

**ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL**  
(FOR EVALUATION OF THE ACT DOCTORAL THESIS)

Año académico (academic year): 2016/17

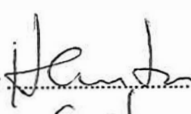
DOCTORANDO (candidate PHD): **TORO LONDOÑO, MIGUEL**  
D.N.I./PASAPORTE (Id.Passport): **\*\*\*\*2619N**  
PROGRAMA DE DOCTORADO (Academic Committee of the Programme): **D345 DOCTORADO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR**  
DEPARTAMENTO DE (Department): **BIOLÓGIA DE SISTEMAS**  
TITULACIÓN DE DOCTOR EN (Phd title): **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 30/06/17, reunido el tribunal de evaluación, constituido por los miembros que suscriben el presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral **con Mención Internacional** (In today assessment met the court, consisting of the members who signed this Act, the candidate defended his doctoral thesis with mention as International Doctorate), elaborada bajo la dirección de (prepared under the direction of) ANTONIO JIMÉNEZ RUIZ // FEDERICO GAGO BADENAS.

Sobre el siguiente tema (Title of the doctoral thesis): **DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DIRIGIDOS A LA INTERFAZ DE DIMERIZACIÓN DE LA TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE LEISHMANIA INFANTUM**

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>3</sup> de **(no apto, aprobado, notable y sobresaliente)** (After the defense and defense of the thesis, the court agreed to grant the GLOBAL RATING (fail, pass, good and excellent): excelente, sobresaliente

Alcalá de Henares, a 30 de junio de 2017

Fdo. (Signed):   
Helena Castro

FIRMA DEL ALUMNO (candidate's signature),

Fdo. (Signed):   
Luis Rivas

Fdo. (Signed):   
SANTIAGO RAMÓN

Fdo. (Signed):   
Miguel Toro

Con fecha 24 de julio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



<sup>3</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad. (The grade may be "fail" "pass" "good" or "excellent". The panel may confer the distinction of "cum laude" if the overall grade is "Excellent" and has been awarded unanimously as such after secret voting.)

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:  
(Incidents

/

Comments)

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *TORO LONDOÑO, MIGUEL*, el día 30 de junio de 2017, titulada *DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DIRIGIDOS A LA INTERFAZ DE DIMERIZACIÓN DE LA TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE LEISHMANIA INFANTUM*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado resuelve otorgar a dicha tesis la

***MENCIÓN "CUM LAUDE"***

Alcalá de Henares, 27 julio de 2017  
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS  
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO  
PEREZ JUAN RAMON - DNI  
03087239H  
Fecha: 2017.07.30 19:03:12 +02'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: TORO LONDOÑO, MIGUEL

Secretario del Tribunal: SANTIAGO RAMÓN MAIQUES.

Directores de Tesis: ANTONIO JIMÉNEZ RUIZ // FEDERICO GAGO BADENAS



Universidad  
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO  
Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo  
presentado la misma en formato:  soporte electrónico  impreso en papel, para el depósito de la  
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: \_\_\_\_\_ se procede, con  
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

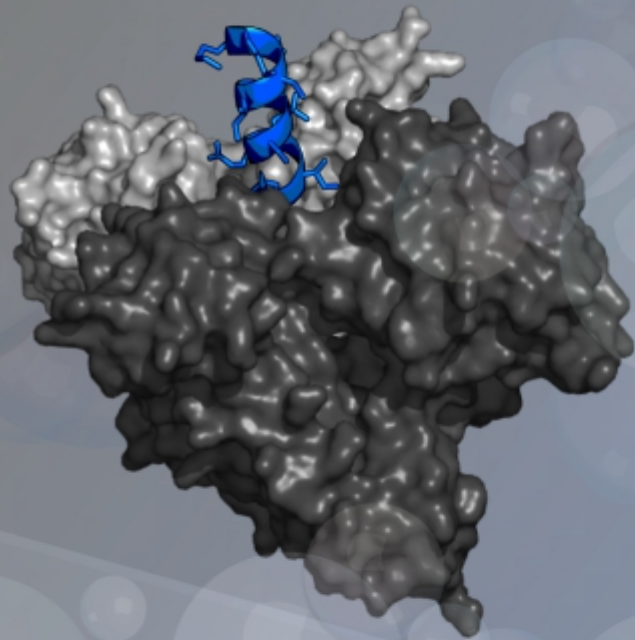
Alcalá de Henares a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



Fdo. El Funcionario

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE  
INHIBIDORES PEPTÍDICOS DIRIGIDOS  
A LA INTERFAZ DE DIMERIZACIÓN DE  
LA TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE  
*Leishmania infantum***

Miguel Ángel Toro Londoño





Programa de Doctorado en Señalización Celular

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS  
DIRIGIDOS A LA INTERFAZ DE DIMERIZACIÓN DE LA  
TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE  
*Leishmania infantum*

Tesis Doctoral Presentada por

MIGUEL ÁNGEL TORO LONDOÑO

2017



Programa de Doctorado en Señalización Celular

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS  
DIRIGIDOS A LA INTERFAZ DE DIMERIZACIÓN DE LA  
TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE  
*Leishmania infantum*

Tesis Doctoral Presentada por

MIGUEL ÁNGEL TORO LONDOÑO

Directores

DR. ANTONIO JIMÉNEZ RUIZ

&

DR. FEDERICO GAGO BADENAS

Alcalá de Henares, 2017

**Antonio Jiménez Ruiz**, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y **Federico Gago Badenas**, Catedrático de Universidad del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Alcalá

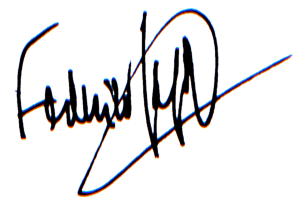
INFORMAN:

Que D. Miguel Ángel Toro Londoño ha realizado la Tesis Doctoral titulada “**Diseño y evaluación de inhibidores peptídicos dirigidos a la interfaz de dimerización de la Tripanotión Reductasa de *Leishmania infantum***” bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología de Sistemas, dentro del programa de Doctorado “Señalización Celular” de la Universidad de Alcalá y, a nuestro juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 25 de Abril de 2017



Antonio Jiménez Ruiz



Federico Gago Badenas



**Antonio Jiménez Ruiz**, Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que D. Miguel Ángel Toro Londoño ha realizado la Tesis Doctoral titulada “**Diseño y evaluación de inhibidores peptídicos dirigidos a la interfaz de dimerización de la Tripanotión Reductasa de *Leishmania infantum***” bajo la dirección de los doctores Antonio Jiménez Ruiz y Federico Gago Badenas en el Departamento de Biología de Sistemas, dentro del programa de Doctorado “Señalización Celular” de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 25 de Abril de 2017



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de manera muy especial al Dr. Antonio Jiménez Ruiz por su paciencia y apoyo. Sin su constancia y dedicación, la finalización de este trabajo no habría sido posible. También quisiera agradecer de manera muy sincera al Dr. Federico Gago Badenas, al Dr. Juan Fernando Alzate Restrepo, a la Dra. Sonsoles Velázquez, a la Dra. María José Camarasa y al Dr. Ger van Zandbergen. Para finalizar, pero no menos importante, quisiera agradecer a cada una de las personas de Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, que de manera directa o indirecta me ayudaron y acogieron durante mi estancia en este bello país.

