

PRÁCTICA II.2
RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD I
STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP I

Hugo Cerecetto & Mercedes González

Endereço: Dpto. de Química Orgánica. Facultad de Química, UDELAR

hcerecet@bilbo.edu.uy

OBJETIVOS

Realizar estudios de relación estructura-actividad de productos y datos previamente publicados, tratando de obtener ecuaciones que permitan extraer información sobre los requerimientos estructurales para una adecuada actividad biológica.

MATERIAL NECESARIO: programa de análisis estadístico (EXCEL, ORIGIN, etc) o aplicación de métodos de mínimo cuadrados o trabajo con papel milimetrado.

TIEMPO: cada ejercicio puede llevar entre 1.5 y 2 horas. Depende del tipo de equipamiento. Y sería muy provechoso una adecuada discusión posterior.

PROPUESTAS: Con el fin de conocer los requerimientos estructurales necesarios para el desarrollo de una determinada actividad biológica es que se plantea en estos ejercicios el estudio de relación estructura-actividad de una serie de compuestos potencialmente antitumorales.

EJERCICIOS:

1) Entre los diferentes fármacos descritos como citotoxinas selectivas en hipoxia (con potencial aplicación en terapia antitumoral) se encuentra *tirapazamina* (figura 1). Se propone que este compuesto actúa a través de un proceso de bio-reducción, selectivo, en el tejido hipóxico, responsable de desencadenar eventos citotóxicos en el DNA celular (figura 1).

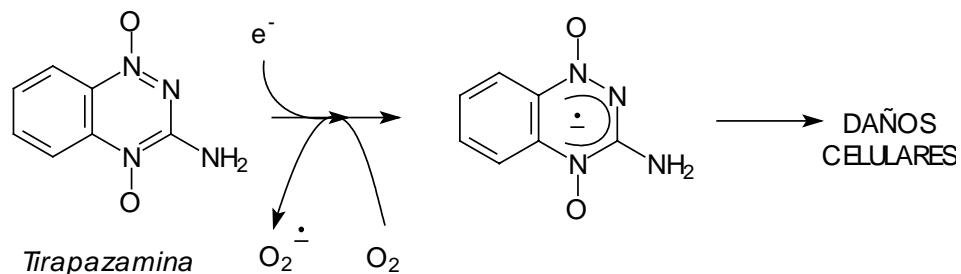
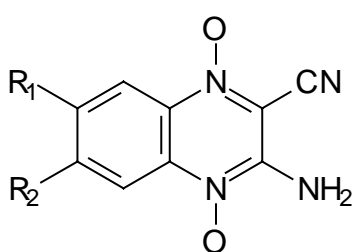


figura 1

Monge y col. (*J. Med. Chem.*, 38, 1786-1792, **1995**) han estudiado la capacidad de derivados de Quinoxalina di-*N*-óxido como potenciales agentes citotóxicos selectivos en hipoxia (ver tabla 1). Estos autores caracterizan biológicamente los productos y miden su potencial de reducción (tabla 1).

De acuerdo con estos datos experimentales, determine la existencia de relaciones entre las distintas propiedades.

- 1.1. Grafique el primer potencial de reducción vs la potencia. Si es posible obtenga una ecuación matemática que relacione ambos parámetros. ¿Está relacionada la citotoxicidad en hipoxia con la capacidad de reducción?
- 1.2. Grafique el primer potencial de reducción vs HCR. Si es posible obtenga una ecuación matemática que relacione ambos parámetros. ¿Está relacionada la selectividad con la capacidad de reducción?
- 1.3. ¿Se puede decir que los compuestos desarrollados por Monge y col. actúan por el mismo mecanismo de acción que *tirapazamina*?
- 1.4. ¿Si descarta el derivado **8** del análisis obtiene mejores resultados? Genere nuevas ecuaciones. ¿Porqué considera que es posible descartarlo?
- 1.5. ¿Los autores hicieron bien en no determinar la actividad del derivado **2**? ¿Y del derivado **5**?



