

Cra. 7 # 74 – 64
Oficina 506
P.O. Box 21848
Bogotá, D.C.
Colombia

HUMBERTO RUBIO & CIA.
ABOGADOS - LAWYERS

Tel: (571) 3132408 - 3132423
3132410 - 3131759
Fax: (571) 3131647 - 3132367
ail@rubiolawyers.com
v.rubiolawyers.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-027711-A-00007-0000

Fecha: 2014-07-16 14:05:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 29

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

Ref: Expediente No. **11-027.711-A**
Patente de Invención: **"COMPUESTOS DE TETRACICLINA SUSTITUIDOS CON FLÚOR EN C7"**
Solicitud Internacional: **PCT/US2009/053142**
Clasificación Internacional: **C07C 237/26, C07D 205/04**
Titular: **TETRAPHASE PHARMACEUTICALS, INC.**

RESPUESTA A REQUERIMIENTO OFICIO NO. 3046 NOTIFICADO POR FIJACION EN LISTA DE 11 DE MARZO DE 2014.

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., con la Oficina 506 de la Carrera 7 No. 74-64 de ésta ciudad, Abogado en Ejercicio, portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de apoderado de la sociedad **TETRAPHASE PHARMACEUTICALS, INC.**, domiciliada en 480 Arsenal Street, Suite 110, Watertown, Massachusetts 02472, Estados Unidos de America; reconocido por su despacho y encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal, debidamente reconocido por su Despacho; encontrándome dentro del término legal para dar contestación al auto proferido por su Despacho mediante Oficio No.3046, notificado por Estado de 11 de marzo de 2014, y cuya prórroga de término se radicó ante su Despacho el 30 de abril de 2014, me permito:

Manifestar:

I. En el informe oficial expedido contra la presente solicitud, se han emitido las objeciones que a continuación se resumen:

1. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica relacionado con la presente invención se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad, encontrándose los siguientes documentos, que según la Examinadora anticipan el objeto de esta solicitud:

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Solicitud No. 11-027711 A

Julio 2014

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	EP0536515	Novel 7-substituted-9-substituted amino-6-demethyl-6-deoxytetracyclines	Abril 14 de 1993
D2	EP0582789	Novel 7-(substituted)-8-(substituted)-9-(substituted glycy) amido-6-demethyl-6-deoxytetracyclines	Febrero 16 de 1994

El documento D1 divulga nuevos compuestos derivados 6 demetil, 6 deoxi tetraciclinas sustituidos 7 y 9 y sus composiciones, los cuales tienen efecto como antibióticos frente a microorganismos resistentes a las tetraciclinas.

El documento D2 divulga nuevos compuestos derivados 6 demetil, 6 deoxi tetraciclinas sustituidos 7,8 y 9 y sus composiciones, los cuales tienen efecto como antibióticos frente a microorganismos resistentes a las tetraciclinas.

2. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art 18 D486)

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1.

Según el análisis de la Examinadora, D1 divulga compuestos derivados 6 demetil, 6 deoxi tetraciclinas sustituidos 7 y 9, no sustituidos en la posición 8, fórmulas (I, pág. 6) y sus composiciones, (pág. 109, ln 44 a 52), los cuales tienen efecto como antibióticos y presentan una actividad aumentada frente a cepas altamente resistentes a las tetraciclinas (resumen, pág.5)

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1, y el compuesto de D1 (fórmula I) consiste en que la pirrolidina está sustituida por un metilo.

No obstante la diferencia anterior, la Examinadora considera que no es posible evidenciar un efecto técnico sorprendente, ya que el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo modificar el compuesto conocido en D1 para lograr una tetraciclina alternativa a las ya conocidas, con actividad sobre bacterias resistentes a dichas tetraciclinas".

Para la Examinadora, la presencia de anillos sustituidos por alquilo C1-C3 (metilo) estaba divulgada en D2 (2-(C1-C3) alquil-1-pirrolil, 3-(C1-C3)alquil-1-pirrolil; pág. 4, ln. 2 y 3), que se refiere a nuevos compuestos derivados 6 demetil, 6 deoxi tetraciclinas sustituidos en 7, 8 y 9 y sus composiciones (pág. 21, ln. 54 a 58 y pág.22, ln. 1 a 34) , los cuales tienen efecto como antibióticos frente a microorganismos resistentes a las tetraciclinas.

Igualmente, es importante mencionar que la sustitución por un metilo en el compuesto 64 (pág. 74) para obtener el compuesto 66 (pág. 76), ahora reivindicado, según las tablas de la descripción, ambos muestran actividad antimicrobiana.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría el grupo metilo en la pirrolidina del compuesto D1 de acuerdo a lo divulgado en el

documento D2, para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Puesto que la reivindicación dependiente 2 no menciona características inventivas adicionales, tampoco se puede considerar inventiva.

3. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

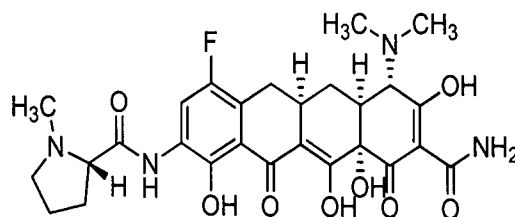
Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	EP0536515	1-2	Nivel inventivo
D2	EP0582789	1-2	Nivel inventivo

II.- En contestación a las observaciones anteriores, manifestamos lo siguiente:

Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art 18 D486)

La presente solicitud divisional presenta solo dos reivindicaciones: la reivindicación 1 dirigida a un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la reivindicación 2, dirigida a una composición farmacéutica que comprende el compuesto definido anteriormente.

Las reivindicaciones pendientes se han rechazado por carecer de actividad inventiva a la luz de las referencias D1 y D2, según el criterio de la Examinadora:

D1: Solicitud EP 0 536 515 ("Hlávka"); y

D2: La patente EP 0 582 789 ("Sum").

La Examinadora establece que D1 divulga compuestos de tetraciclina que tienen sustituyentes en las posiciones 7 y 9 del anillo. Aunque la Examinadora

los Ejemplos 111 y 121 de D1 para llegar al compuesto reivindicado de la presente invención.

En primer lugar, se debe considerar que las diferencias entre los compuestos de los Ejemplos 111 y 121 de D1 y el compuesto reivindicado **no se limitan a un simple sustituyente alquilo** unido en la posición 9 al radical pirrolidina. El compuesto reivindicado tiene **un anillo PIRROLIDINA-2-CARBOXAMIDA en la posición C-9**, dicho anillo de pirrolidina **está conectado directamente al grupo carbonilo en el carbono C-2**, no a una **PIRROLIDINA ACETAMIDA** en la posición C-9, como en los Ejemplos 111 y 121 de D1, donde el anillo de pirrolidina está conectado en el átomo de nitrógeno a través de un metileno al grupo carbonilo. Por lo tanto, la modificación de la pirrolidinacetamida unida en la posición 9 del Ejemplo 111 y el 121 de D1 con un alquilo **NO** resulta en el compuesto reivindicado: es decir, un experto en la técnica también tendría que reemplazar un enlazador acetamida con un enlazador carboxamida, y entonces cambiar el punto de unión del residuo pirrolidina desde un átomo de nitrógeno a un átomo de carbono (es decir, reemplazar 1-pirrolidina con 2-pirrolidina). Sin embargo, tal modificación resulta en la **introducción de un átomo de carbono metino quiral adyacente al carbonilo**, en lugar de un **metileno**, que es **aquiral**. Como se explica a continuación, la quiralidad en el punto de unión del residuo pirrolidina es importante.

D1 y D2 **no** sugieren las modificaciones requeridas para llegar al compuesto reivindicado **ni tampoco** enseñan la **importancia de la quiralidad** en el punto de unión de la pirrolidina. El compuesto reivindicado **es significativamente más potente** que su estereoisómero (como se demuestra a continuación). En consecuencia, las referencias citadas no sólo **no** logran motivar a un experto en la materia para llegar al compuesto reivindicado en la presente solicitud, sino que además no hay sugerencia alguna en estos documentos para la selección del estereoisómero activo.

Adicionalmente, la modificación de los compuestos D1 y D2 para llegar al compuesto reivindicado de la presente invención requiere algo más que la sustitución del sustituyente en la posición 9. El compuesto reivindicado **también incluye un flúor en la posición 7**. Como veremos más adelante, basándose únicamente en las enseñanzas de D1 y D2, un experto en la materia **no estaría motivado** a modificar los sustituyentes C-7 y C-9 de manera conjunta.

En segundo lugar, una persona de habilidad ordinaria en la técnica, basado en lo que se conoce acerca de las tetraciclinas sustituidas con flúor en la posición 7 del anillo, no estaría motivada a modificar cualquiera de los compuestos D1 y D2 con un sustituyente 7-flúor. D1 y D2 **no solo NO sugieren** una modificación de este tipo, sino que de hecho un experto en la materia esperaría que tal modificación daría como resultado una reducción de la actividad antibacteriana, como lo demuestra el Anexo A proporcionado con la presente respuesta y que comentamos a continuación.