También quisiera agradecer a los autores de los siguientes trabajos doctorales y a todas las personas implicados en ellos:

### **Estrategias Celulares Y Moleculares En El Cribado De Nuevos Agentes Anti-*Leishmania***

*Dr. David Moreno-Mateos*

### **Interacciones Proteína-Proteína Como Diana Terapéutica En La Transcriptasa Inversa Del VIH-1 Y En La Tripanotión Reductasa De *Leishmania infantum*.**

*Dr. Pedro Alejandro Sánchez Murcia*

### **De Péptidos A Peptidomiméticos En La Búsqueda De Inhibidores Novedosos De La Tripanotión Reductasa De *Leishmania infantum* (Li-Tryr)**

*Dra. Marta Ruiz-Santa Quiteria Saavedra*

Gracias al desaparecido Ministerio de Ciencia e Innovación del Reino de España (actualmente Ministerio de Economía, Industria y Competitividad), por permitirme disfrutar de la beca con referencia BES-2010-035019, asociada al proyecto SAF2009-13914-C02-02 para poder realizar este trabajo. De igual manera quisiera agradecer a la Plataforma integrada de Bioinformática para el Descubrimiento de nuevos fármacos basados en la estructura del receptor (BIPEDD2) por la financiación facilitada durante el final de mi estancia. Referencia: S2010/BMD-2457

*A mi Mamita.*

*A Ana, Lina, Edwin y Cris.*

*“...all this science I don't understand,  
it's just my job five days a week...”*

**Rocket Man – Sir Elton Hercules John & Bernie Taupin**

# TABLA DE CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| Abreviaturas .....  | 1         |
| Nota sobre puntuación, abreviaturas, anglicismos y uso del lenguaje.....              | 6         |
| Resumen .....   | 7         |
| Abstract.....   | 8         |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.1 Leishmaniosis .....</b>  | <b>14</b> |
| 1.1.1 Generalidades de <i>Leishmania spp.</i> y su ciclo de vida .....                | 16        |
| 1.1.2 Tratamiento de la Leishmaniosis .....   | 19        |
| 1.1.2.1 Antimonio Pentavalente .....  | 20        |
| 1.1.2.2 Anfotericina B.....   | 20        |
| 1.1.2.3 Miltefosina .....   | 21        |
| 1.1.2.4 Paramomicina.....   | 21        |
| 1.1.2.5 Pentamidina.....  | 21        |
| 1.1.2.6 Otros tratamientos .....  | 21        |
| <b>1.2 Biología Celular, Molecular y Bioquímica de <i>Leishmania</i> .....</b>        | <b>23</b> |
| 1.2.1 Metabolismo de <i>Leishmania spp.</i> .....                                     | 25        |
| 1.2.1.1 Vía de las pentosas fosfato (VPP).....  | 26        |
| 1.2.1.2 Síntesis del tripanotión.....   | 28        |
| 1.2.1.3 Relevancia biológica del Tripanotión .....                                    | 31        |
| <b>1.3 Tripanotión Reductasa .....</b>  | <b>32</b> |
| 1.3.1 Generalidades .....   | 32        |
| 1.3.2 Sitio Activo.....   | 34        |
| 1.3.3 Dominio de Unión al FAD y Dominio Central.....                                  | 36        |
| 1.3.4 Dominio de Unión al NADPH .....   | 37        |
| 1.3.5 Dominio de la Interfaz de Dimerización .....                                    | 37        |
| 1.3.6 Estado de oxidación de la TryR y Ciclo Catalítico.....                          | 39        |
| 1.3.7 Contexto biológico del sistema Tripanotión/TryR en <i>Leishmania spp.</i> ..... | 40        |
| <b>1.4 La Tripanotión Reductasa como Diana Terapéutica.....</b>                       | <b>43</b> |
| 1.4.1 Derivados Tricíclicos y de Disulfuro de Difenilo .....                          | 44        |
| 1.4.2 Compuestos bicíclicos y heterocíclicos.....                                     | 44        |
| 1.4.3 Derivados de poliaminas.....  | 46        |
| 1.4.4 Sustratos subversivos.....  | 47        |
| 1.4.5 Inhibidores irreversibles.....  | 48        |
| 1.4.6 Compuestos organometálicos .....  | 49        |
| 1.4.7 La interfaz de dimerización: la diana inexplorada.....                          | 49        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1.5</b> | <b>Proteínas diméricas y la interfaz de dimerización como diana terapéutica. ....</b>                            | <b>51</b> |
| 1.5.1      | Propiedades de las interfaces de dimerización .....  | 52        |
| 1.5.2      | Modelos de plegado de las proteínas diméricas .....  | 54        |
| 1.5.3      | Evolución de las proteínas diméricas.....  | 57        |
| 1.5.4      | Inhibición de la dimerización .....  | 58        |
| 1.5.5      | Estudios computacionales en proteínas diméricas .....  | 59        |
| 1.5.5.1    | Identificación de puntos calientes (hot spots).....  | 60        |
| 1.5.5.2    | Determinación de los bolsillos de unión para los inhibidores.....  | 61        |
| 1.5.5.3    | Diseño de inhibidores.....   | 62        |
| 1.5.6      | Inhibidores Peptídicos y Peptidomiméticos .....  | 63        |
| 1.5.6.1    | Integrasa de VIH .....   | 63        |
| 1.5.6.2    | Proteasa de Herpesvirus .....  | 64        |
| 1.5.6.3    | Timidilato Sintasa de <i>L. casei</i> .....  | 64        |
| 1.5.6.4    | Triosa Fosfato Isomerasa de <i>P. falciparum</i> y <i>T. cruzi</i> .....   | 64        |
| 1.5.6.5    | Glutación Reductasa Humana.....  | 65        |
| 1.5.7      | Métodos para la detección de la disociación de proteínas diméricas .....   | 66        |
| 1.5.7.1    | Cromatografía de exclusión molecular (CEM) y centrifugación analítica de equilibrio de sedimentación (CAES)..... | 66        |
| 1.5.7.2    | Fluorescencia.....   | 66        |
| 1.5.7.3    | Resonancia de Plasmones (SPR) .....  | 67        |
| 1.5.7.4    | Cristalografía de Rayos X.....   | 67        |
| 1.5.7.5    | Estrategias Alternativas.....  | 68        |
| <b>1.6</b> | <b>Herramientas Bioquímicas para el Estudio de Inhibidores Enzimáticos .....</b>                                 | <b>70</b> |
| 1.6.1      | Más Allá de la Dosis-Respuesta. ....   | 72        |
| 1.6.2      | Modelos clásicos de inhibición (Inhibición Lineal) .....   | 73        |
| 1.6.2.1    | Inhibición Competitiva.....  | 73        |
| 1.6.2.2    | Inhibición Acompetitiva.....   | 74        |
| 1.6.2.3    | Inhibición No Competitiva (mixta) .....  | 74        |
| 1.6.3      | Inhibición Hiperbólica. ....   | 75        |
| 1.6.4      | Inhibición Tiempo-Dependiente.....   | 76        |
| 1.6.4.1    | Modelos de inhibición tiempo-dependientes .....  | 77        |
| 1.6.4.2    | Curvas de la inhibición tiempo-dependiente.....  | 80        |
| 1.6.5      | Tipos de inhibición tiempo dependiente.....  | 83        |
| 1.6.5.1    | Unión lenta reversible simple. ....  | 83        |
| 1.6.5.2    | Isomerización Enzimática .....   | 84        |
| 1.6.5.3    | Marcaje por afinidad / Inhibición dependiente del mecanismo .....  | 85        |
| 1.6.5.4    | Distinción entre los diversos tipos de inhibición de unión lenta .....   | 86        |
| 1.6.5.5    | Determinación de los valores de $K_I$ y $K_I^*$ .....  | 87        |
|            | <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>   | <b>89</b> |