Nº	R ₁	R ₂	potencia ^a	HCR ^b	Epc ^c
1	H	H	30	80	-0.88
2	CH ₃	CH ₃	ND ^d	ND	-0.97
3	F	H	15	100	-0.75
4	CF ₃	H	7	75	-0.65
5	CF ₃ O	H	ND	ND	-0.73
6	Cl	H	9	150	-0.74
7	Cl	Cl	1	80	-0.62
8	CN	H	11	50	-0.56

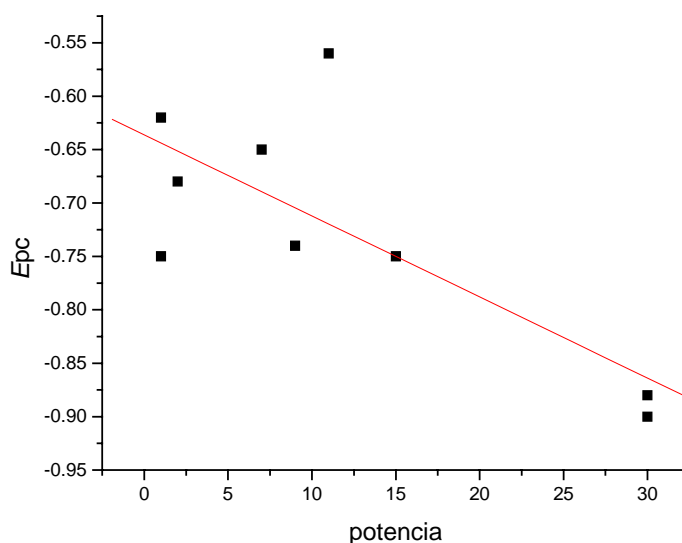
9	F	F	1	<10	-0.75
10	Cl	F	2	10	-0.68
TIRAPAZAMINA			30	75	-0.90

Notas: **a)** La potencia hace referencia a la concentración (en μM) necesaria para que sobreviva 1 % de las células estudiadas en hipoxia. **b)** HCR es la relación de citotoxicidad hipóxica, que se define como el cociente de las dosis en aire/dosis en hipoxia necesarias para producir un 99 % de muerte celular. **c)** Primer potencial de reducción, en voltios vs SCE, medido por voltametría cíclica en DMF. **d)** ND: no determinado.

Tabla 1

RESOLUCIÓN

1.1.



potencia = $-44 (\pm 18) -$

$77 (\pm 25) E_{pc}$

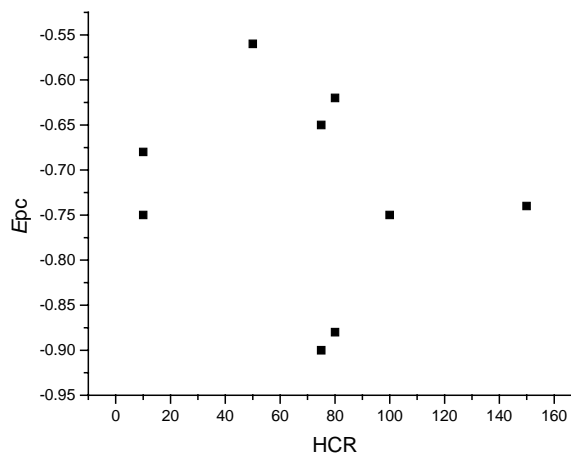
$r = 0.764$

Ecuación A

El potencial de reducción explica más de un 75 % de los casos estudiados.