1. Diferencias entre las referencias citadas y el compuesto reivindicado.

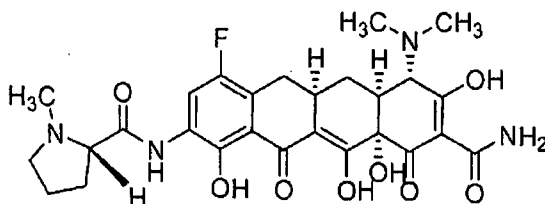
i. La combinación de las referencias sugeridas por la Examinadora requeriría que un experto normal en la técnica hiciera numerosas modificaciones en la posición 9 de D1 y D2 para llegar al compuesto reivindicado, modificaciones que no se enseñan ni se sugieren en las referencias mencionadas.

Primeramente queremos hacer notar que el compuesto reivindicado difiere de los Ejemplos 111 y 121 de D1 por la presencia de un sustituyente N-metil-pirrolidina-2-carboxamida en la posición 9. Por lo tanto, con el fin de llegar al compuesto reivindicado del solicitante, un experto en la materia también tendría que reemplazar un enlazador acetamida con un enlazador carboxamida, **y entonces** cambiar el punto de unión del residuo de pirrolidina desde un átomo de nitrógeno a un átomo de carbono. Sin embargo, tal modificación resulta en la introducción de un átomo de carbono metino **quiral** adyacente al carbonilo, en lugar de un metileno que es **aquiral**.

No hay compuestos ni en D1 ni en D2 que incluyan una pirrolidinacarboxamida en la posición 9. Por lo tanto, nada a partir de este estado de la técnica sugiere la modificación de los compuestos descritos en el mismo, incluyendo los compuestos de los Ejemplos 111 y 121 de D1, de una manera necesaria para llegar al sustituyente N-metil-pirrolidincarboxamida.

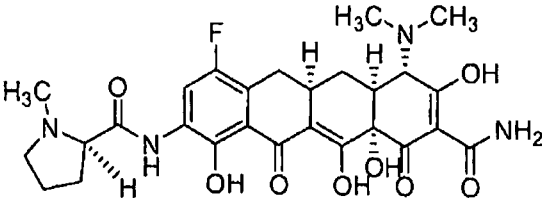
La modificación de la pirrolidinacetamida en carboxamida introduce un punto adicional de diferencia entre el compuesto reivindicado y los compuestos de la técnica anterior: **la quiralidad en el punto de unión de la pirrolidina**. El centro estéreo creado en el punto de conexión de una 2-pirrolidina al enlazador carboxamida **es importante para la actividad biológica**, como se evidencia por los datos que se encuentran en el equivalente numérico del conjunto de datos categorizados establecidos en la presente solicitud como la **Tabla 3**.

El compuesto reivindicado en la presente solicitud se describe como el **Compuesto 66 A**, que se representa a continuación para la conveniencia de este análisis:



El isómero del compuesto reivindicado con respecto a la posición 2 del anillo pirrolidina, también divulgado en la presente solicitud tal como fue presentada

como el **Compuesto 67**, está representado por la fórmula estructural representada a continuación:



La Tabla 1 que se presenta a continuación, lista la concentración mínima inhibitoria (CMI, en mg/ml) para el compuesto de la reivindicación y para su isómero. Los detalles de la prueba de CMI se exponen en el Ejemplo 13 de la solicitud.

Tabla 1

Cepa ensayada	SA101	SA100	SA161	SA158	EF103	EF159	SP108	SP160	EC107	EC155	AB110	PA111	EC108	KP109	KP153
	28213	13709	NRSA telK	telK	28212	telK	49519	telK	25922	telA	19606	27853	13047	13883	telA
Compuesto reivindicado	0.125	0.125	0.25	0.125	0.063	0.063	0.016	0.016	0.25	8	0.063	32	1	2	8
Enantiómero del compuesto reivindicado	1	2	2	2	1	2	0.25	0.25	2	16	1	>32	8	4	16

Como se puede apreciar de la tabla anterior, el compuesto reivindicado es significativamente más potente (tiene menores valores de CMI, es decir con menos concentración del compuesto se obtiene mayor inhibición de las bacterias) que su enantiómero en cada cepa ensayada. Por lo tanto, un experto en la técnica **no sólo** necesitaría sustituir una pirrolidinacetamida con una carboxamida, **y luego** modificar una 1-pirrolidina en una 2-pirrolidina y, a continuación colocar un sustituyente metilo en el átomo de nitrógeno, **sino que el experto en la materia también necesitaría seleccionar el enantiómero biológicamente activo**. Nada en D1 o D2 sugiere o enseña una serie compleja de modificaciones tales como las necesarias para arribar a los compuestos reivindicados.

ii. La combinación de referencias sugeridas por la Examinadora requeriría que un experto ordinario en la técnica **modificara las posiciones 7 y 9 de manera conjunta** para llegar al compuesto reivindicado, sin embargo tal modificación no se enseña ni sugiere por D2.

Como se explicó anteriormente, los compuestos de D1 que tienen un sustituyentes 9-pirrolidin**acetamida** no son un punto de partida adecuado para

una serie de modificaciones que serían necesarias para llegar a una 9-N-metil-pirrolidina-2-**carboxamida**. Además, las diferencias entre el compuesto reivindicado y los compuestos de D1 y D2 no se limitan al sustituyente en la posición 9. El compuesto reivindicado del solicitante difiere de los ejemplos 111 y 121 de D1 por la presencia tanto de un átomo de flúor en la posición 7 y por el sustituyente N-metil-pirrolidina-2-carboxamida en la posición 9. La modificación de **ambas** posiciones 7 y 9 al mismo tiempo no se sugiere en los documentos D1 o D2, considerados por separado o en combinación.

En cuanto a D1, aunque el sustituyente X de D1 (véanse las fórmulas estructurales en la página 6 de D1) puede ser un halógeno, los únicos ejemplos en D1 que incluyen un sustituyente 7-halo son compuestos 7-yodo. (Ver D1, Ejemplos 20, 61, 66, 69, 74, 94). Las diferencias entre el flúor y el yodo (radio atómico, electronegatividad, etc.) son tales que un experto en la materia no esperaría que una molécula sustituida con flúor tenga propiedades biológicas similares a una molécula sustituida con yodo en esa misma posición. Queremos volver a insistir en el hecho de que en materia de fármacos, todo experto en la materia conoce bien que un pequeño cambio estructural en un compuesto puede tener gran repercusión en su actividad biológica, por lo que no solo la sustitución en sí, sino la naturaleza del sustituyente puede impactar considerablemente en la acción farmacológica que el mismo realiza.

Por otra parte, **ninguno** de los compuestos sustituidos en la posición 7 con yodo de D1 **tiene además un residuo 9-pirrolidinacetamida**, mientras que en cada uno de los compuestos de D1 que tiene un heterociclo que contiene nitrógeno (por ejemplo, una pirrolidinacetamida) en la posición 9, **el sustituyente en la posición 7 es un grupo amino, no es un halógeno**. Por lo tanto, D1 no proporciona ninguna orientación para seleccionar el flúor como sustituyente posición 7, y menos aún que con esta modificación se considere además incluir una pirrolidinacetamida como sustituyente en la posición 9.

En cuanto D2, aunque el sustituyente R de D2 puede ser un halógeno, no hay ejemplificación de ningún tipo en los compuestos de este documento que tengan un grupo halo en la posición 7: los compuestos ejemplificados específicamente en D2 sólo poseen -NMe₂ o -Hat C-7. De hecho, existe una clara preferencia en D2 para átomos de halógeno distintos del flúor. En efecto, véase, por ejemplo, la página 6, líneas 27-30 de D2, donde el flúor se omite de la lista de valores preferidos del sustituyente C-7.

Por lo tanto, nada en D1 y D2, juntos o en combinación, sugiere a un experto en la técnica a seleccionar el sustituyente flúor para la posición 7 **junto** con un sustituyente 9-pirrolidinacetamida.

Por lo tanto, si los documentos D1 o D2 fueran seleccionados por un experto en la materia como punto de partida para abordar el problema técnico objetivo de la presente solicitud, el experto no habría identificado los compuestos que **poseen tanto** un grupo 7-halo (por no hablar más particularmente de un grupo 7-flúor) y una 9-pirrolidinacetamida como para ofrecer la mayor promesa de una solución al mismo, ya que ambas referencias se centran en compuestos que tienen muy diferentes combinaciones de sustituyentes en estas posiciones.

2. Un experto en la materia esperaría que un sustituyente flúor en la posición 7 de las tetraciclinas alternativas reduciría la actividad antibacteriana.

Con base en el conocimiento general disponible en el momento de presentación de la presente solicitud, una persona con habilidad normal en el campo técnico de la invención esperaría que la modificación de un núcleo de tetraciclina mediante la colocación de un sustituyente flúor en la posición 7 resultara en la reducción de la actividad antibacteriana.