|                                   |  |            |
|-----------------------------------|--|------------|
| 2.1                               | <b>Hipótesis</b> .....   | 90         |
| 2.2                               | <b>Objetivos</b> .....   | 90         |
| 2.2.1                             | Objetivo General.....  | 90         |
| 2.2.2                             | Objetivos Específicos.....   | 90         |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> ..... |  | <b>91</b>  |
| 3.1                               | <b>Reactivos</b> .....   | <b>92</b>  |
| 3.1                               | <b>Análisis Bioinformáticos</b> .....  | <b>92</b>  |
| 3.1.1                             | Reconstrucción filogenética.....   | 92         |
| 3.1.2                             | Dinámica Molecular, definición del farmacóforo y cribado virtual. ....                     | 92         |
| 3.1.3                             | Análisis de regresión no lineal ( <i>Curve Fitting</i> ) .....                             | 93         |
| 3.2                               | <b>Biología Molecular</b> .....  | <b>93</b>  |
| 3.2.1                             | Procedimientos Generales .....   | 93         |
| 3.2.2                             | Obtención de Proteínas Recombinantes .....   | 93         |
| 3.2.2.1                           | Tripanotión Reductasa HIS-HIS y HIS-FLAG (TryR HH y TryR HF) .....                         | 93         |
| 3.2.2.2                           | Tripanotión Reductasa para cristalización. ....  | 95         |
| 3.2.2.3                           | Proteasa 3c de Rhinovirus.....   | 96         |
| 3.2.2.4                           | Glutación Reductasa Humana.....  | 97         |
| 3.3                               | <b>Ensayo de Actividad de la Tripanotión Reductasa</b> .....                               | <b>97</b>  |
| 3.3.1                             | Ensayo General .....   | 97         |
| 3.3.2                             | Ensayo para calcular $CI_{50}$ .....   | 98         |
| 3.3.3                             | Ensayo para calcular $K_M$ y $V_{MAX}$ .....   | 99         |
| 3.3.4                             | Ensayo para calcular $K_I$ en la inhibición clásica.....                                   | 99         |
| 3.3.5                             | Ensayo para calcular $K_{obs}$ y demás parámetros en la inhibición tiempo dependiente. .99 |            |
| 3.3.6                             | Inhibición de TryR en Lisados de Parásitos .....   | 101        |
| 3.4                               | <b>Ensayo de Dimerización de Tripanotión Reductasa</b> .....                               | <b>101</b> |
| 3.4.1                             | Preparación de las Placas .....  | 101        |
| 3.4.2                             | Ensayo de Dimerización.....  | 102        |
| 3.5                               | <b>Ensayo de Actividad de la Glutación Reductasa</b> .....                                 | <b>103</b> |
| 3.6                               | <b>Estudios en Parásitos</b> .....   | <b>104</b> |
| 3.6.1                             | Microscopia Confocal .....   | 104        |
| 3.6.2                             | Obtención de macrófagos de cultivo primario.....   | 104        |
| 3.6.3                             | Infección de macrófagos con parásitos de <i>Leishmania</i> .....                           | 105        |
| 3.6.4                             | Internalización de los Péptidos Fluorescentes.....   | 105        |
| 3.7                               | <b>Ensayo de Precipitación de TryR</b> .....   | <b>105</b> |
| <b>RESULTADOS</b> .....           |  | <b>107</b> |
| 4.1                               | <b>Análisis Filogenético de la Tripanotión Reductasa.</b> .....                            | <b>108</b> |
| 4.1.1                             | Análisis de secuencia.....   | 108        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.1.2      | Análisis de dominios con MEME.....  | 111        |
| 4.1.3      | Reconstrucción filogenética de la Tripanotión Reductasa.....  | 112        |
| <b>4.2</b> | <b>Producción y Caracterización de la Tripanotión Reductasa Recombinante de <i>Leishmania infantum</i>.....</b>       | <b>114</b> |
| 4.2.1      | Purificación de la TryR.....  | 114        |
| 4.2.1.1    | Cromatografía de Exclusión Molecular.....   | 114        |
| 4.2.1.2    | Cromatografía de Intercambio Aniónico.....  | 115        |
| 4.2.2      | Producción de TryR para Cristalización.....   | 117        |
| 4.2.2.1    | Escisión del tag HIS de la TryR.....  | 118        |
| 4.2.2.2    | Cristales de TryR.....  | 119        |
| 4.2.3      | Caracterización de la TryR.....   | 120        |
| 4.2.3.1    | Estado de oxidación de la TryR.....   | 120        |
| 4.2.3.2    | Ensayo de actividad de la TryR.....   | 121        |
| 4.2.3.3    | El uso de NADP <sup>+</sup> en la reacción protege a la TryR.....   | 122        |
| 4.2.3.4    | Desarrollo y validación del ensayo de actividad TryR.....   | 125        |
| <b>4.3</b> | <b>Optimización del ensayo de dimerización.....</b>   | <b>126</b> |
| 4.3.1      | Antecedentes.....   | 126        |
| 4.3.2      | Obtención de TryR HF <i>in-vivo</i> .....   | 127        |
| 4.3.3      | Tapizado de las placas de poli-estireno con $\alpha$ -FLAG.....   | 128        |
| 4.3.4      | Concentración de TryR óptima para el ensayo de dimerización.....  | 130        |
| 4.3.5      | Validación del ensayo de dimerización usando el Péptido 3.....  | 131        |
| <b>4.4</b> | <b>Optimización del Péptido 3.....</b>  | <b>133</b> |
| 4.4.1      | Antecedentes.....   | 133        |
| 4.4.2      | Péptidos inhibitorios de la Tripanotión Reductasa.....  | 133        |
| 4.4.3      | TRL 14: El cambio del glutámico en la posición 2 del péptido por una lisina mejora las propiedades del Péptido 3..... | 134        |
| 4.4.4      | Estudio de TRL35 como inhibidor de la actividad enzimática de TryR.....   | 137        |
| 4.4.5      | La inhibición de la actividad oxido-reductasa de TryR por TRL35 va asociada a un proceso de desdimerización.....      | 139        |
| 4.4.6      | Simulaciones de dinámica molecular de TRL35 con TryR.....   | 140        |
| 4.4.7      | Escaneo de Alaninas: Identificación de nuevos <i>hot spots</i> en la interacción del péptido con TryR.....            | 141        |
| 4.4.8      | Exploración de la longitud mínima con capacidad inhibitoria mediante derivados de TRL35                               | 143        |
| 4.4.9      | Interacción de la Glutamina 5 de TRL35 con TryR.....  | 144        |
| 4.4.10     | El proceso de catálisis potencia la inhibición de TryR por TRL35.....   | 145        |
| <b>4.5</b> | <b>Efecto del TRL35 sobre la TryR endógena del parásito.....</b>  | <b>148</b> |
| 4.5.1      | Inhibición de la TryR silvestre en lisados de promastigotes de <i>L. infantum</i> .....                               | 148        |



|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.5.2      | Entrada del Péptido en amastigotes de <i>L. major (in-cellulo)</i> .....   | 149        |
| <b>4.6</b> | <b>Estabilización estructural de los péptidos lineales TRL23 (E2) y TRL35 (K2)..</b>                                 | <b>152</b> |
| 4.6.1      | Antecedentes.....  | 152        |
| 4.6.2      | Puentes Hidrocarbonados (“grapas”).....  | 153        |
| 4.6.2.1    | Diseño in silico de los péptidos hidrocarbonados.....  | 153        |
| 4.6.2.2    | Efecto de los puentes hidrocarbonados en los péptidos derivados de TRL23 (E2) sobre la dimerización de TryR.....     | 155        |
| 4.6.2.3    | Estudios de RMN y Dinámica Molecular.....  | 156        |
| 4.6.2.4    | Efecto de los puentes hidrocarbonados en los péptidos derivados de TRL35 (K2) sobre la dimerización de TryR.....     | 157        |
| 4.6.3      | Puentes Lactama.....   | 159        |
| 4.6.3.1    | Efecto de los puentes lactama en los péptidos derivados de TRL35 (K2) sobre la Actividad y Dimerización de TryR..... | 160        |
| 4.6.3.2    | Efecto del puente lactama en un péptido derivado de TRL23 (E2) sobre la Actividad y Dimerización de TryR.....        | 161        |
| 4.6.4      | Estabilidad proteolítica de los péptidos cíclicos.....   | 161        |
| <b>4.7</b> | <b>Definición de un farmacóforo basado en TRL38. ....</b>  | <b>164</b> |
| 4.7.1      | Uso del Farmacóforo para la Identificación de Moléculas Pequeñas con Capacidad Inhibitoria de TryR.....              | 164        |
| <b>4.8</b> | <b>Comparación de los Sistemas T(SH)<sub>2</sub>/TryR y GSH/GluR .....</b>   | <b>169</b> |
| 4.8.1      | Antecedentes.....  | 169        |
| 4.8.2      | Ensayo de Actividad Basado en DTNB.....  | 170        |
| 4.8.2.1    | Saturación de GSSG y NADPH de GluR utilizando el ensayo basado en DTNB.....  | 171        |
| 4.8.2.2    | Diferencias de la reacción acoplada a DTNB entre TryR y GluR.....  | 173        |
| 4.8.3      | Implementación del Ensayo Actividad de GluR por oxidación de NADPH. ....   | 176        |
| 4.8.3.1    | Saturación de GSSG y NADPH de GluR utilizando el ensayo basado en NADPH... ..  | 176        |
| 4.8.3.2    | K <sub>M</sub> para NADPH y GSSG de la Glutatión Reductasa Humana.....   | 177        |
| 4.8.3.3    | TRL 35 inhibe la TryR, pero no la GluR. ....   | 178        |
| <b>4.9</b> | <b>Caracterización de la Inhibición de TryR por TRL35.....</b>   | <b>180</b> |
| 4.9.1      | Antecedentes.....  | 180        |
| 4.9.2      | Modelo de Inhibición de la TryR .....  | 180        |
| 4.9.2.1    | Mepacrina.....   | 181        |
| 4.9.2.2    | TRL35.....   | 182        |
| 4.9.2.3    | Inhibición de unión lenta (tiempo-dependiente). ....   | 183        |
| 4.9.2.4    | Ensayo de Reversibilidad.....  | 189        |
| 4.9.2.5    | La inactivación irreversible de TryR por TRL35 es debida a la precipitación de la enzima                             | 191        |