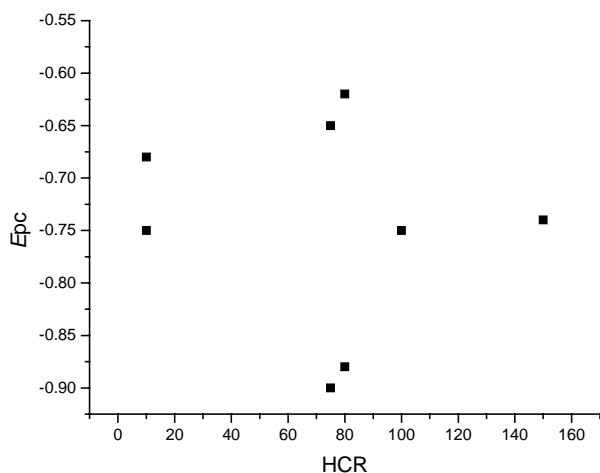
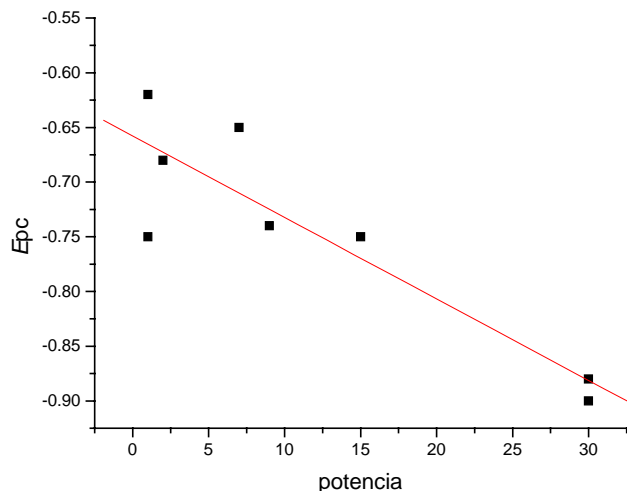
1.2.

La selectividad (expresada como HCR) no presenta una relación directa con el potencial de reducción.



1.3. Dado que el primer potencial de reducción explica, en parte, la actividad observada para los compuestos en estudios, es posible decir que el mecanismo de acción de los dióxidos derivados de quinoxalina puede ser el resultado de la bio-reducción biológica.

1.4. Si se descarta el derivado **8** se obtienen los siguientes resultados:



potencia=- 69 (± 16) – 108 (± 22) Epc
correlación

$r = 0.898$

Ecuación B

Sigue sin existir

estadísticamente válida

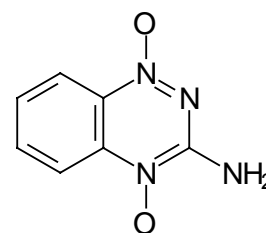
El sustituyente ($R_1 = \text{CN}$) del derivado **8** posee un efecto resonante electrón-atrayente de importancia. Los restantes derivados estudiados poseen sustituyentes que pertenecen a una serie más homogénea en este sentido (halógenos, H, CF_3 , prima el efecto inductivo).

1.5. Si se determinan las actividades de los derivados no evaluados, utilizando las ecuaciones generadas en las partes 1.1. y 1.4.,

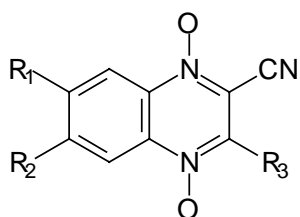
derivado	potencia	Ecuación
2	31	A
	36	B
5	12	A
	10	B

El derivado 2 no hubiese mostrado ninguna actividad interesante respecto a *tirapazamina*, sin embargo el derivado 5 presentaría una interesante potencia.

2) Tratando de confirmar que el mecanismo de acción de derivados de Quinoxalina di-*N*-óxido, como citotoxinas selectivas en hipoxia, es el mismo que para *tirapazamina* (fármaco de referencia, figura 1) se plantea un estudio teórico que permita conocer la capacidad de los derivados seleccionados en ser sensibles de bio-reducción. Se calcula teóricamente, por el método semiempírico AM1, las propiedades moleculares que se indican en la tabla 1.



Tirapazamina
figura 1



Nº	R ₁	R ₂	R ₃	potencia ^{a,b}	HCR _c ^b	E _{HOMO} ^d	E _{LUMO} ^e	μ ^f
1	H	H	NH ₂	30	80	-8.31	-1.69	2.74
2	Cl	H	NH ₂	9	150	-8.43	-1.84	2.14
3	Cl	Cl	NH ₂	1	80	-8.52	-1.99	1.34
4	F	H	NH ₂	15	100	-8.44	-1.89	2.23
5	F	F	NH ₂	1	<10	-8.81	-2.13	1.64
6	CF ₃	H	NH ₂	7	75	-8.66	-2.03	2.90
7	CH ₃ O	H	NH ₂	30	>10	-8.20	-1.69	4.30
8	CH ₃ O	Cl	NH ₂	10	<10	-8.28	-1.86	3.24