Como parte de esta respuesta presentamos el Anexo A, el cual es una publicación de Sato y otros. "Structure-Activity Relationship Investigation of Some New Tetracyclines by Electronic Index Methodology", Los Alamos National Laboratory, Quantitative Biology, 1-18 (21 Aug. 2007).

Este anexo describe el uso del análisis computacional para predecir la actividad biológica de las tetraciclinas modificadas de diversa forma. Un conjunto de entrenamiento incluyó 14 derivados de tetraciclina conocidos con actividad antibacteriana reconocida (véase Tabla 1, página 2). El conjunto de entrenamiento se utiliza para generar un modelo teórico que se puede utilizar para predecir la actividad de los nuevos derivados de tetraciclina propuestos. Este modelo teórico produjo una puntuación que clasificó cada derivado de tetraciclina propuesto como activo (A) o inactivo (I), basado en el gráfico presentado en la Figura 5, página 9.

Los nuevos derivados de tetraciclina propuestas se describen al inicio de la página 9, con referencias a las fórmulas estructurales genéricas que se muestran en la Figura 6, página 10, Figura 7, página 12, y la Figura 8, página 12. Para cada una de las tres fórmulas estructurales genéricas, treinta combinaciones de variables ("conjuntos estructurales") fueron investigadas, cada conjunto está definido por los valores de los sustituyentes indicados en la Tabla 4, página 10. Así, en total, noventa estructuras fueron investigadas (3 estructuras genéricas, con 30 combinaciones específicas de las variables para cada estructura genérica), y los resultados obtenidos con este análisis pueden observarse en la Tabla 5, página 11 de este Anexo.

En referencia a la Tabla 4, página 10, tres de las treinta combinaciones de sustituyentes en los "conjuntos estructurales" incluyen grupos funcionales 7-flúor: 13, 14 y 20. De estos tres, el conjunto estructural 20 incluyó un átomo de flúor como el único valor que no es hidrógeno entre las cinco variables, permitiendo así aislar el efecto del flúor en la posición C-7 sobre la actividad biológica.

Haciendo referencia a la Tabla 5, basado en los "conjuntos estructurales" 13, 14, y 20, se consideraron nueve moléculas que incluyen el sustituyente 7-flúor: moléculas 13, 14, 20, 43, 44, 50, 73, 74, y 80. De estas, las moléculas 20, 50, y 80 incluyeron 7-flúor como el único sustituyente entre los cinco sustituyentes variables. Como la Examinadora podrá observar, las nueve moléculas que tienen la posición 7 sustituida con flúor se prevé que son inactivas.

Por lo tanto, incluso si un experto en la materia seleccionara cualquiera de los compuestos descritos en D1 o D2 como un punto de partida para abordar el problema técnico objetivo de la presente solicitud, dicho experto habría esperado que la modificación de un núcleo de tetraciclina mediante la colocación de un sustituyente flúor en la posición 7 resultaría en la reducción de la actividad antibacteriana.

En consecuencia podemos afirmar que existe doble razón para reconocer el compuesto reivindicado como inventivo, pues como hemos demostrado, en primer lugar su estructura no se deriva de la simple combinación de las enseñanzas descritas en los documentos de la técnica anterior D1 y D2 citados, de manera que el solicitante ha tenido innegablemente que desplegar un esfuerzo inventivo para llegar a ella. En segundo lugar, si un experto hubiera partido de los compuestos divulgados en estas referencias, no habría colocado un flúor en la posición 7 pues se esperaría que se obtuvieran compuestos inactivos según lo descrito en el Anexo A, lo que apunta en sentido totalmente opuesto a lo demostrado por el solicitante, con la potente actividad antibacteriana desplegada por el compuesto reivindicado en los ensayos realizados.

Teniendo en cuenta lo expuesto, consideramos que las reivindicaciones definen una selección nueva de lo divulgado de manera general en el estado de la técnica, son claras, concisas y debidamente sustentadas en la solicitud originalmente presentada, y por lo tanto no son anticipadas ni obviamente derivadas del estado de la técnica conforme lo establece el Art. 14, 16 y 30 de la Decisión 486.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS - LAWYERS

www.rubiolawyers.com

Solicitud No. 11-027711 A

Julio 2014

Anexo:

- Anexo A: Sato F. y otros. Structure-Activity Relationship Investigation of Some New Tetracyclines by Electronic Index Methodology", Los Alamos National Laboratory, Quantitative Biology, 1-18 (21 Aug. 2007)

Petición:

Conforme a lo anterior, una vez atendidos los requerimientos y exigencias de la Examinadora y al tener en cuenta el nuevo capítulo reivindicatorio presentado, solicito muy amablemente a su Despacho, que considerando los argumentos aquí expuestos, sea concedido el privilegio de invención solicitado, y en caso contrario se hagan las correspondientes observaciones con el ánimo de hacer lo pertinente dentro del presente trámite.

Atentamente,



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

C.C. 17'192.062 de Bogotá

**T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura**

COD. 4134

Structure-Activity Relationship Investigation of Some New Tetracyclines by Electronic Index Methodology

F. Sato¹, S. F. Braga¹, H. F. dos Santos², and D. S. Galvão¹

February 1, 2008

¹Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas - SP CP6165, CEP 13081-970, Brazil.

²NEQC (Núcleo de Estudos de Química Computacional), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Martelos, Juiz de Fora, MG, 36.036-900, Brazil.

Abstract

Tetracyclines are an old class of molecules that constitute a broad-spectrum antibiotics. Since the first member of tetracycline family were isolated, the clinical importance of these compounds as therapeutic and prophylactic agents against a wide range of infections has stimulated efforts to define their mode of action as inhibitors of bacterial reproduction. We used three SAR methodologies for the analysis of biological activity of a set of 104 tetracycline compounds. Our calculation were carried out using the semi-empirical Austin Method One (AM1) and Parametric Method 3 (PM3). Electronic Indices Methodology (EIM), Principal Component Analysis (PCA) and Artificial Neural Networks (ANN) were applied to the classification of 14 old and 90 new proposed derivatives of tetracyclines. Our results make evident the importance of EIM descriptors in pattern recognition and also show that the EIM can be effectively used to predict the biological activity of Tetracyclines.

1 Introduction

Tetracyclines (TC) are a set of compounds used in human therapy against a broad-spectrum of microbial agents since 1947. They can be classified as low cost drugs with small side-effects being largely used by food industry and for therapy in animals and plants [1]. TC present activity against Gram-positive and Gram-negative anaerobic and aerobic bacteria, mycobacterium and several protozoan parasites [2]. Non-antibacterial effects as anti-inflammatory, immunosuppressive [3], antioxidant [4] and anticancer [5, 6] are also attributed to them.

The excessive use of TC during years helped resistant bacteria proliferation, limiting then their clinical use. More than 30 TC resistance determinants have been described [7, 8] and several different TC resistance determinants have been identified in *E. coli* [9, 10, 11]. This emergence of resistant pathogens is becoming an increasingly important problem and it motivates the search for new TC variations and derivatives [12]. TC can be divided into two classes, the bacteriostatic typical TC and atypical TC, which are bactericidal and they exert their effects by promoting bacterial autolysis. Most probably due to their different modes of action, atypical TC have been shown to exert activity against some TC resistant bacteria [13, 14].

The chemistry of TC in solution is quite complicated [15] due to their ability to adopt different conformations, protonation states, and tautomeric forms, depending on the conditions investigated [16]. TC and its analogues undergo complex formation with a variety of the metal cations present in biological fluids [17, 18, 19, 20] and this affects their chemical as well as conformational equilibrium in solutions. Theoretical and experimental investigations

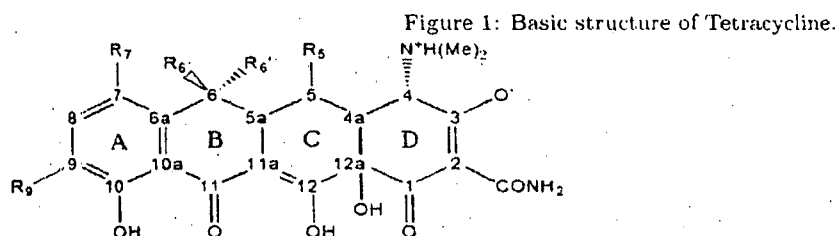


Table 1: Set of investigated Tetracyclines labelled accordingly to Figure 1 and respective biological activity index [27]. For compound 12 the substituents on carbon 11 and 12 are interchanged and for compound 13 carbons 3 and 4 are linked to hydrogen atoms.