## **DISCUSIÓN..... 193**

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>5.1</b> | <b>¿Por qué <i>Leishmania</i>? ¿Por qué Tripanotión Reductasa? .....</b> | <b>194</b> |
|------------|--|------------|

|   |   |            |
|---|---|------------|
| <b>5.2</b>  | <b>Análisis bioinformático de TryR: universalidad de Glu436, Gln439 y un presunto nuevo dominio.....</b>                            | <b>196</b> |
| <b>5.3</b>  | <b>Validación de los ensayos empleados.....</b>   | <b>196</b> |
| 5.3.1   | NADPH: ¿Regulador de la actividad TryR dentro del parásito?.....  | 196        |
| 5.3.2   | Dimerización: el beneficio del desarrollo <i>in-house</i> .....   | 197        |
| <b>5.4</b>  | <b>Optimización del péptido inhibitorio.....</b>  | <b>199</b> |
| 5.4.1   | Una lisina en posición 2 mejora más de 30 veces la actividad inhibitoria: generación de TRL35.....                                  | 199        |
| 5.4.2   | La inhibición de la actividad de la TryR por TRL35 está ligada a la desestabilización del estado dimérico de la enzima.....         | 201        |
| 5.4.3   | La actividad de TRL35 es dependiente de secuencia.....  | 202        |
| 5.4.4   | Acortamiento de TRL35: generación de TRL38.....   | 203        |
| <b>5.5</b>  | <b>Inhibición de la TryR silvestre: un proceso naturalmente complejo.....</b>   | <b>205</b> |
| 5.5.1   | Estabilización de la hélice $\alpha$ de TRL23 y TRL35: restricción de la estructura (pero también de la actividad).....             | 206        |
| 5.5.2   | De péptidos a moléculas pequeñas y la promiscuidad de TryR.....   | 208        |
| <b>5.6</b>  | <b>TryR y hGluR: Igualmente distintas.....</b>  | <b>209</b> |
| 5.6.1   | TRL35 discrimina entre TryR y hGluR.....  | 210        |
| <b>5.7</b>  | <b>TRL35 inhibe la TryR mediante un mecanismo no competitivo irreversible que causa la precipitación de la enzima inactiva.....</b> | <b>211</b> |
| <b>5.8</b>  | <b>Observaciones Finales.....</b>   | <b>212</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  |   | <b>214</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  |   | <b>217</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  |   | <b>245</b> |
| <b>ANEXO I – Genes y Proteínas Empleadas.....</b>                           |   | <b>246</b> |
|   | Tripanotión Reductasa H.....  | 247        |
|   | Tripanotión Reductasa F.....  | 249        |
|   | Glutación Reductasa Humana H.....   | 253        |
| <b>ANEXO II - Desarrollo y validación del ensayo de actividad TryR.....</b> |   | <b>255</b> |
|   | Determinación de las concentraciones saturantes de NADPH y TS <sub>2</sub> .....  | 256        |
|   | Determinación de los valores de K <sub>M</sub> para NADPH y TS <sub>2</sub> .....   | 256        |
|   | Mepacrina como control de inhibición de la actividad de TryR.....   | 257        |

**ANEXO III – Publicaciones.....260**

Artículo 1

Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides.

Artículo 2.

Comparison of hydrocarbon-and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase

Artículo 3

Novel Heteroaryl Selenocyanates and Diselenides as Potent Antileishmanial Agents

Artículo 4

First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent in vitro antileishmanial activity

## ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>1-C-Grxs</b>        | Monotiolglutaredoxinas  |
| <b>2-C-Grxs</b>        | Ditiol Glutaredoxinas   |
| <b>6-PGL</b>           | 6 Fosfogluconolactonasa   |
| <b>A</b>               | Alanina en secuencias aminoacídicas, Adenina en secuencias nucleotídicas o Absorbancia en ordenadas |
| <b>Å</b>               | Ångström  |
| <b>AdoMetDC</b>        | S-Adenosil-Metionina Descarboxilasa   |
| <b>ADP</b>             | Adenosín Difosfato  |
| <b>Ala</b>             | Alanina   |
| <b>AN</b>              | Numero de Acceso  |
| <b>Arg</b>             | Arginina  |
| <b>ARG</b>             | Arginasa  |
| <b>ASA</b>             | Área superficial accesible  |
| <b>Asn</b>             | Asparagina  |
| <b>Asp</b>             | Ácido Aspártico   |
| <b>ATP</b>             | Trifosfato de Adenosina   |
| <b>Au</b>              | Oro   |
| <b>AU</b>              | Unidades de Absorbancia   |
| <b>BTCP</b>            | Benzotiofeno-Piperidina   |
| <b>C</b>               | Cisteína en secuencias aminoacídicas, Citosina en secuencias nucleotídicas                          |
| <b>CAES</b>            | Centrifugación Analítica de equilibrio de sedimentación   |
| <b>CEM</b>             | Cromatografía de Exclusión molecular  |
| <b>CI<sub>50</sub></b> | Concentración inhibitoria 50  |
| <b>Cl</b>              | Cloro   |
| <b>cm</b>              | Centímetro  |
| <b>CSIC</b>            | Consejo Superior de Investigaciones Científicas   |
| <b>Cys</b>             | Cisteína  |
| <b>D</b>               | Ácido Aspártico   |
| <b>DB</b>              | <i>Database</i>   |
| <b>DBJ</b>             | <i>Data Bank Japan</i>  |
| <b>DMSO</b>            | Dimetil sulfóxido   |
| <b>DNA</b>             | Ácido Desoxirribonucleico   |
| <b>DTDA</b>            | Ditiodianilina  |
| <b>dTMP</b>            | Desoxitimidina monofosfato  |
| <b>DTNB</b>            | Ácido Dinitrobenzoico   |
| <b>dUMP</b>            | Desoxiuridina monofosfato   |
| <b>E</b>               | Ácido glutámico o Enzima  |
| <b>EI</b>              | Complejo Enzima-Inhibidor   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>EMBL</b>            | <i>European Molecular Biology Laboratory</i>  |
| <b>ES</b>              | Complejo Enzima-Sustrato  |
| <b>ESI</b>             | Complejo Enzima-Sustrato-Inhibidor  |
| <b>F</b>               | Fenilalanina  |
| <b>FAD</b>             | Flavín Adenín dinucleótido  |
| <b>FMN</b>             | Flavina Mononucleótido  |
| <b>FPLC</b>            | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> o <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> |
| <b>G</b>               | Glicina en secuencias aminoácidas, Guanina en secuencias nucleotídicas.                   |
| <b>G6PDH</b>           | Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa  |
| <b>GAPDH</b>           | Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa   |
| <b>GB</b>              | <i>Genebank</i>   |
| <b>GI</b>              | Identificador Único de Secuencia  |
| <b>Gln</b>             | Glutamina   |
| <b>Glu</b>             | Ácido glutámico   |
| <b>GluR</b>            | Glutación Reductasa   |
| <b>GP63</b>            | Leishmaniolisina  |
| <b>GS-TNB</b>          | Disulfuro mixto entre glutatión y TNB   |
| <b>GSH</b>             | Glutatión Reducido  |
| <b>GSHa</b>            | Gamma-glutamyl-cisteína-sintetasa   |
| <b>GSHb</b>            | Glutatión Sintetasa   |
| <b>Gsp</b>             | Glutationil Espermidina   |
| <b>GspS</b>            | Glutationil Espermidina sintetasa   |
| <b>GSSG</b>            | Glutatión oxidado   |
| <b>GST</b>             | Glutatión S Transferasa   |
| <b>H</b>               | Histidina   |
| <b>HEK293T</b>         | <i>Human Embryonic Kidney Cells 293</i>   |
| <b>hGluR</b>           | Glutatión Reductasa Humana  |
| <b>His</b>             | Histidina   |
| <b>HIV</b>             | Virus de la Inmunodeficiencia Humana  |
| <b>HK</b>              | Hexoquinasa   |
| <b>HPLC</b>            | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>   |
| <b>HRP</b>             | Peroxidasa de Rábano, <i>Horseradish Peroxidase</i>                                       |
| <b>I</b>               | Isoleucina o Inhibidor  |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | Concentración Inhibitoria 50  |
| <b>Ile</b>             | Isoleucina  |
| <b>iNOS</b>            | Óxido Nítrico Inducible   |
| <b>IPP</b>             | Interacciones Proteína - Proteína   |
| <b>IQM</b>             | Instituto de Química Medica   |
| <b>IRO</b>             | Intermediarios Reactivos del Oxígeno  |
| <b>K</b>               | Lisina  |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>kCal</b>                 | Kilocaloría   |
| <b><math>K_{cat}</math></b> | Constante de formación del producto                                       |
| <b>kDa</b>                  | Kilodalton  |
| <b><math>K_I</math></b>     | Constante de Inhibición   |
| <b><math>K_M</math></b>     | Constante de <i>Michaelis-Menten</i>                                      |
| <b><math>K_{obs}</math></b> | Constante que describe la curvatura de los inhibidores de unión lenta     |
| <b><math>K_s</math></b>     | Constante de equilibrio de disociación                                    |
| <b>LC</b>                   | Leishmaniosis cutánea   |
| <b>LD</b>                   | Leishmaniosis difusa  |
| <b>LMC</b>                  | Leishmaniosis mucocutanea   |
| <b>LPADH</b>                | Lipoamida deshidrogenasa  |
| <b>LPG</b>                  | Lipofosfoglicano  |
| <b>LV</b>                   | Leishmaniosis visceral  |
| <b>Lys</b>                  | Lisina  |
| <b>M</b>                    | Metionina o Molar   |
| <b>mAU</b>                  | Miliunidades de absorbancia   |
| <b>MBP</b>                  | Maltose Binding Protein   |
| <b>Met</b>                  | Metionina   |
| <b>min</b>                  | Minutos   |
| <b>mM</b>                   | Milimolar   |
| <b>MRC-5</b>                | <i>Medical Research Council cell strain 5</i>                             |
| <b>mRNA</b>                 | Ácido Ribonucleico Mensajero  |
| <b>mS</b>                   | Milisiemens   |
| <b>MSR</b>                  | Metionina Sulfoxido Reductasa   |
| <b>mV</b>                   | Milivoltio  |
| <b>MW</b>                   | Marcador de peso molecular, de <i>Molecular Weight</i>                    |
| <b>N</b>                    | Asparagina  |
| <b>Na</b>                   | Sodio   |
| <b>NADH</b>                 | Dinucleótido de nicotinamida y adenina                                    |
| <b>NADP+</b>                | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado                         |
| <b>NADPH</b>                | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido                        |
| <b>NC-IUBMB</b>             | Nomenclatura de la unión internacional de bioquímica y biología molecular |
| <b>NCI</b>                  | <i>National cancer institute</i>  |
| <b>Ni</b>                   | Níquel  |
| <b>Ni-NTA</b>               | Níquel-Nitriloacético   |
| <b><math>N_{LE}</math></b>  | Norleucina  |
| <b>nM</b>                   | Nanomolar   |
| <b>NTA</b>                  | Nitrilo acético   |
| <b>°C</b>                   | Grados Celsius  |
| <b>ODC</b>                  | Ornitina Descarboxilasa   |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>OMS</b>               | Organización Mundial de la Salud   |
| <b>P</b>                 | Prolina  |
| <b>PB</b>                | <i>Poisson-Boltzmann</i>   |
| <b>Pd</b>                | Paladio  |
| <b>PDB</b>               | <i>Protein Data Bank</i>   |
| <b>PEG</b>               | Polietilenglicol   |
| <b>PGI</b>               | Fosfoglucosa Isomerasa   |
| <b>pH</b>                | Potencial de Hidrogeniones   |
| <b>Phe</b>               | Fenilalanina   |
| <b>PK</b>                | Piruvato quinasa   |
| <b>Pro</b>               | Prolina  |
| <b>Pxs</b>               | Peroxidasas  |
| <b>Q</b>                 | Glutamina  |
| <b>R</b>                 | Arginina   |
| <b>RefSeq</b>            | <i>Reference Sequences</i>   |
| <b>RMN</b>               | Resonancia Magnética nuclear   |
| <b>RNA</b>               | Ácido Ribonucleico   |
| <b>RNAk</b>              | Ácido Ribonucleico del Kinetoplasto                                      |
| <b>RnR</b>               | Ribonucleotido reductasa   |
| <b>RPI</b>               | Ribosa 5 fosfato isomerasa   |
| <b>RuPE</b>              | Ribulosa 5 fosfato isomerasa   |
| <b>S</b>                 | Serina   |
| <b>s</b>                 | Segundos   |
| <b>SASA</b>              | Áreas superficiales accesibles al solvente                               |
| <b>Sb</b>                | Antimonio  |
| <b>Sb<sup>III</sup></b>  | Antimonio Trivalente   |
| <b>Sb<sup>V</sup></b>    | Antimonio Pentavalente   |
| <b>Ser</b>               | Serina   |
| <b>sp.</b>               | Especie  |
| <b>Spd</b>               | Espermidina  |
| <b>SpdS</b>              | Espermidina Sintetasa  |
| <b>spp.</b>              | Especies   |
| <b>SPR</b>               | Resonancia de Plasmones Superficiales                                    |
| <b>T</b>                 | Treonina en secuencias aminoacídicas, Timina en secuencias nucleotídicas |
| <b>t</b>                 | Tiempo   |
| <b>t 1/2</b>             | Tiempo de Vida Medio   |
| <b>T(SH)<sub>2</sub></b> | Tripanotión Reducido   |
| <b>T[SH]<sub>2</sub></b> | Tripanotión Reducido   |
| <b>TAL</b>               | Transaldolasa  |
| <b>TEV</b>               | Virus mosaico del tabaco   |
| <b>TFI</b>               | Triosa fosfato Isomerasa   |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Thr</b>              | Treonina  |
| <b>TKT</b>              | Transketolasa   |
| <b>TNB</b>              | Ácido 2-nitro-5-metabercaptobenzoico  |
| <b>TR</b>               | Transcriptasa Reversa   |
| <b>TRL</b>              | Empleado para designar a los péptidos. Viene de <i>Tripanotión Reductasa Leishmania</i> |
| <b>TROR</b>             | Tioredoxina reductasa   |
| <b>Trp</b>              | Triptófano  |
| <b>TryR</b>             | Tripanotión reductasa   |
| <b>TryR FF</b>          | Tripanotión reductasa con FLAG <i>tag</i>   |
| <b>TryR HH</b>          | Tripanotión reductasa con HIS <i>tag</i>  |
| <b>TryR HF</b>          | Tripanotión reductasa con HIS y FLAG <i>tag</i>   |
| <b>TryR<sub>m</sub></b> | TryR monomérica   |
| <b>TryS</b>             | Tripanotión Sintetasa   |
| <b>TS<sub>2</sub></b>   | Tripanotión Oxidado   |
| <b>TST</b>              | Tripanotión S-transferasa   |
| <b>TXN</b>              | Triparedoxinas  |
| <b>Tyr</b>              | Tirosina  |
| <b>V</b>                | Valina  |
| <b>Val</b>              | Valina  |
| <b>V<sub>i</sub></b>    | Velocidad inicial de Reacción   |
| <b>VIH</b>              | Virus de la Inmunodeficiencia Humana  |
| <b>V<sub>MAX</sub></b>  | Velocidad Máxima de la Enzima   |
| <b>VPP</b>              | Vía de las pentosas fosfato   |
| <b>V<sub>s</sub></b>    | Velocidad Estacionaria Final  |
| <b>W</b>                | Triptófano  |
| <b>Y</b>                | Tirosina  |
| <b>Zn</b>               | Zinc  |
| <b>μg</b>               | Microgramo  |
| <b>μM</b>               | Micromolar  |
| <b>μm</b>               | Micrómetro  |



### **Nota sobre puntuación, abreviaturas, anglicismos y uso del lenguaje.**

Con el fin de facilitar la utilización de los resultados en futuras publicaciones que puedan derivarse de este trabajo, se ha preferido emplear la puntuación en la numeración anglosajona indicando las cifras decimales con puntos en lugar de comas. Esto se encuentra aceptado por la Real Academia Española. Debido a la extensión de este tipo de trabajos se ha decidido, de forma deliberada, repetir las siglas empleadas a lo largo de la memoria cuando se considera que ello facilita su lectura. El empleo de anglicismos se ha implementado en *itálicas* y se ha preferido a sus equivalentes en castellano cuando se ha considerado que estos no reflejan lo que se quiere comunicar. El autor de esta memoria es de origen latinoamericano, por lo que el uso de ciertas palabras puede variar con respecto al castellano peninsular sin significar esto que estén empleadas de manera incorrecta. Se ha sido particularmente cuidadoso en esto último empleando de manera extensiva el Diccionario de la Real Academia Española.