9	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	H	NH ₂	4	15	-8.55	-1.99	4.74
10	H	H	H	5	>100	-8.87	-1.80	5.13
11	Cl	H	H	3	30	-8.99	-1.96	4.21
12	Cl	Cl	H	0.7	10	-9.07	-2.13	3.34
13	F	H	H	2	>50	-9.02	-2.01	3.91
14	F	F	H	0.3	5	-9.16	-2.22	2.27
15	CF ₃	H	H	6	80	-9.20	-2.18	2.91
16	CH ₃	H	H	6	200	-8.82	-1.74	5.58
17	CH ₃	CH ₃	H	14	> 7	-8.76	-1.70	6.11
18	CH ₃ O	H	H	5	>200	-8.78	-1.77	6.62
19	CH ₃ O	Cl	H	0.4	> 50	-8.86	-1.94	5.74
20	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	H	H	0.2	200	-9.09	-2.25	3.31
21	H	H	CH ₃	10	15	-8.75	-1.73	4.55
TIRAPAZAMINA				30	75	-8.13	-1.40	1.52

Notas: **a)** La potencia hace referencia a la concentración (en μM) necesaria para que sobreviva 1 % de las células estudiadas en hipoxia. **b)** Monge y col., *J. Med. Chem.*, 38, 4488-4494, **1995**. **c)** HCR es la relación de citotoxicidad hipóxica, que se define como el cociente de las dosis en aire/dosis en hipoxia necesarias para producir un 99 % de muerte celular. **d)** Energía del HOMO, en eV. **e)** Energía del LUMO, en eV. **f)** μ : módulo del momento dipolar, en Debye.

tabla 1

Analice a través de gráficos, o por cálculos, la relación entre las actividades biológicas (potencia y HCR) y las propiedades electrónicas calculadas (E_{HOMO} , E_{LUMO} y μ), para: **a)** la población completa de derivados (**1-21** y *tirapazamina*); **b)** para los amino derivados (**1-9** con y sin *tirapazamina*); **c)** los desamino derivados (**10-21**).

¿Puede decirse que el mecanismo de citotoxicidad en hipoxia de los derivados de quinoxalina es el mismo que para *tirapazamina*?

RESOLUCIÓN

No existen correlaciones estadísticamente válidas entre HCR y los distintos descriptores electrónicos calculados (E_{HOMO} , E_{LUMO} y μ).

Sin embargo, la potencia se correlaciona adecuadamente con algunos de estos parámetros. En ningún caso la correlación entre potencia y μ es tan buena como las correlaciones entre potencia y las energías del HOMO y del LUMO.

a) Población completa de derivados estudiados (1-21 y tirapazamina):

potencia= 76 (\pm 13) + 35 (\pm 7) E _{LUMO}	$r= 0.761$	Ecuación A
potencia= 212 (\pm 38) + 23 (\pm 4) E _{HOMO}	$r= 0.765$	Ecuación B

b) Amino derivados estudiados**1-9 y tirapazamina:**

potencia= 107 (\pm 17) + 51 (\pm 9) E _{LUMO}	$r= 0.890$	Ecuación C
potencia= 410 (\pm 97) + 47 (\pm 11) E _{HOMO}	$r= 0.821$	Ecuación D

1-9 (sin tirapazamina):

potencia= 142 (\pm 22) + 68 (\pm 11) E _{LUMO}	$r= 0.911$	Ecuación E
potencia= 388 (\pm 119) + 44 (\pm 14) E _{HOMO}	$r= 0.766$	Ecuación F

c) Desamino derivados estudiados (10-21):

potencia= 34 (\pm 9) + 15 (\pm 5) E _{LUMO}	$r= 0.717$	Ecuación G
potencia= 152 (\pm 59) + 17 (\pm 7) E _{HOMO}	$r= 0.618$	Ecuación H

Con las correlaciones obtenidas puede decirse que el valor de las energías del LUMO se correlacionan adecuadamente con la citotoxicidad selectiva en hipoxia. A valores más negativos del LUMO mayor citotoxicidad, lo que se podría interpretar como una más fácil electronación, o sea entrada del electrón en el orbital de mayor energía vacío (LUMO), un mecanismo de acción similar al de *tirapazamina*.