Molecule	Compound	R ₅	R ₆	R _{6'}	R ₇	R ₉	$K_{sens} \times 10^3$
01	Tetracycline	H	OH	Me	H	H	600.0
02	7-NH ₂ -6-Demethyl-6-deoxytetracycline	H	H	H	NH ₂	H	190.0
03	5-Hydroxytetracycline	OH	OH	Me	H	H	650.0
04	9-NO ₂ -6-Demethyl-6-deoxytetracycline	H	H	H	H	NO ₂	145.0
05	9-NH ₂ -6-Demethyl-6-deoxytetracycline	H	H	H	H	NH ₂	350.0
06	7-Cl-6-Demethyltetracycline	H	OH	H	Cl	H	1100.0
07	7-Cl-Tetracycline	H	OH	Me	Cl	H	950.0
08	7-NO ₂ -6-Demethyl-6-deoxytetracycline	H	H	H	NO ₂	H	1450.0
09	9-N(CH ₃) ₂ -6-Demethyldeoxytetracycline	H	H	H	H	N(Me) ₂	76.0
10	6-Demethyl-6-deoxytetracycline	H	H	H	H	H	250.0
11	6-Demethylamino-6-demethyldeoxytetracycline	H	H	H	N(Me) ₂	H	250.0
12	5a,6-Anhydrotetracycline	H	Me	-	H	H	130.0
13	12a-Deoxytetracycline	H	OH	Me	H	H	8.5
14	7-Br-6-Demethyl-6-deoxytetracycline	H	H	H	Br	H	70.0

have contributed to the understanding of the interaction of TC with biological medium and their mode of action [21, 22, 23, 24, 25, 26]. Theoretical calculations have also been applied to investigations of new applications for old, new and hypothetical TC derivatives [22].

In this work we present an investigation of electronic and quantum features for a series of TC (Figure 1, Table 1) for which the biological activity against *E. Coli* is known and also to new compounds [27]. Our results showed that it is possible to directly correlate some quantum electronic descriptors to TC biological activity. This information is then used in the design of new compounds.

2 Methodology

We started our investigation with a detailed search for the global minimum of energy for 14 TC derivatives with known biological activity (Figure 1, Table 1). In the geometrical search of each molecule all degrees of freedom have been allowed to change during optimization and special attention has been devoted to the $NH(Me)_2$ group bounded to carbon 4, which is known to influence TC solution and gas phase stability [16]. All the calculations have been performed with semiempirical Austin Method 1 (AM1) [28] and Parametric Method 3 (PM3) [29, 30].

The AM1 and PM3 methods are widely used in the investigation of organic molecules with very good results [31]. In this study one of the points we would like to evaluate is whether the geometry and the correlation of theoretical properties with biological activity are dependent on the used semiempirical method. Molecules are studied in gas phase adopting the zwitterionic form, that is one of three TC basic forms and considered to be the active species in the biological medium. In zwitterionic form the total charge in molecule is equal zero but the groups bounded to the carbons 3 and 4 are charged and set to O^- and $NH^+(Me)_2$, respectively [27]. Although we can expect that Hartree-Fock methods such as AM1 and PM3 could have some difficulties in precisely describing these forms, a systematic error is expected. Zwitterionic together with NH^- ionized species are commonly present in aqueous solutions and it is believed to complex with ions metals as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} in biological medium, affecting the bioavailability and therapeutic TC properties [32, 33, 34].

For the geometry optimization and properties calculation we have used the Chem2Pac package [35]. Once optimized, the conformations of minimum energy were the basis for theoretical properties and electronic descriptors calculations. We based our structure-activity relationship (SAR) investigation on the Electronic Indices Methodology (EIM) and its descriptors. EIM was initially developed to identify the carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons [37, 36] using very simple rules. The methodology uses only two descriptors called Δ and η . The Δ is defined as the energy separation of molecular levels as indicated in Eq.(1).

$$\Delta = E_{level1} - E_{level2} \quad (1)$$

The descriptor η , is based on the Local Density of States (LDOS), which is obtained as the Density of States (DOS) for a selected group of atomic orbitals or atoms. The η is calculated as the LDOS difference between the most relevant molecular electronic levels (defined in the Δ calculation) over molecular regions identified as related to biological activity:

$$\eta = 2 \sum_{a=a_1}^{a=a_n} (|C_a(level1)|^2 - |C_a(level2)|^2) \quad (2)$$

C_a is the coefficient of atomic orbital from LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) approximation. a_1 and a_n refer to atoms composing the selected molecular region. Δ contains global molecular information (involving the eigenvalues) while η contains local molecular information (LDOS) assumed to reflect the molecular environmental biochemical mechanisms (for details of EIM see refs. [37, 36, 38, 39, 35, 40, 41]).

With only these two descriptors EIM has classified with success, as active and inactive, molecules of different classes of activity including steroid hormones [38, 39], integrase inhibitors [35], antibiotics [35], and tumoral [40] and antitumoral compounds [41]. Usually the EIM rules involve critical values assuming the boolean form: IF $\Delta > (<) \Delta_c$ AND/OR $\eta > (<) \eta_c$, the molecule will be active, otherwise it will be inactive. Δ_c and η_c are critical values determined from EIM analysis. The critical values and EIM rules are automatically obtained from an exploratory scanning. In contrast to other SAR methods, EIM does not use training sets.

In order to obtain the EIM parameters and classificatory rules, the common molecular skeleton of the group of compounds investigated is divided into regions. Available informations about important molecular regions to determine biological activity is taken into account in the choice of the regions to the LDOS calculations. The present study we divided TC into 6 regions:

1. ring A and radicals;
2. ring B and radicals;
3. ring C and radicals;

4. ring D and radicals, exception to groups $CONH_2$ and $N^+H(Me)_2$;
5. radical $N^+H(Me)_2$;
6. radical $CONH_2$.

The group of 14 molecules has been divided into two subgroups accordingly to their biological activity. Our criterion to classify molecules as active or inactive was based on the experimental values of K_{sens} index presented in Table 1. Molecules with K_{sens} lower than 100 are classified as inactive and those with K_{sens} greater than 100 as actives. The K_{sens} index represents the inhibition velocity constant based on cell growing velocity law [27].

The importance of electronic descriptors was evaluated by comparing EIM results with those obtained with standard SAR methods, Principal Component Analysis (PCA) and Artificial Neural Networks (ANN).

The PCA method is an extremely useful explorative tool to separate samples into groups accordingly to their similarity and also to select important descriptors to these separations. In a geometrical interpretation each descriptor is considered a vector in a N-dimensional space and PCA method constructs a new space where new vectors, called principal components (PC), are linear combinations of the original descriptors. In the PCs space the samples are mapped through scores and the original descriptors through loading. From the loading plots, the important descriptors can be identified and the correlation pattern among them can be established. These calculations were carried out with the *Einsight* program [42].

The ANN analysis was carried out using the program package Perceptron-type Neural Network Simulator with back-propagation algorithm (PSDD) [43, 44]. PSDD consists of a three-layer perceptron network originally developed for drug design. This is a non-linear method and offers great advantage over conventional SAR methods for the cases where the target properties are not linearly dependent on the chosen parameters. In the ANN analysis we considered only the EIM descriptors to classify old and new proposed tetracyclines.

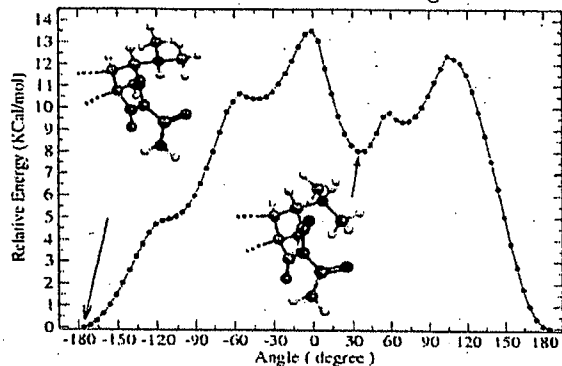
3 Results and Discussions

3.1 Structures

For the geometry optimization a conformational search was carried out considering the systematic variation of the dihedral angles related to the radicals bounded to the molecular skeleton. We initially used the rotational step of 10 degrees to the OH, Me, NO_2 , NH_2 , $CONH_2$, and $NH(Me)_2$ groups in a rigid-rotor approach (one self consistent field calculation) using AM1 and PM3 hamiltonians. The ten best conformations (in terms of energy) were then selected and their geometries were fully optimized. All calculations (AM1 and PM3) have been performed with Mopac 6 implemented in Chem2Pac program [35] using high quality numerical precision optimization criteria.

