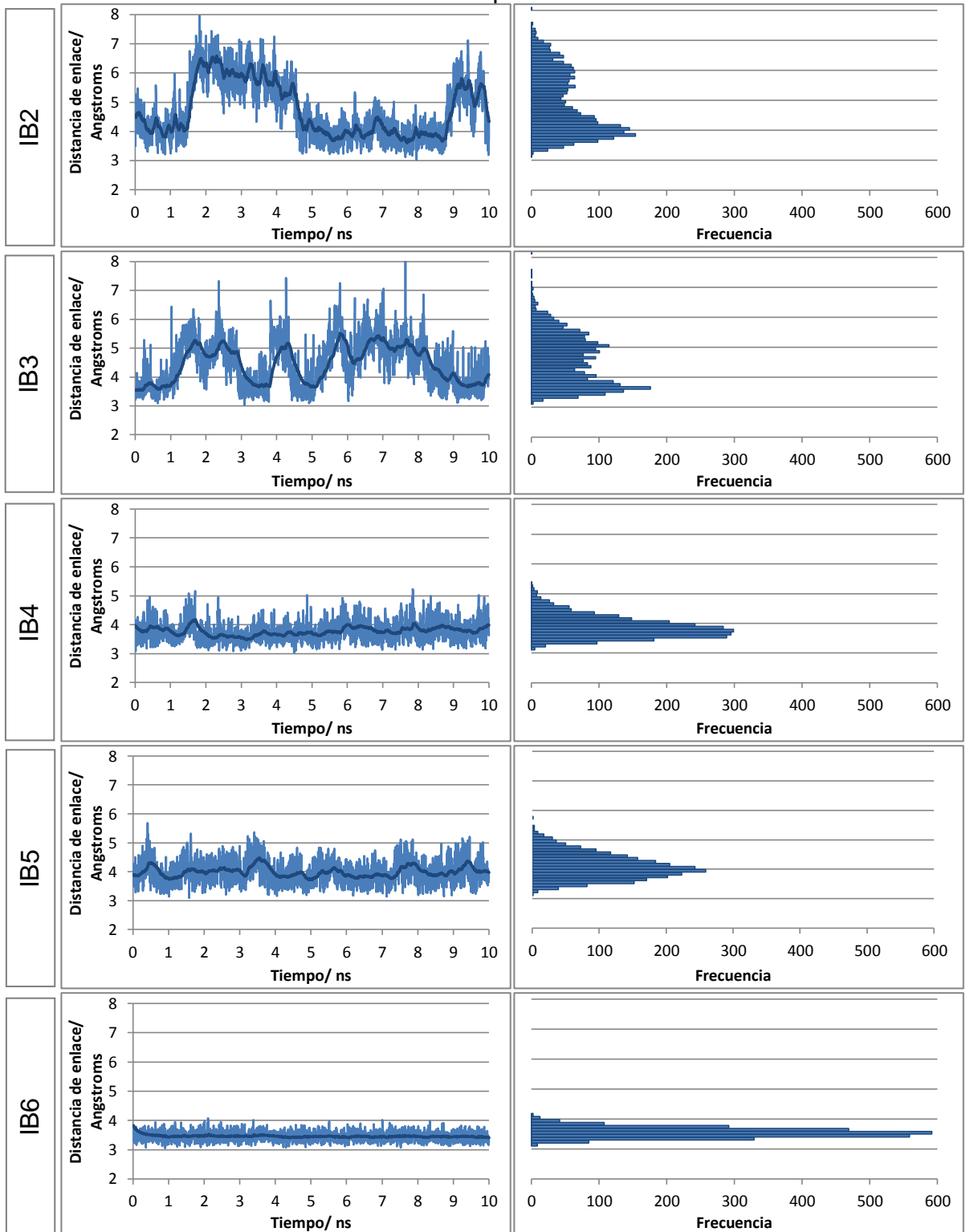
ANEXO 4. Ángulos C—X—O para inhibidores de la serie B