Hugo Cerecetto

hcerecet@bilbo.edu.uy

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. Hugo Cerecetto and Mercedes González (hcerecet@fq.edu.uy; megonzal@fq.edu.uy) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

EXERCISE II.2

STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP I

Hugo Cerecetto & Mercedes González

Dpto. de Química Orgánica. Facultad de Química, UDELAR

E-mail: hcerecet@fq.edu.uy & megonzal@fq.edu.uy

OBJECTIVES

The aim of this work is to perform structure–activity relationship of products and data previously published, trying to obtain equations that allow us to know the structural requirements for an adequate biological activity.

MATERIAL

Statistics program (EXCEL, ORIGEN, etc.) or minimal square methodology or millimeter paper.

TIME

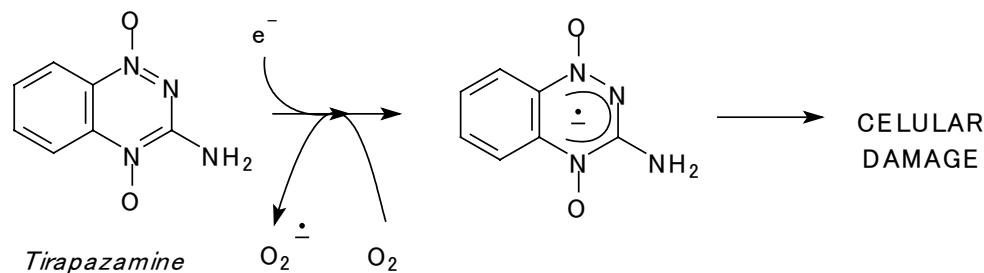
Each exercise could take about 1.5 and 2 h, depending on the kind of equipment. A final discussion of the work could be very profitable.

PROPOSAL

With the aim to know the structural requirements necessary for a defined bioresponse, these are planned structure–activity relationship studies of a series of potential antitumoral agents.

EXERCISES

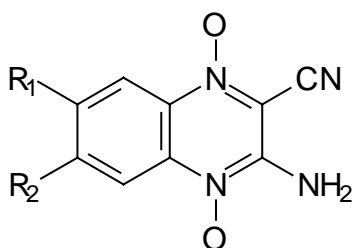
1) *Tirapazamine* is the most studied, among the different drugs described as selective cytotoxins in hypoxia (with potential application in anticancer therapy) (Fig. 1). It is proposed that this cytotoxin acts through a selective bioreduction process in the hypoxic tissue, causing damage in the cellular DNA.

**Fig. 1**

Monge et. al. (*J. Med. Chem.* **38**, 1786–1792, 1995) have studied the capacity of quinoxaline di-*N*-oxide derivatives as potential hypoxic selective cytotoxic agents (see Table 1). These authors biologically characterized these products and determined their reduction potential (Table 1).

According to these experimental data, study the relationships between the different properties.

- 1.6. Plot the first reduction potential against the potency. If possible, obtain a mathematical equation that relates both parameters. Is the cytotoxicity in hypoxia related to the reduction capacity?
- 1.7. Plot the first reduction potential against the hypoxic cytotoxicity ratio (HCR). If possible, obtain a mathematical equation that relates both parameters. Is the selectivity related to the reduction capacity?
- 1.8. Could you say that the compounds developed by Monge et al. act by the same mechanism of action as *tirapazamine*?
- 1.9. If you discard derivative **8** from the analysis, are the best results obtained? Obtain new equations. Why do you think that it is possible to discard it?
- 1.10. Did the authors make a correct decision in not evaluating derivative **2**? And for derivative **5**?