An important characteristic of TC geometries is the presence of $NH^+(Me)_2$ group bounded to carbon 4. For the most stable conformations we investigated in details the energy variation related to the rotation of this group. For this specific part of study we optimized the geometry of each conformation generated by a rotation of 5 degrees at the dihedral formed by the hydrogen and nitrogen atoms of $NH^+(Me)_2$ group, carbon 4, and hydrogen bound on carbon 4 ($Dh_{NH^+(Me)_2}$). The complete rotation of 360° showed the existence of the $Dh_{NH^+(Me)_2}$ two local minima of energy. The structure at $Dh=-180$ degrees is named extended and the other at $Dh=30$ degrees twisted [24, 25, 16]. In Figure 2 we present the result obtained to molecule 01, for all the other molecules the curve of energy is similar. The relative energy is calculated considering the lowest energy as zero of reference. As can be observed from Figure 2 the lowest energy conformer corresponds to the dihedral $Dh_{NH^+(Me)_2}$ around 180 degrees. From the inset in the Figure 2 we can observe that in this conformation the hydrogen of $NH^+(Me)_2$ is directed toward the OH group at C12a. The second local minimum conformation is observed for $Dh_{NH^+(Me)_2}$ around 35 degrees and in this case the hydrogen atom points to O3 moiety.

Figure 2: Relative energy for the rotation of dihedral $Dh_1(NH^+(Me)_2)$ calculated with AM1 method to molecule 01. The -180 and 180 degrees correspond to the same conformation, the called extended conformation. The twisted conformation are located around 35 degrees. Structures in the inset show details of these conformations.



In order to better illustrate these conformations we show in Figure 3 the lowest energy conformer for molecule 01 in the extended conformation.

In Table 2 we present the main dihedral angles characterizing the TC rings from the global minimum of each compound calculated with AM1. Similar results were obtained with PM3 method.

As can be observed from the values of dihedrals 5-4a-12a-1 and 3-4-4a-12a (Table 2) all the molecules have the A ring non co-planar with the plane formed by rings D, C, and B. The rings C and B present a small torsion induced by the hydrogen atom bounded to carbon 5a. Torsions angle values between D-C and C-B rings are shown in second and third columns, respectively.

Figure 3: Molecule 01 optimized structure from AM1 calculation.

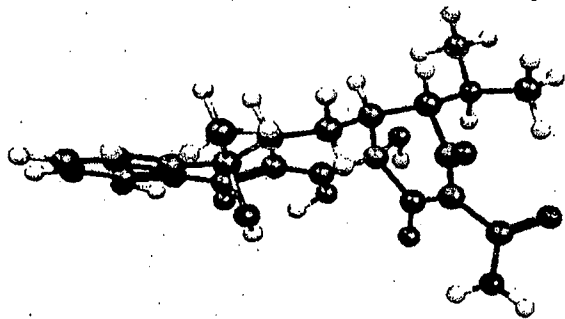


Table 2: Main latex article templatedihedral angles (in degrees) for optimized TC structures with AM1 method. The second, third, and fourth columns show the planarities between rings D-C, C-B, and B-A, respectively. The fifth column indicates A ring angle torsions values. Labelling accordingly to Figure 1.

Molecule	7-6a-10a-11	6-5a-11a-12	5-4a-12a-1	3-4-4a-12a
01	-178.7	-138.5	-78.9	60.6
02	-175.7	-147.3	-84.8	60.1
03	-171.4	-121.6	-66.4	22.1
04	-178.1	-139.1	-78.6	62.4
05	-178.0	-139.7	-79.5	62.4
06	-179.7	-140.9	-79.9	60.5
07	-165.7	-141.7	-82.2	62.7
08	-174.5	-140.9	-80.1	60.7
09	-174.6	-140.0	-79.8	61.0
10	-178.9	-139.4	-79.2	62.4
11	-176.7	-139.8	-79.9	61.0
12	174.1	178.8	-72.3	59.8
13	-177.9	-136.7	-72.2	54.3
14	-177.8	-140.3	-79.9	60.9

3.2 The EIM Method and PCA Analysis

From the EIM analysis we obtained the Δ for pairs of frontier orbitals (Highest Occupied Molecular Orbital-HOMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital- LUMO and next closest levels) and the η data for all the regions listed in the methodology section. We observed that the best results for both AM1 and PM3 methods are obtained for ΔH (Eq. 3) and ηH (Eq. 4) calculated over the region 6 (radical CONH₂ bounded to carbon 2). In this case the equations 1 and 2 became:

$$\Delta = E_{HOMO} - E_{HOMO-1} \tag{3}$$

$$\eta = 2 \sum_{a=a_1}^{a=a_n} (|C_{a(HOMO)}|^2 - |C_{a(HOMO-1)}|^2) \tag{4}$$

The EIM parameter values are presented in Table 3. In order to build the EIM rules we determine the critical values of the descriptors ΔH_c and ηH_c . The classificatory rules are constructed trying to reproduce the experimental classes indicated in section 2 with relation to the K_{sens} values. For AM1 (Eq.5) and PM3 (Eq. 6) methods the following the rules have been obtained:

$$\text{IF } \Delta H \geq 0.70 \text{ AND } \eta H \geq 1.39 \text{ THEN molecule is inactive} \tag{5}$$

$$\text{IF } \Delta H \leq 0.58 \text{ OR } \eta H \geq -0.54 \text{ THEN molecule is active} \tag{6}$$

These critical values (in equations 5 and 6) were obtained from an automatic screening search that determine the best statistical relevance of these numbers.

With these two descriptors and EIM simple rules for AM1 data it was possible to reproduce the experimental activity (active or inactive) with 100% of accuracy. For PM3 calculation the rules achieved ~93% of accuracy, only molecule 11 was incorrectly classified.

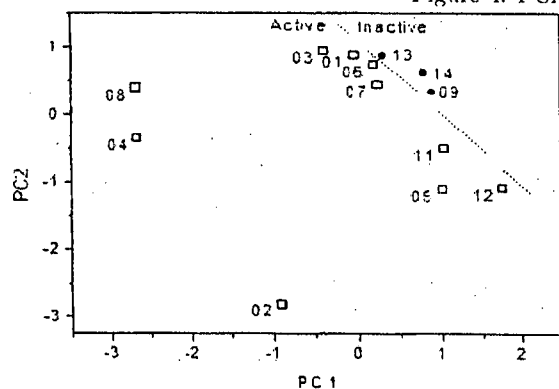
Table 3: EIM descriptors calculated from both AM1 and PM3 methods. Molecules are presented according to their K_{sens} values [27].

Molecule	$K_{sens} \times 10^3$	AM1			PM3	
		ΔH	ηH		ΔH	ηH
13	8.5	0.98	1.42	Inactive	0.64	-0.56
14	70.0	0.89	1.39		0.93	-0.56
09	76.0	0.76	1.39		0.59	-0.63
12	130.0	0.18	1.26		0.282	1.23
04	145.0	0.94	-0.59	Active	0.465	-0.72
02	190.0	0.11	-1.38		0.194	-1.28
10	250.0	0.86	1.33		0.50	-0.71
11	250.0	0.39	1.39		0.599	-0.63
05	350.0	0.12	1.33		0.311	1.29
01	600.0	0.99	1.38		0.581	-0.63
03	650.0	1.00	1.38		0.893	-0.53
07	950.0	0.81	1.33		0.575	-0.63
06	1100.0	0.94	1.34		0.465	-0.71
08	1450.0	1.18	-0.26		0.554	-0.63

The EIM results were then contrasted against the PCA methodology. For PCA analysis we considered a set of 25 parameters where electronic, physicochemical and stereochemical ones were included:

- ΔH
- ηH
- ΔL
- ηL
- Energy_{HOMO}
- Energy_{HOMO-1}
- Energy_{LUMO}
- Energy_{LUMO+1}
- LDOS (values from eigenstates HOMO, HOMO-1, LUMO, and LUMO+1)
- heat of formation
- surface area
- molecular volume
- hydration energy
- Log P

Figure 4: PCA - Scores from AM1 data.



- refractivity
- polarizability
- molecular mass
- electronic energy
- nuclear repulsion
- dipolar momentum
- ionization potential
- hardness.

Physicochemical variables frequently used in QSAR analysis have also been included in the calculations to evaluate the relevance of EIM descriptors. All the parameters were obtained from AM1 and PM3 calculations and PCA calculations have been carried out separately for them.

The data have been auto-scaled prior PCA analysis and we focused our attention on the two first principal components. The best results separating active and inactive compounds are presented in Figs. 4 and 5 to AM1 and PM3 descriptors, respectively.

Molecules in PCs planes are separated accordingly to the equations:

AM1

$$PC1 = -0.36(\Delta H) + 0.58(\eta H) + 0.74(\text{Log}P) \quad (7)$$

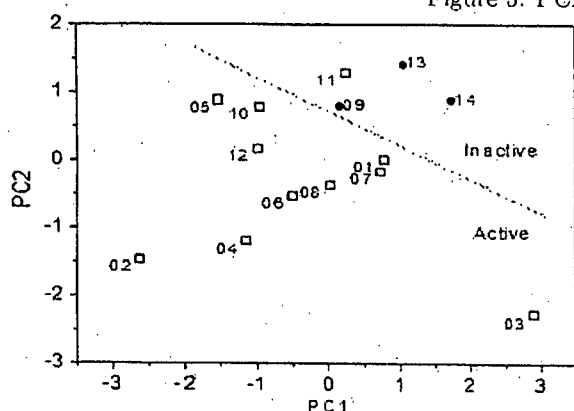
$$PC2 = +0.81(\Delta H) + 0.58(\eta H) - 0.06(\text{Log}P) \quad (8)$$

PM3

$$PC1 = +0.08(HOMO) + 0.66(\Delta H) - 0.42(HF) + 0.62(\eta H) \quad (9)$$

$$PC2 = +0.82(HOMO) + 0.04(\Delta H) + 0.54(HF) + 0.21(\eta H) \quad (10)$$

Figure 5: PCA - Score from PM3 data.