## RESUMEN

Entre las muchas peculiaridades que se encuentran al estudiar los organismos tripanosomátidos de interés clínico, una de las más interesantes desde el punto de vista de la identificación de nuevas dianas terapéuticas es la forma como este parásito destoxifica su ambiente intracelular de especies oxidantes. Al carecer del ubicuo sistema glutatión/glutatión reductasa, en su lugar, el parásito cuenta con un sistema análogo modificado que emplea el tripanotión ( $T[SH]_2$ ), que no es más que dos moléculas de glutatión unidas por un puente espermidina. Esta unión permite que los tioles activos de la molécula se encuentren en más proximidad haciéndola mejor reductor que el glutatión. En el centro del metabolismo del  $T(SH)_2$  se encuentra la tripanotión reductasa (TryR), una enzima esencial para la supervivencia del parásito que está encargada de mantener en todo momento un *pool* de tripanotión reducido dentro de la célula. Esta enzima es un homodímero que cuenta con dos centros activos en los que participan residuos de ambas subunidades, haciendo de su configuración dimérica una característica fundamental para su actividad.

Al sintetizar un péptido que emula una de las hélices  $\alpha$  que hacen parte de la interfaz de dimerización ubicada donde ambas subunidades hacen contacto, hemos sido capaces de desestabilizar el dímero de la enzima y minimizar su actividad. Se han desarrollado distintas variantes de este péptido con el fin de mejorar su estabilidad y potenciar su actividad. Entre las modificaciones realizadas se encuentran (1) la sustitución por alanina de cada uno de sus aminoácidos para evaluar su relevancia, (2) el acortamiento del péptido para determinar la secuencia mínima que conserva la actividad deseada y (3) la creación de péptidos estructuralmente restringidos en los que se intentan mantener las características estructurales de la hélice original. A partir de las exploraciones realizadas se obtuvieron dos péptidos especialmente relevantes: TRL35, (Ac-PKIIQSVGISN<sub>LE</sub>KN<sub>LE</sub>-NH<sub>2</sub>) y TRL38 (Ac-PKIIQSVGI-NH<sub>2</sub>), de 13 y 9 aminoácidos, respectivamente.

Además, basándonos en las interacciones que se dan entre la enzima y el péptido corto deducidas de las simulaciones de dinámica molecular, se desarrolló un modelo farmacofórico que permitió la identificación de moléculas pequeñas con capacidad de inhibir la actividad enzimática.

Para finalizar, hemos caracterizado bioquímicamente la interacción entre TRL35 y TryR, logrando identificar el modelo mediante el cual se da esta inhibición y las implicaciones de esta en la estabilidad de la estructura globular de la enzima.

## ABSTRACT

### Introduction

The pharmacological treatment of Leishmaniasis still leaves much to be desired in terms of efficacy and effort devoted to the development of new agents. In the search for novel molecular entities, it is always preferable to focus on targets that are absent in the human host. *Leishmania* parasites lack the ubiquitous glutathione/glutathione reductase system (GSH/GluR) that is used in most prokaryotic and eukaryotic cells to detoxify their intracellular milieu from the damaging oxidizing agents produced during metabolism. Instead, they make use of the rather unique trypanothione/trypanothione reductase (T(SH)<sub>2</sub>/TryR) system, the blockage of which can be used to impair parasite survival.

T(SH)<sub>2</sub> is formed by two glutathione molecules bound together by a spermidine bridge. This molecule is so effective (more than glutathione) as an antioxidant that *Leishmania* relies solely on this system to withstand the harsh oxidant environment found inside of the phagolysosome.

TryR is a homodimeric enzyme with C2 symmetry and two independent catalytic sites, each of which is made up of residues belonging to both monomers. Therefore, the dimeric configuration of this enzyme is an absolute requirement for its activity. At the core of the interaction between TryR subunits lays the dimerization interface, a hydrophobic patch that keeps both monomers tightly joined. Right in that hydrophobic patch we have identified a couple of amino acids that are important for maintaining a proper interaction between the monomers. These amino acids, glutamic acid 492 and glutamine 495, were incorporated into a 13-mer  $\alpha$ -helix that we designed as an inhibitory peptide targeted to the dimerization interface of TryR. To assess this peptide and its follow-up derivatives, we implemented an easy scalable activity assay and developed a new ELISA that allowed us to quantify their impact on TryR dimerization and activity.

## Results

### ***Concentration-dependent NADPH inactivation of TryR.***

The activity of TryR can be followed by using an assay that has been published and extensively reviewed. Briefly, instead of following the activity of TryR by the consumption of NADPH at sub UV wavelengths, which can be quite cumbersome using plastic microwell plates, this assay couples the consumption of  $T(SH)_2$  with the reduction of Ellman's reagent (DTNB). During this process DTNB oxidizes the  $T(SH)_2$  produced by the enzyme and is converted into TNB, whose yellow color can be easily quantitated. During the implementation of this technique we serendipitously realized that the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio has a huge impact on the enzyme activity. It has been proven that a fully reduced GluR, formed by incubation with an excess of NADPH, produces a dormant enzyme more prone to be degraded. We hypothesize that in TryR this overreduction is also a regulatory mechanism analogous to that found in the GSH/GluR system used by other organisms (Figures 4.11 & 4.12).

### ***Changing one amino acid changes everything.***

As we mentioned before, the peptide (Ac-PEIIQSVGISMKM-NH<sub>2</sub>) mimics an  $\alpha$ -helix of 13 amino acids located in the dimerization interface of TryR. We were able to show that the peptide does, in fact, destabilize the dimeric structure of the enzyme and also impairs its activity. By site-directed mutagenesis we identified the E436 residue to be a dimerization hotspot. This residue corresponds to the second amino acid of the peptide. Counterintuitively, the change of the glutamic acid in the second position of the synthesized peptide by the oppositely charged amino acid lysine rendered the peptide even more effective in its ability to both destabilize the dimer (x2) and inhibit its catalytic activity (x30). The peptide was also modified by replacing each of the easily oxidizable methionines with norleucine, a non-natural amino acid. This substitution was found not to interfere with the inhibitory features of the original peptide while making it more stable during long incubation periods. This novel, more effective peptide was denominated TRL35 (Ac-PKIIQSVGISN<sub>LE</sub>KN<sub>LE</sub>-NH<sub>2</sub>) and it became the reference peptide used throughout this thesis (Figure 4.20). According to results from molecular dynamic simulations, the TRL35's lysine interacts with the glutamic 436' and the aspartic 432' residues of the subunit. This electrostatic attraction adds to the rest of interactions that, together, anchor the peptide

inside the cleft of the dimerization interface between the subunits thus disrupting their association (**Figure 4.25**).

#### ***Activity and dimerization assays, different but complementary.***

The dimer quantitation assay (dimerization assay) and the activity assay are fundamentally different. In the former high concentrations of the enzyme are used in a substrate-free environment, whilst in the latter a much lower enzyme concentration is required and the substrate concentration is kept constant. By combining both assays, we have demonstrated that the loss of activity caused by our prototype is linked to the loss of TryR dimeric forms, a process that is highly accelerated when the enzyme is catalytically active. (**Figure 4.24, 4.29 & 4.30**)

#### ***TRL35 modifications and enhancements***

TRL35 was further modified in attempts to increase its helical stability and identify the most relevant positions. Scouting the different peptide positions by alanine-scanning helped us to identify the glutamine in the fifth position to be relevant in the interaction between the peptide and the TryR monomer (**Figure 4.26**). According to results from molecular dynamics simulations, this glutamine gives rise to a favorable interaction with the protein backbone, especially with the valine 460' and the isoleucine 458', fitting into an existing hole created by these residues (**Figure 4.28**). Even though structural stabilization approaches based on the generation of stapled and lactam bridged peptides proved to be good, making the peptides more resistant to protease degradation, the decreased flexibility and the added hydrophobicity rendered less active or completely inactive peptides (**Table 4.3, 4.4 & Figure 4.40**). Even though TRL35 can disrupt the activity of the enzyme from parasite lysates, neither TRL35 nor its fluorescently modified version labeled with a FITC at the N-terminus (TRL58) were able to kill intracellular amastigotes (**Figure 4.31, 4.33 & 4.34**). When the peptide was shortened by the C-terminus, the minimum sequence able to retain the inhibitory and disruptive features was the 9-mer. This short peptide (Ac-PKIIQSVGI-NH<sub>2</sub>), which also shows the relevance of the isoleucine 9, was named TRL38 (**Figure 4.27**). The interaction model between TryR and TRL38, obtained by means of molecular dynamics simulations, was used to build a pharmacophore that revolves around the positive charge of lysine 2, the ability of glutamine 5 to act as a hydrogen bond donor and the lipophilic features of isoleucine 9. This pharmacophore model assisted us in the identification, by means of

virtual screening, of several novel small molecules endowed with inhibitory properties (Figure 4.41, 4.42 & 4.43).