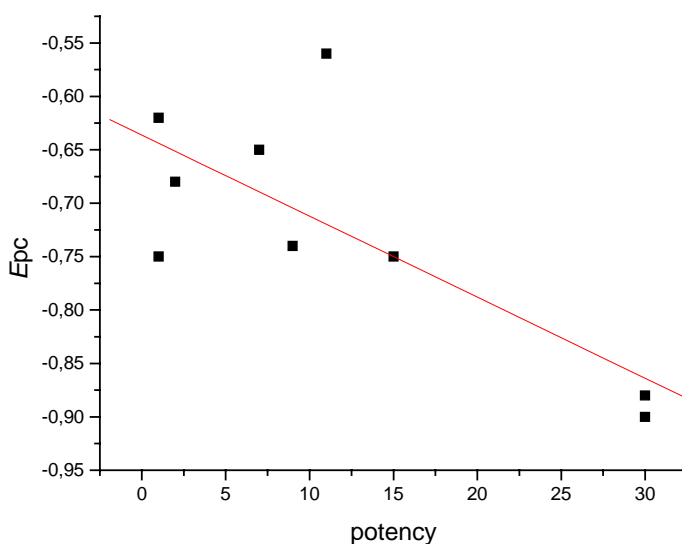
Nº	R ₁	R ₂	Potency ^a	HCR ^b	E _{pc} ^c
1	H	H	30	80	-0.88
2	CH ₃	CH ₃	ND ^d	ND	-0.97
3	F	H	15	100	-0.75
4	CF ₃	H	7	75	-0.65
5	CF ₃ O	H	ND	ND	-0.73
6	Cl	H	9	150	-0.74
7	Cl	Cl	1	80	-0.62
8	CN	H	11	50	-0.56
9	F	F	1	<10	-0.75
10	Cl	F	2	10	-0.68
TIRAPAZAMINE			30	75	-0.90

Table 1

Notes: **a)** The potency correspond to the concentration (in μM) necessary to 1 % of survival of the studied cells in hypoxia. **b)** HCR is the hypoxic cytotoxicity ratio, defined as the ratio between the doses in air/doses in hypoxia necessary to produce 99 % of cellular death. **c)** First potential of reduction, in V vs. SCE, measured by cyclic voltammetry in DMF. **d)** ND: not determined.

RESOLUTION

1.1.



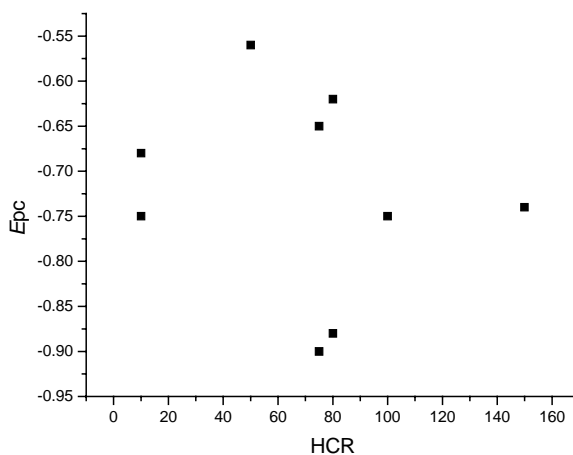
$$\text{potency} = -44 (\pm 18) - 77 (\pm 25) E_{\text{pc}}$$

$$r = 0.764$$

Eq. A

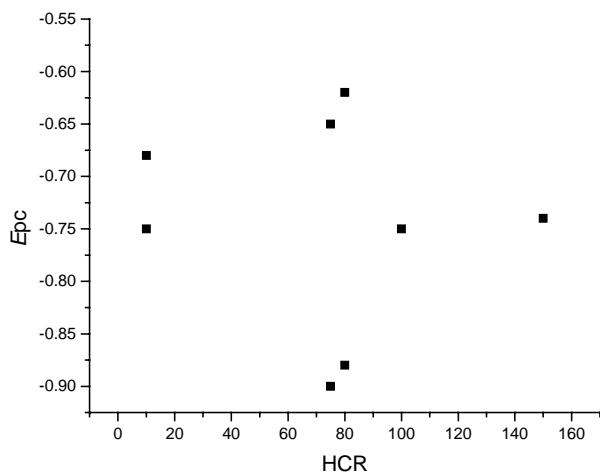
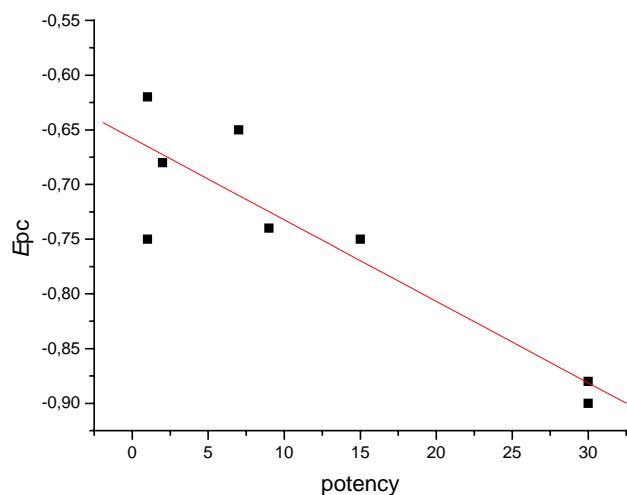
The reduction potential explains more than 75 % of the studied cases.