For AM1 and PM3 the PC1 vs PC2 plane accumulates a total variance of 87.26% and 80.71%, respectively.

From Figures 4 and 5 and equations 7, 8, 9, and 10 we can see which variables are statistically more relevant among all the others in the set investigated. With exception of LogP all other variables are electronic and related to the EIM descriptors. It is worth mentioning that during variables selection all variables were equally considered, no parameter scaling was used. In Fig. 4 a line delimiting the two classes of compounds was traced. For this case the molecules tend to agglomerate and the separation is not so clear. The results for PM3 data (Figure 5) show molecules more disperse and active and inactive groups separated. As already observed from EIM results, for the PM3 hamiltonian the molecule 11 was incorrectly classified as inactive.

These EIM and PCA results can be used together as an applicable and fast tool in the classification of new Tetracyclines. In this sense we propose a set of 90 new hypothetical TC to what experimental data is unknown. We then used the EIM rules from the available experimental data to classify (active/inactive) these new hypothetical structures.

3.3 New Proposed Tetracyclines

We considered the structures of molecules 01, 12, and 13 as our basic skeletons (T_α , T_β , and T_γ) to generate new hypothetical TC (Fig. 6, 7, and 8). Combining these skeletons with common TC substituents (Table 1), plus some 7A column elements of the periodic table it was possible to generate 90 synthesis feasible new TC derivatives. Table 4 presents the 30 combinations of the substituents considered for each skeleton. The new 90 compounds were labelled as 01 to 30, 31 to 60, and 61 to 90 for substituents of Table 4 in T_α , T_β and T_γ , respectively.

These new compounds were then geometrically optimized following the same conformational searches described in section 2 and for the global minima we similarly obtained the EIM parameters values (ΔH and ηH) from group $CONH_2$ bound to carbon 2 (Table 5) accordingly to equations 1 and 2. For these new compounds we considered only AM1 data, since the EIM results proved to be very similar using AM1 or PM3 and level of accuracy for AM1 was 100%.

We use the EIM rules derived from AM1 calculations (equation 5) to classify the new TC as active or inactive (table 5). As can be observed from Table 5, 25 compounds are classified as actives while the remaining 66 are classified as inactives.

Table 4: New proposed TC compounds. Labelling accordingly to Fig. 7 and 8.					
Structural set	R ₅	R ₆	R _{6'}	R ₇	R ₉
01	Br	H	H	H	H
02	Br	H	H	H	Br
03	H	H	H	H	Br
04	H	H	Br	H	H
05	H	H	H	Cl	H
06	Cl	H	H	H	H
07	Cl	H	H	H	Cl
08	H	H	Cl	H	H
09	H	OH	H	Br	H
10	H	OH	Me	Br	H
11	H	OH	H	I	H
12	H	OH	Me	I	H
13	H	OH	H	F	H
14	H	OH	Me	F	H
15	I	H	H	H	H
16	I	H	H	H	I
17	H	H	H	H	I
18	H	H	H	I	H
19	H	H	I	H	H
20	H	H	H	H	H
21	H	OH	Me	NH ₂	H
22	H	OH	Me	NO ₂	H
23	H	OH	Me	H	NH ₂
24	H	OH	Me	H	NO ₂
25	OH	OH	OH	OH	OH
26	OH	H	H	H	N(Me) ₂
27	H	OH	Me	H	N(Me) ₂
28	H	H	H	OH	N(Me) ₂
29	OH	H	H	H	NH ₂
30	OH	H	H	H	NO ₂

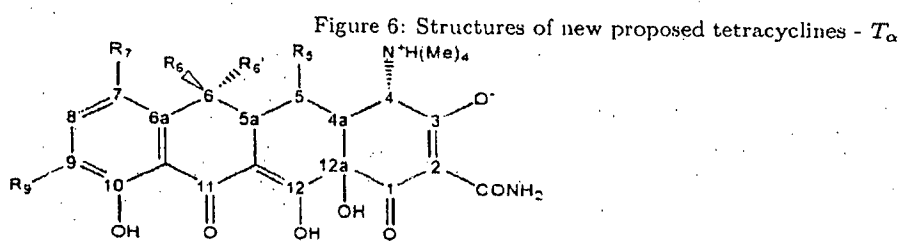
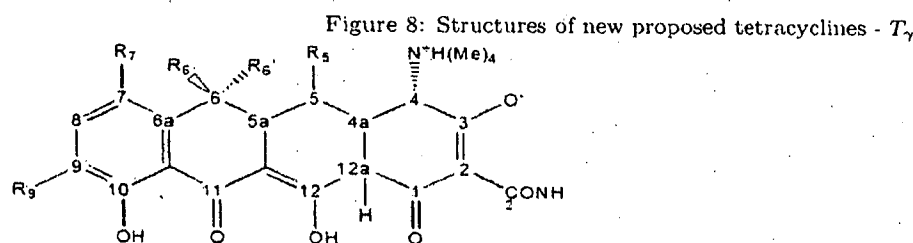
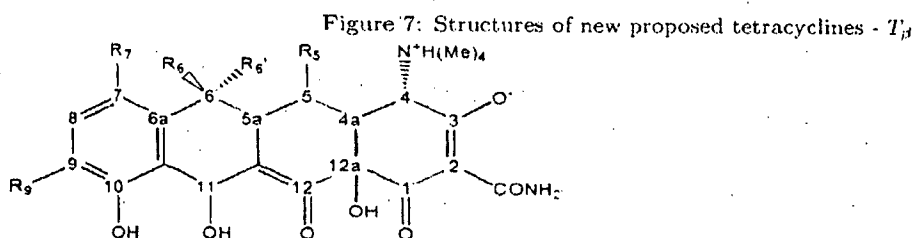


Table 5: EIM descriptors calculated to the new proposed TC and the proposed biological qualitative activity (QA).
I and A refer to the inactive and active, respectively.

Molecule	ΔH	ηH	QA	Molecule	ΔH	ηH	QA	Molecule	ΔH	ηH	QA
01	0.82	1.39	I	31	0.80	1.39	I	61	0.84	1.42	I
02	0.80	1.39	I	32	0.90	1.39	I	62	0.83	1.42	I
03	0.86	1.39	I	33	0.93	1.39	I	63	0.87	1.42	I
04	0.93	1.39	I	34	0.87	1.39	I	64	0.95	1.42	I
05	0.83	1.39	I	35	0.84	1.39	I	65	0.84	1.42	I
06	0.82	1.39	I	36	0.81	1.39	I	66	0.84	1.42	I
07	0.76	1.39	I	37	0.89	1.39	I	67	0.78	1.42	I
08	0.96	1.39	I	38	0.89	1.39	I	68	0.97	1.42	I
09	1.13	1.23	A	39	1.04	1.39	I	69	1.00	1.42	I
10	0.93	1.39	I	40	0.91	1.39	I	70	0.94	1.42	I
11	1.04	1.38	A	41	1.03	1.39	I	71	1.05	1.41	I
12	0.97	1.39	I	42	0.94	1.39	I	72	0.98	1.42	I
13	0.91	1.39	I	43	0.93	1.39	I	73	0.91	1.42	I
14	0.84	1.39	I	44	0.84	1.39	I	74	0.86	1.42	I
15	0.82	1.39	I	45	0.79	1.39	I	75	0.84	1.42	I
16	0.86	1.39	I	46	0.90	1.39	I	76	0.88	1.42	I
17	0.91	1.39	I	47	0.93	1.39	I	77	0.92	1.42	I
18	0.94	1.39	I	48	0.92	1.39	I	78	0.95	1.42	I
19	0.90	1.39	I	49	0.85	1.39	I	79	0.92	1.42	I
20	0.78	1.39	I	50	0.81	1.39	I	80	0.79	1.42	I
21	0.05	1.39	A	51	0.16	1.39	A	81	0.08	1.42	A
22	1.18	-0.26	A	52	1.02	1.39	I	82	1.23	0.28	A
23	0.26	1.39	A	53	0.43	1.39	A	83	0.28	1.43	A
24	1.17	-0.50	A	54	1.19	-0.55	A	84	1.22	-0.44	A
25	0.68	1.39	I	55	0.83	1.39	I	85	0.73	1.43	I
26	0.85	1.39	I	56	0.86	1.39	I	86	0.85	1.42	I
27	0.03	1.39	A	57	0.19	1.40	A	87	0.25	1.43	A
28	0.13	-1.39	A	58	0.03	1.39	A	88	0.04	1.42	A
29	0.17	1.39	A	59	0.34	1.39	A	89	0.22	1.43	A
30	1.16	-0.38	A	60	1.17	1.33	A	90	1.22	-0.19	A



The EIM and PCA methodologies consider the investigation of the correlation of theoretical descriptors with biological experimental data through linear combinations of variables. To verify the behavior of EIM descriptors (data from Table 3) in non linear correlations with experimental data we performed property-activity relationship searches using Artificial Neural Network methodology (ANN) [43, 44].