### ***Human Glutathione Reductase and Leishmania Trypanothione Reductase***

Despite the differences between TryR and its human ortholog glutathione reductase (hGluR), both enzymes share similar domains with an amino acid identity of 30%. Due to the fact that both enzymes use different substrates it was not possible to implement the assay that restores the reduced substrate by using DTNB. However, by using the classical approach in which the NADPH reduction is monitored, we could prove that TRL35 has no effect on hGluR activity but, interestingly, the peptide that still carries the glutamic acid in the second position, TRL23 (Ac-PEIIQSVGISN<sub>1,LE</sub>KN<sub>1,LE</sub>-NH<sub>2</sub>), has an inhibitory effect on the activity of the human enzyme (Figure 4.63).

### ***Inhibitory Mechanism of TRL35***

Even though we know that TRL35 interacts with TryR by somehow weakening its dimeric configuration and impairing its activity, to precisely describe how this interaction occurs we would need a protein/peptide crystal complex. Until such a crystal structure is obtained (work in progress), biochemistry can give us a good idea of how, catalytically-wise, these peptides affect the enzyme. Even though the experimental data did not fit to the classic biochemical inhibitory models, we were able to prove that activity impairment is an irreversible event and that the inhibition curves describing the experimental results were far from lineal. Instead, they resemble those observed with merlasen oxide, a prototypical time-dependent GluR/TryR inhibitor. When time-dependent models were applied to the inhibition data obtained from the TryR/TRL35 experiments data fitting was greatly improved, therefore suggesting that TRL35 exhibits a time-dependent non-competitive irreversible inhibition on TryR. This demonstrates that the peptide can bind both to the enzyme and to the enzyme-substrate complex and explains why both the dimer quantitation assay (dimerization assay), carried out in the absence of substrate, and the activity assay work. (Section 4.9)

### ***TryR Monomer Stability***

After conducting several dimerization assays using TRL35, the appearance of a slight precipitate in the wells was a common occurrence. Because of this, we hypothesized that the irreversible inhibition could be associated to precipitation of the enzyme. To test our

hypothesis we centrifuged the samples after treatment with different peptides and carried out a western-blot assay. Only the enzyme in the samples treated with TRL35 disappeared from the membranes while those treated with other peptides were present. This finding suggests that dimer disruption by TRL35 exposes some of the hydrophobic patches present in the monomer, which might cause the globular subunit conformation to collapse on itself or to become associated in a disorderly manner with other nearby disorganized monomers turning into insoluble protein globs that precipitate (**Figure 4.64**).

The results obtained in this work allow us to conclude that TRL35 interacts with the *Leishmania infantum* TryR dimerization interface destabilizing its dimeric conformation and triggering the irreversible loss of activity because of enzyme precipitation.

# INTRODUCCIÓN

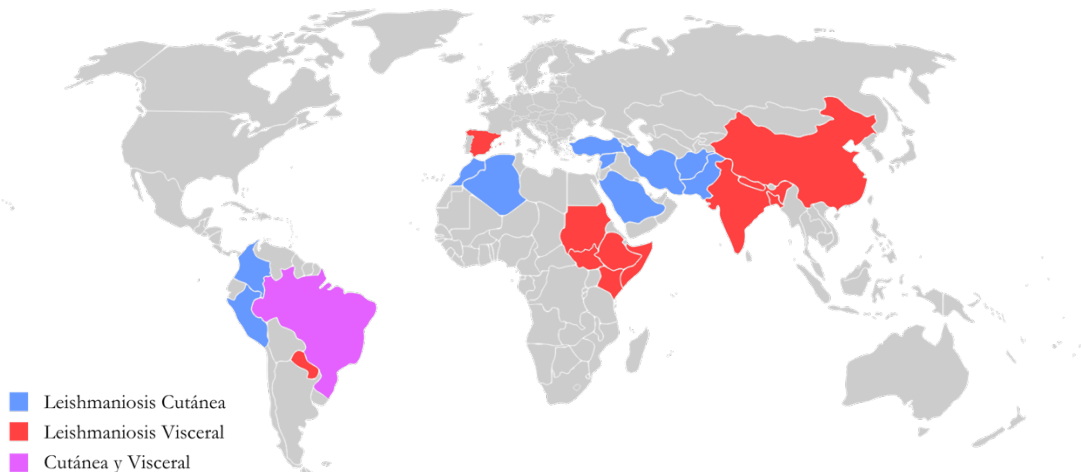
---



## 1.1 Leishmaniosis

Los parásitos protozoos del género *Leishmania* son los agentes causantes de la enfermedad denominada como leishmaniosis, zoonosis transmitida por insectos dípteros de la familia *Psychodidae*. La leishmaniosis presenta un amplio espectro clínico que va desde manifestaciones cutáneas que pueden cicatrizar espontáneamente, hasta infecciones viscerales que pueden causar la muerte. Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad son dependientes tanto del estado inmune del hospedero como de la especie de parásito implicado. Este parásito pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, la cual además de *Leishmania* también incluye otros organismos parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, agentes causantes de la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño respectivamente (1–3).

### Leishmaniosis en el Mundo

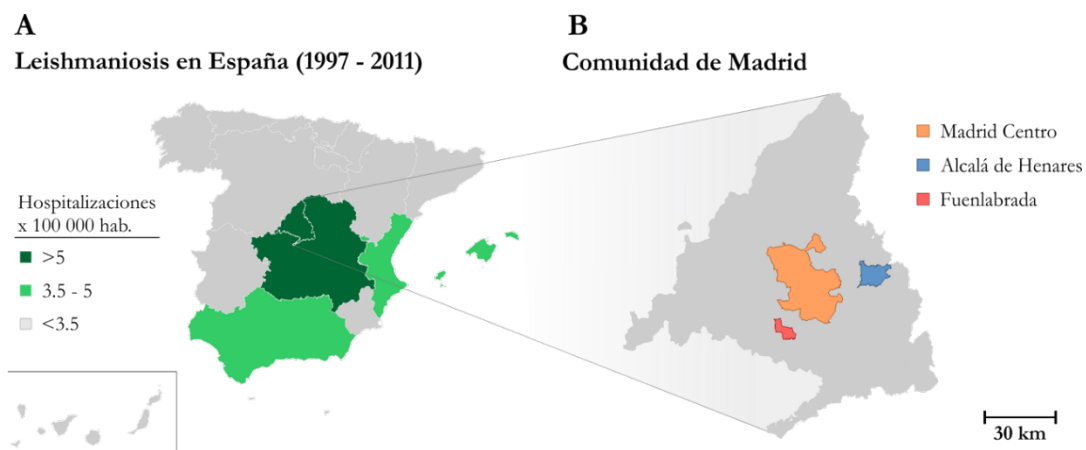


**Figura 1.1** | Distribución de la leishmaniosis en el mundo. Datos de la organización mundial de la salud basados en los casos reportados en el 2014.

Este parásito se encuentra distribuido en todos los continentes exceptuando la Antártida y Australia, constituyendo un problema de salud pública serio y en aumento. En el año 2002 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que el número de personas en riesgo de contraer la infección era de alrededor de 350 millones, con un aproximado de 2.3 millones de casos nuevos cada año (4). Aunque a fecha de 2015 la OMS estima unas cifras menores, logrando disminuir el número de personas en riesgo a 310 millones con una estimación anual de nuevos casos de 1.3 millones, la tasa de mortalidad sigue siendo preocupante reportándose en los últimos cinco años unas 100 000 muertes por la forma visceral (5). A pesar de las

investigaciones que se llevan a cabo en el área desde comienzos del siglo pasado, estudios recientes han mostrado una reactivación en varios focos en Italia, China, Brasil e Israel, además de la aparición de nuevos focos en Marruecos (4,6).