1.2. The selectivity (expressed as HCR) does not present a direct relationship with the reduction potential.



1.3. Because the first reduction potential explains, in part, the observed activity of the studied compounds, it is possible to affirm that the mechanism of action of the quinoxaline di-*N*-oxide derivatives could be the result of the biological reduction.

1.4. Discarding derivative **8**, the following results are obtained:



$$\text{potency} = -69 (\pm 16) - 108 (\pm 22) E_{pc}$$

Also, it was not possible to obtain a statistically valid relationship.

$r = 0.898$

Eq. B

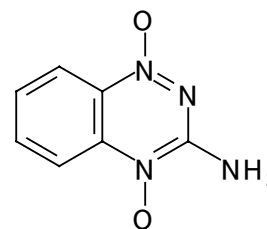
The substituent ($R_1 = \text{CN}$) of derivative **8** possess an important mesomeric electron-withdrawing effect. The following studied derivatives possess substituents of a homogenous series (halogen, H, CF_3 , the inductive effect prime).

1.5. If it is determined from the nonevaluated derivatives, using the generated equations in the parts **1.1** and **1.4**.

Derivative	Potency	Equation
2	31	A
	36	B
5	12	A
	10	B

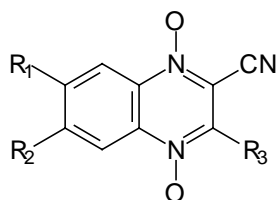
Derivative **2** would not present any relevant activity with respect to *tirapazamine*, but derivative **5** would present an interesting potency.

2) Trying to confirm that the mechanism of action of quinoxaline di-*N*-oxide derivatives, as selective cytotoxins in hypoxia, is the same as for *tirapazamine* (reference drug, Fig. 1) a theoretical study is planned that allows us to know the capacity of the selected derivatives to be sensitive to bioreduction. The molecular properties gathered in Table 1 were calculated using the semiempirical method AM1.



Tirapazamine

Fig. 1



N°	R ₁	R ₂	R ₃	Potency ^{a,b}	HCR ^{b,c}	E _{HOMO} ^d	E _{LUMO} ^e	μ ^f
1	H	H	NH ₂	30	80	-8.31	-1.69	2.74
2	Cl	H	NH ₂	9	150	-8.43	-1.84	2.14
3	Cl	Cl	NH ₂	1	80	-8.52	-1.99	1.34
4	F	H	NH ₂	15	100	-8.44	-1.89	2.23
5	F	F	NH ₂	1	<10	-8.81	-2.13	1.64
6	CF ₃	H	NH ₂	7	75	-8.66	-2.03	2.90
7	CH ₃ O	H	NH ₂	30	>10	-8.20	-1.69	4.30
8	CH ₃ O	Cl	NH ₂	10	<10	-8.28	-1.86	3.24
9	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	H	NH ₂	4	15	-8.55	-1.99	4.74
10	H	H	H	5	>100	-8.87	-1.80	5.13
11	Cl	H	H	3	30	-8.99	-1.96	4.21
12	Cl	Cl	H	0.7	10	-9.07	-2.13	3.34
13	F	H	H	2	>50	-9.02	-2.01	3.91
14	F	F	H	0.3	5	-9.16	-2.22	2.27
15	CF ₃	H	H	6	80	-9.20	-2.18	2.91
16	CH ₃	H	H	6	200	-8.82	-1.74	5.58
17	CH ₃	CH ₃	H	14	>7	-8.76	-1.70	6.11
18	CH ₃ O	H	H	5	>200	-8.78	-1.77	6.62
19	CH ₃ O	Cl	H	0.4	>50	-8.86	-1.94	5.74
20	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	H	H	0.2	200	-9.09	-2.25	3.31
21	H	H	CH ₃	10	15	-8.75	-1.73	4.55
TIRAPAZAMINE				30	75	-8.13	-1.40	1.52