For ANN investigations we considered the 14 molecules studied in section III-A as the training group and the EIM parameters as network variables. In this training pattern we required the interactions precision of 10^{-5} and a 3×10^5 of interactions. In Table 6 we present the parameters used in ANN calculations, where α is a nonlinearity parameter of sigmoid functions of neurons in the second and third neuron's layer, θ is a threshold neuron parameter in a second and third layers, and ϵ is a constant weight mixing the weight matrix between recursive cycles.

In Table 7 we present the results for the training with the 14 molecules. The input data was set as class 1 to active molecules (1.000 0.000 - pattern) and class 2 to inactive molecules (0.000 1.000 - pattern). The columns four and five present the output values of training compared to the 0.000 and 1.000 values of input. We can observe that output values are very close to input, indicating a good training of the network. This good learning was achieved with precision parameters in cycle 242,477.

In Table 8 we present the results of the ANN classification, classes 1 and 2 correspond to active and inactive compounds, respectively. For comparison the EIM classification is also displayed. The results of EIM and ANN are

Table 6: Parameters of ANN for training pattern.

Layer	Neurons	α	θ	ϵ
1	3			
2	20	3.0	0.0	0.2
3	2	3.0	0.0	0.2

Table 7: Input and output pattern of ANN training using EIM index of AM1 calculations of table 3.

No.	Training Pattern	Output Training	Class
01	1.000 0.000	0.996 0.004	1
02	1.000 0.000	1.000 0.000	1
03	1.000 0.000	1.000 0.000	1
04	1.000 0.000	1.000 0.000	1
05	1.000 0.000	1.000 0.000	1
06	1.000 0.000	1.000 0.000	1
07	1.000 0.000	0.997 0.003	1
08	1.000 0.000	1.000 0.000	1
10	1.000 0.000	1.000 0.001	1
11	1.000 0.000	1.000 0.000	1
12	1.000 0.000	1.000 0.000	1
09	0.000 1.000	0.000 1.000	2
13	0.000 1.000	0.005 0.995	2
14	0.000 1.000	0.003 0.997	2

in very good agreement. Only 6 compounds (11, 12, 39, 41, 52, and 71) out of ~90% (agreement) present conflictive classification. Interestingly all these 6 molecules are classified as active by ANN and inactive ones by EIM, which seem to have more restrictive conditions for active classification.

Finally, it is interesting to note the role played by substituents in the biological behavior of the new set of tetracyclines. According to our qualitative analysis the main substitution requirement for biological activity is the presence of NH_2 or NO_2 or dialkylamino groups at C7 and/or C9. Even for non-active derivative 13 (Table I) the presence of these substituents classifies as active new compounds 81-84 and 87-90 (Table VIII). Despite the whole molecular skeleton composed of 4 fused rings and the integrity of the ring A, the rest of the molecule including position C5 and C6 just plays minor role on the biological activity of tetracyclines.

4 Summary and Conclusions

In this work we applied the EIM methodology in the classification of activity of 14 derivatives of the Tetracycline and in the predictive classification of the activity of 90 hypothetical new derivatives. Our results showed that the EIM results are not method dependent indicating that the classification of activity of Tetracyclines is reproducible for different semiempirical methods. In comparison with conventional physicochemical descriptors the importance of EIM descriptors is reinforced by PCA and ANN methodologies. The rules constructed with EIM, PCA and ANN methods reproduced the experimental data with 100%, 96% and 100% of accuracy, respectively. For the new 90 derivatives proposed EIM and ANN are in good agreement with a percentage of 93% consistent classification. These results add to increasing data of EIM studies indicating the pure quantum electronic indices can be reliably used to classify the biological activity of large number of different classes of materials.

We hope the present study estimate further experimental studies for tetracyclines in order to try to produce new antibiotic compounds.

Table 8: Results of the ANN prediction to the new TC compounds using only EIM parameters. Classes 1 and 2 indicate active and inactives compounds respectively

ANN				EIM				ANN				EIM			
No.	Predict		Class	Class	No.	Predict		Class	Class	No.	Predict		Class	Class	
1	0.002	0.998	2	2	31	0.001	0.999	2	2	61	0.000	1.000	2	2	
2	0.001	0.998	2	2	32	0.017	0.983	2	2	62	0.000	1.000	2	2	
3	0.001	0.999	2	2	33	0.015	0.986	2	2	63	0.000	1.000	2	2	
4	0.044	0.950	2	2	34	0.001	0.999	2	2	64	0.000	1.000	2	2	
5	0.001	0.999	2	2	35	0.000	0.999	2	2	65	0.000	1.000	2	2	
6	0.002	0.998	2	2	36	0.001	0.999	2	2	66	0.000	1.000	2	2	
7	0.001	0.999	2	2	37	0.007	0.993	2	2	67	0.000	1.000	2	2	
8	0.383	0.633	2	2	38	0.002	0.998	2	2	68	0.000	1.000	2	2	
9	1.000	0.000	1	1	39	1.000	0.000	1	2	69	0.087	0.911	2	2	
10	0.066	0.938	2	2	40	0.005	0.995	2	2	70	0.000	1.000	2	2	
11	1.000	0.000	1	1	41	1.000	0.000	1	2	71	1.000	0.000	1	2	
12	0.924	0.080	1	2	42	0.032	0.970	2	2	72	0.002	0.998	2	2	
13	0.016	0.984	2	2	43	0.021	0.980	2	2	73	0.000	1.000	2	2	
14	0.001	0.999	2	2	44	0.001	0.999	2	2	74	0.000	1.000	2	2	
15	0.002	0.998	2	2	45	0.001	0.999	2	2	75	0.000	1.000	2	2	
16	0.005	0.995	2	2	46	0.015	0.985	2	2	76	0.000	1.000	2	2	
17	0.007	0.993	2	2	47	0.015	0.986	2	2	77	0.000	1.000	2	2	
18	0.138	0.870	2	2	48	0.004	0.996	2	2	78	0.000	1.000	2	2	
19	0.006	0.994	2	2	49	0.001	0.999	2	2	79	0.000	1.000	2	2	
20	0.000	1.000	2	2	50	0.000	1.000	2	2	80	0.000	1.000	2	2	
21	1.000	0.000	1	1	51	1.000	0.000	1	1	81	1.000	0.000	1	1	
22	1.000	0.000	1	1	52	1.000	0.000	1	2	82	1.000	0.000	1	1	
23	1.000	0.000	1	1	53	1.000	0.000	1	1	83	1.000	0.000	1	1	
24	1.000	0.000	1	1	54	1.000	0.000	1	1	84	1.000	0.000	1	1	
25	0.004	0.995	2	2	55	0.001	0.999	2	2	85	0.000	1.000	2	2	
26	0.002	0.998	2	2	56	0.001	0.999	2	2	86	0.000	1.000	2	2	
27	1.000	0.000	1	1	57	1.000	0.000	1	1	87	1.000	0.000	1	1	
28	1.000	0.000	1	1	58	1.000	0.000	1	1	88	1.000	0.000	1	1	
29	1.000	0.000	1	1	59	1.000	0.000	1	1	89	1.000	0.000	1	1	
30	1.000	0.000	1	1	60	1.000	0.000	1	1	90	1.000	0.000	1	1	

5 Acknowledgements

This work has been supported by the Brazilian agency FAPESP and also thanks to CAPES, CNPq, FAPEMIG, and IMMP.