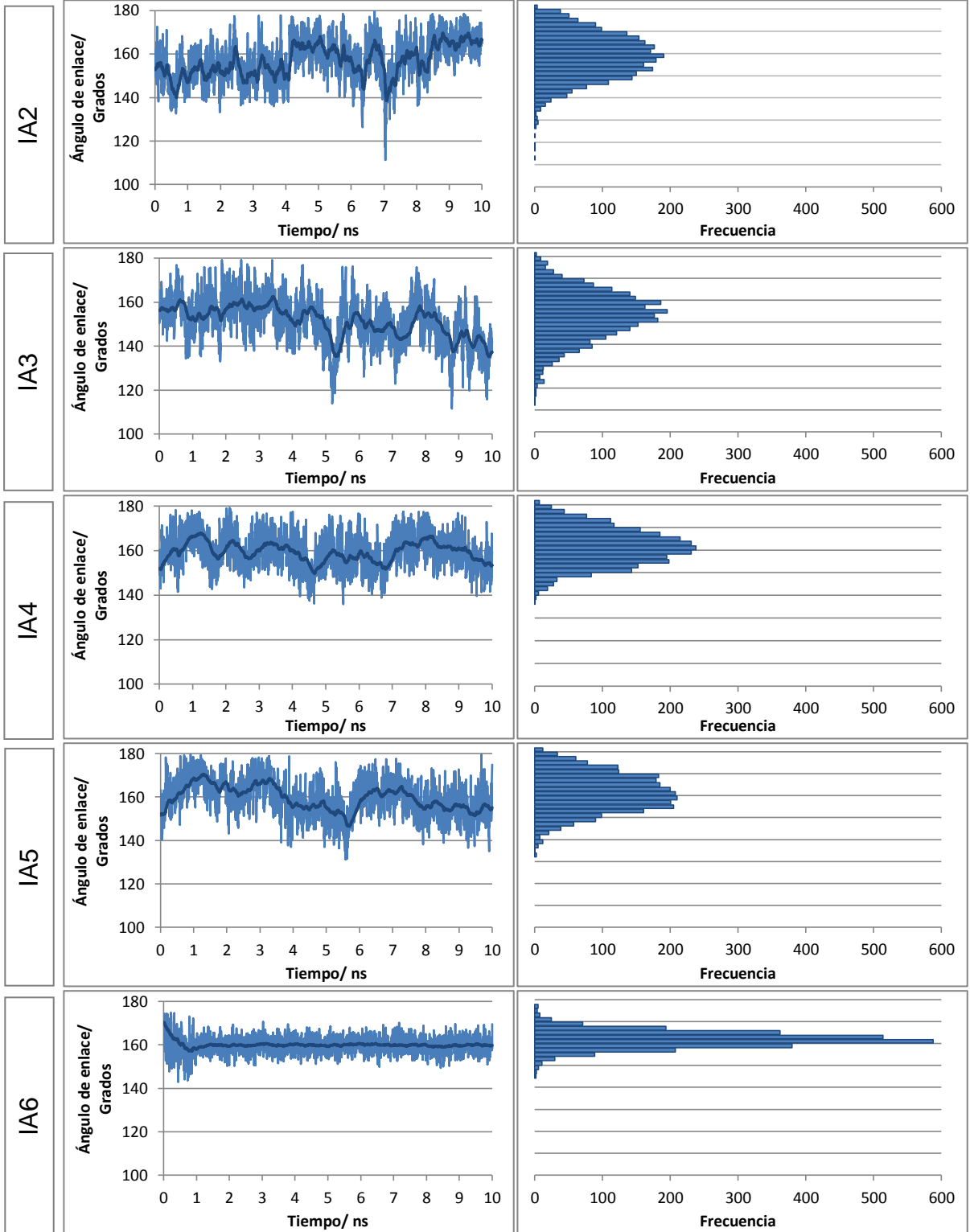
ANEXO 5. Distancia de enlace CI—S para inhibidores de la serie A



ANEXO 6. Distancia de enlace CI—S para inhibidores de la serie B



ANEXO 7. Ángulo C—Cl—S para inhibidores de la serie A



ANEXO 8. Ángulo C—Cl—S para inhibidores de la serie B