Table 1

Notes: **a)** The potency corresponds to the concentration (in μM) necessary to produce 1 % survival of the studied cells in hypoxia **b)** Monge et al., *J. Med. Chem.*, 38, 4488–4494, **1995**. **c)** HCR is the hypoxic cytotoxicity ratio, defined as the ratio between the doses in air/doses in hypoxia necessary to produce 99 % of cellular death. **d)** HOMO energy, in eV. **e)** LUMO energy, in eV. **f)** μ: module of dipolar moment, in Debye.

Analyze using plots, or with calculation, the relationship between the biological activity (potency and HCR) and calculated electronic properties (E_{HOMO}, E_{LUMO}, and μ), for: **a)** the complete population of derivatives (**1–21** and *tirapazamine*); **b)** for the amino derivatives (**1–9** with and without *tirapazamine*); **c)** the deamino derivatives (**10–21**).

Could you say that the mechanism of cytotoxicity in hypoxia of the derivatives of quinoxaline is the same as *tirapazamine*?

RESOLUTION

There is no valid statistical correlation between HCR and the different calculated electronic descriptor (E_{HOMO} , E_{LUMO} , and μ). But the potency adequately correlated with some of these parameters. In any case, the correlation between potency and μ is as good as the correlation between potency and HOMO and LUMO energies.

d) Complete population of studied derivatives (**1–21** and *tirapazamine*):

$$\text{potency} = 76 (\pm 13) + 35 (\pm 7) E_{\text{LUMO}} \quad r = 0.761 \quad \text{Eq. A}$$

$$\text{potency} = 212 (\pm 38) + 23 (\pm 4) E_{\text{HOMO}} \quad r = 0.765 \quad \text{Eq. B}$$

e) Amino derivatives studied

1–9 and *tirapazamine*:

$$\text{potency} = 107 (\pm 17) + 51 (\pm 9) E_{\text{LUMO}} \quad r = 0.890 \quad \text{Eq. C}$$

$$\text{potency} = 410 (\pm 97) + 47 (\pm 11) E_{\text{HOMO}} \quad r = 0.821 \quad \text{Eq. D}$$

1–9 (without *tirapazamine*):

$$\text{potency} = 142 (\pm 22) + 68 (\pm 11) E_{\text{LUMO}} \quad r = 0.911 \quad \text{Eq. E}$$

$$\text{potency} = 388 (\pm 119) + 44 (\pm 14) E_{\text{HOMO}} \quad r = 0.766 \quad \text{Eq. F}$$

f) Deamino derivatives studied (**10–21**):

$$\text{potency} = 34 (\pm 9) + 15 (\pm 5) E_{\text{LUMO}} \quad r = 0.717 \quad \text{Eq. G}$$

$$\text{potency} = 152 (\pm 59) + 17 (\pm 7) E_{\text{HOMO}} \quad r = 0.618 \quad \text{Eq. H}$$

With the obtained correlation, it could be said that the values of the LUMO energies are adequately correlated with the selective cytotoxicity in hypoxia. The more negative values of LUMO energies, the more cytotoxicity; this could be explained as a more facile electron donating, meaning a more facile access of the electron in the LUMO, with a similar mechanism of action of *tirapazamine*.

Hugo Cerecetto

hcerecet@fq.edu.uy

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories.

The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Hugo Cerecetto and Mercedes González (hcerecet@fq.edu.uy; megonzal@fq.edu.uy) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.