References

- [1] S. B. Levy. S. B.; The Antibiotic Paradox: How Miracle Drugs are Destroying the Miracle. 1992. Plenum Press, New York.
- [2] Roberts, M. C.; Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 19, 1-24.
- [3] Humbert, P.; Treffel, P.; Chapuis, J. F.; Buchet, S.; Derancourt, C.; Agache, P. The tetracyclines in dermatology. *Journal of The American Academy of Dermatology*, 1991, 25, 691-697.
- [4] Lertvorachon, J.; Kim, J. P.; Soldatov, D. V.; Boyd, J.; Roman, G.; Cho, S. J.; Popek, T.; Jung, Y. S.; Luan, P. C. K.; Konishia, Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13, 4627-4637. 1,12-Substituted tetracyclines as antioxidant agents.
- [5] Fife, R. S.; Sledge Jr., G. W.; Roth, B. J.; Proctor, C. Effects of doxycycline on human prostate cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, 1998, 127, 37-41.
- [6] Eckhardt, S. G.; Hidalgo, M. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, 93, 178-193.
- [7] Levy, S. B.; McMurphy, L. M.; Barbosa, T. M.; Burdett, V.; Courvalin, P.; Hillen, W.; Roberts, M. C.; Rood, J. I.; Taylor, D. E. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1999, 43, 1523-1524.
- [8] Roberts, M. C. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 245, 195-203. Update on acquired tetracycline resistance genes.
- [9] G. Sengelov, B. Halling-Sorensen, and F. M. Aarestrup. *Veterinary Microbiology*, 95:91-101, 2003. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals.
- [10] Levy, S. B.; Hedges, R. W.; Sullivan, F.; Medeiros, A. A.; Sosroseputro, H. Multiple antibiotic-resistance plasmids in enterobacteriaceae isolated from diarrheal specimens of hospitalized children in indonesia. *J. Antimicrob. Chemother*, 1985, 16, 7-16.
- [11] Jones, C. S.; Osborne, D. J.; Stanley, J. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol. Cell Probes*, 1992, 6, 313-317. P. M. V. B.
- [12] Chartone-Souza, E.; Loyola, T. L.; Bucciarelli-Rodriguez, W.; Menezes, M. A. D.; Rey, N. A.; Pereira-Mala, E. C. Synthesis and characterization of a tetracycline-platinum (ii) complex active against resistant bacteria. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, 99, 1001-1008.
- [13] Oliva, B.; Chopra, I. Tet determinants provide poor protection against some tetracyclines - further evidence for division of tetracyclines into 2 classes. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1992, 36, 876-878.

- [14] Halling-Sorensen, B.; Sengelov, G.; Tornelund, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, 42, 263-271.
- [15] Cosentino, U.; Var, M. R.; Saracino, A. A. G.; Pitea, D.; Moro, G.; Salmona, M. Tetracycline and its analogues as inhibitors of amyloid fibrils: searching for geometrical pharmacophore by theoretical investigation of their conformational behavior in aqueous solution. *J. Mol. Model.* **2005**, 11, 17-25.
- [16] Othersen, O. G.; Beierlein, F.; Lanig, H.; Clark, T. Conformations and tautomers of tetracycline. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 13743-13749.
- [17] Lambs, L.; Decock-Le Reverend, B.; Kozlowski, H.; Berthon, G. Metal ion-tetracycline interactions in biological-fluids .9. circular-dichroism spectra of calcium and magnesium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and chlortetracycline and discussion of their binding modes. *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 3001-3012.
- [18] Lambs, L.; Berthon, G. Metal-ion tetracycline interactions in biological-fluids .7. quantitative investigation of methacycline complexes with Ca(II) , Mg(II) , Cu(II) and Zn(II) ions and assessment of their biological significance. *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, 151, 33-43.
- [19] Brion, M.; Lambs, L.; Berthon, G. Metal ion-tetracycline interactions in biological-fluids .6. formation of copper(II) complexes with tetracycline and some of its derivatives and appraisal of their biological significance. *Inorg. Chim. Acta*, **1986**, 123, 61-68.
- [20] Lambs, L.; Brion, M.; Berthon, G. Metal-ion tetracycline interactions in biological-fluids .4. potential influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions on the bioavailability of chlortetracycline and demethylchlortetracycline, as expected from their computer-simulated distributions in blood-plasma. *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, 106, 151-158.
- [21] Bi, S. Y.; Song, D. Q.; Tian, Y.; Zhou, X.; Liu, X. Y.; Zhang, H. Q. Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins. *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2005**, 61, 629-636.
- [22] Baptiste, D. C.; Hartwick, A. T. E.; Jollimore, C. A. B.; Baldrige, W. H.; Seigel, G. M.; Kelly, M. E. M. An investigation of the neuroprotective effects of tetracycline derivatives in experimental models of retinal cell death. *Molecular Pharmacology*, **2004**, 66, 1113-1122.
- [23] Nicolas, I.; Vilchis, M.; Aragon, N.; Miranda, R.; Hojer, G.; Castro, M. Theoretical study of the structure and antimicrobial activity of horminone. *International Journal of Quantum Chemistry*, **2003**, 93, 411-421.
- [24] Zerner, M. C.; dos Santos, H. F.; de Almeida, W. B. Conformational analysis of the anhydrotetracycline molecule: A toxic decomposition product of tetracycline. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1988**, 87, 190-195.
- [25] Belletato, P.; de Almeida, W. B.; dos Santos, H. F.; Nascimento, C. S. The conformational and tautomeric equilibrium of 5a,6-anhydrotetracycline in aqueous solution at pH 7. *J. Mol. Structure-Theochem*, **2003**, 626, 305-319.
- [26] de Miranda, C. F.; Costa, L. A. S.; de Almeida, W. B.; dos Santos, H. F.; Macial, B. L. Structure and properties of the 5a,6-anhydrotetracycline platinum(II) dichloride complex: A theoretical ab initio study, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2006**, 100(10), 1594-1605.

- [27] Peradejordi, F.; Martin, A. N.; Cammarata, A. Quantum chemical approach to structure-activity relationships of tetracycline antibiotics, *Journal of Pharmaceutical Science*, **1971**, 60(4), 576.
- [28] Dewar, M. J. S.; Zoebish, E.G.; Healy, E.F.; Stewart, J. J. P. The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 - A new general-purpose quantum-mechanical molecular-model, *Journal American Chememical Society*, **1985**, 107, 3092-3909.
- [29] Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods .1. method, *J. Comp. Chem*, **1989**, 10(2), 209-220.
- [30] Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods .2. Applications, *J. Comp. Chem.*, **1989**, 10(2), 221-264. MOPAC program, version 6.0 Quantum Chemistry Exchange Program No. 455.
- [31] Zerner, M.C. Reviews in Computational Chemistry, VCH, New York, 1991, 313-365. Semiempirical molecular orbital methods, in: K.B. Lipkowitz, D.B. Boyd (Eds.).
- [32] Paniago, E. B.; Tosi, L.; Beraldo, H.; de Siqueira, J. M.; CARvalho, S. Metal-complexes of anhydrotetracycline .1. A spectrometric study of the Cu(II) and Ni(II) Complexes, *J. Pharm. Sci.*, **1994**, 83, 291-295.
- [33] GarnierSuillerot, A.; Beraldo, H.; Machado, F. C.; Demicheli. C. Metal-complexes of anhydrotetracycline .2. absorption and circular-dichroism study of Mg(ii), Al(iii), and Fe(iii) complexes - Possible influence of the Mg(ii) complex on the toxic side-effects of Tetracycline, *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, 60, 163-173.
- [34] Beraldo, H.; Matos, S. V. D. M. Metal-complexes of anhydrotetracycline .3. An absorption and circular-dichroism study of the Ni(ii), Cu(ii) and Zn(ii) complexes in aqueous-solution, *J. Braz. Chem. Soc.*, **1995**, 6(4), 405-411.
- [35] M. Cyrillo, M.; Galvao, D. S. Structure-activity relationship study of some inhibitors of HIV-1 integrase, *J. Mol. Structure-Theochem*, **1999**, 464(1-3), 267-272.
- [36] Santo, L. L. D.; Galvao, D. S. Structure-activity study of indolequinones bioreductive alkylating agents, *J. Mol. Structure-Theochem*, **1999**, 464(1-3), 273-279.
- [37] Barone, P. M. V. B.; Camilo Jr, A.; Galvao, D. S. Theoretical approach to identify carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Phys. Rev. Lett.*, **1996**, 77, 1186-1189.
- [38] Braga, R. S.; Vendrame, R.; Galvao, D. S. Structure-activity relationship studies of substituted 17 alpha-acetoxypregesterone hormones, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **2000**, 40(6), 1377-1385.
- [39] Braga, S. F.; Galvao, D. S. Benzo[c]quinolizin-3-ones theoretical investigation: SAR analysis and application to nontested compounds, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **2004**, 44(6), 1987-1997.
- [40] Troche, K. S.; Braga, S. F.; Coluci, V. R.; Galvao, D. S. Carcinogenic classification of polycyclic aromatic hydrocarbons through theoretical descriptors, *International Journal of Quantum Chemistry*, **2005**, 103(5), 718-730.
- [41] Braga, S. F.; Galvao, D. S. A structure - Activity study of taxol, taxotere, and derivatives using the electronic indices methodology (EIM), *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **2003**, 43(2), 699-706.
- [42] Einsight 3.0. 1991. Infometrix, Inc 2200. Sixth Avenue, Suite 833, Seattle WA, 98121.

- [13] H. Ichikawa. 1991. PSDD: Perceptron-type Neural Network Simulator, QCPE 615, Indiana, USA.
- [44] Ayoama, T.; Suzuki, Y.; Ichikawa, H. Neural networks applied to pharmaceutical problems .1. method and application to decision-making, *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37(9), 2558-2560.