Estas cifras resaltan la importancia de la enfermedad como problema de salud pública no solo en países en vía de desarrollo sino también en los países desarrollados. La leishmaniosis es endémica en todos los países del sur de Europa con más de 700 casos al año, siendo una enfermedad dinámica la cual se ve afectada tanto por cambios medio ambientales, como el calentamiento global que afecta a la ecología y distribución del vector, como por conflictos geopolíticos que generan desplazamientos masivos de la población (7). En un estudio en el que se evaluaron los casos importados de leishmaniosis en Italia durante los últimos 27 años, se encontró que aproximadamente un 3.5% de los casos anuales son importados tanto de otros países europeos como de África, América y Asia. Aunque la cifra parezca minúscula, cabe resaltar que más del 80% de los casos importados de Asia corresponden a países como Siria, Yemen, Iraq, Afganistán y el Líbano (8). Sin embargo, este estudio no tiene en cuenta la problemática actual en la cual la emigración masiva a Europa de personas provenientes de países en conflicto y que son endémicos para esta enfermedad podría aumentar las cifras de importación de *Leishmania* en los próximos años.



**Figura 1.2** | Leishmaniosis en España. **A.** Distribución de los casos de Leishmaniosis que terminan en hospitalizaciones por cada 100 000 habitantes, siendo las comunidades de Castilla la Mancha y Madrid las más afectadas seguidas de la Comunidad Valenciana y Baleares. **B.** Brote de Leishmaniosis en el municipio de Fuenlabrada (Comunidad de Madrid). El brote comenzó en 2013 y sigue activo.

En España la leishmaniosis es endémica. Tanto la forma cutánea como la visceral es causada por *Leishmania infantum*, siendo los flebótomos del subgénero *Larroussius* los vectores más comunes y el perro doméstico (*Canis familiaris*) su reservorio, aunque también se han

encontrado infectados lince ibérico (*Lynx pardinus*), lobos (*Canis lupus*), liebres (*Lepus granatensis*) y ratas (*Rattus rattus*) entre otros (9). En 1997, momento en que se hizo obligatorio el reporte de los pacientes con leishmaniosis, en la comunidad de Madrid se reportaban de 15 a 25 casos anuales. Sin embargo, de 2009 a 2013 se presentó en el sur de Madrid el brote más grande de leishmaniosis del que se tenga conocimiento en España, con más de 400 casos, 247 solo en la localidad de Fuenlabrada (10,11) (Figura 1.2 B). Aunque en los países desarrollados se suele asociar la aparición de leishmaniosis visceral (LV; forma de la enfermedad que puede causar la muerte) a una co-infección junto a VIH, un estudio reciente en España muestra un aumento de las hospitalizaciones a causa de leishmaniosis independiente de la presencia de VIH (Figura 1.2 A), siendo las comunidades autónomas de Castilla la Mancha, Andalucía y Madrid las más afectadas con un estimado de más de 5 casos por cada 100 000 habitantes de 1997 a 2011 (12). Datos un poco más alarmantes de la OMS estiman que en 2016, solo en España, el 64% de la población o 30 354 672 personas están en riesgo de LV (13).

Lo anterior deja de manifiesto la necesidad de una búsqueda activa de nuevas medidas de control así como la identificación de moléculas que puedan servir como blanco terapéutico para el diseño de fármacos. Además del interés que suscita el estudio del parásito desde el punto de vista clínico y de la salud pública a nivel nacional e internacional, también es importante desde el punto de vista de la investigación básica. Al ser un parásito que divergió de manera muy temprana del árbol filogenético de los eucariotas, *Leishmania* presenta características bioquímicas, genéticas y morfológicas que lo diferencian de la mayoría de estos (14), convirtiéndolo entonces en un excelente modelo en el cual se han descubierto características inusuales en la regulación génica, como lo son: la transcripción policistronica, *trans-RNA splicing* y un mecanismo particular de edición del RNA (15–18). Otra de las singularidades encontradas en estos organismos es la presencia de una sola y enorme mitocondria a lo largo del parásito. Cerca del cuerpo basal del flagelo, la mitocondria contiene una gran cantidad de mini y maxi círculos de DNA concatenados en una estructura llamada kinetoplasto. Además, desde el punto de vista inmunológico, son un excelente modelo para explorar la respuesta inmune a organismos patógenos intracelulares (19).

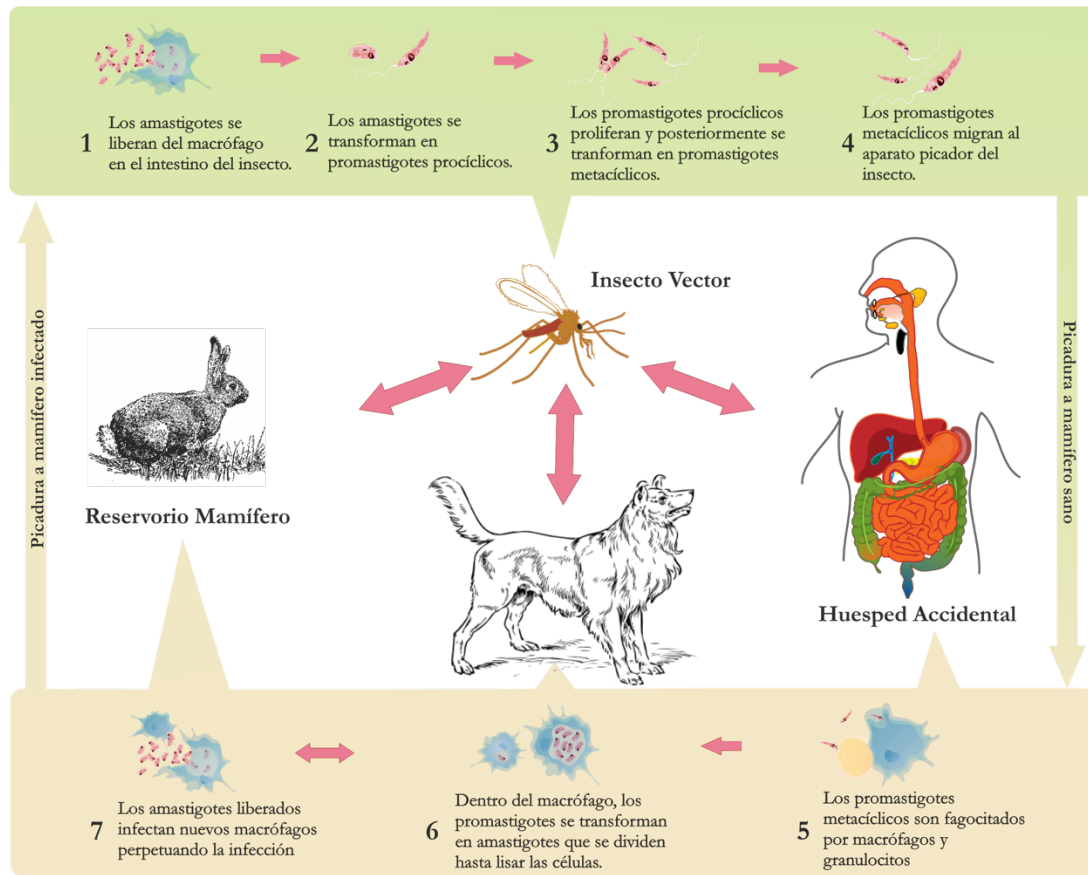
### 1.1.1 Generalidades de *Leishmania* spp. y su ciclo de vida

*Leishmania* es un género perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*. Este género se divide en 2 subgéneros, *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Leishmania*),

diferenciados según el sitio específico del vector en el que se produce la proliferación de los parásitos. Así, los parásitos pertenecientes al subgénero *Leishmania* proliferan en la región suprapilórica del tracto digestivo del flebótomo, mientras que los parásitos pertenecientes al subgénero *Viannia* proliferan en la zona peripilórica del mismo (20). Los síndromes causados por las leishmaniosis abarcan infecciones subclínicas (inaparentes), infecciones localizadas (lesiones cutáneas) e infecciones diseminadas (cutáneas, mucosas o viscerales). Estas infecciones causan manifestaciones que van desde úlceras cutáneas que auto cicatrizan hasta infecciones viscerales que pueden ocasionar la muerte. Generalmente se reconocen 4 formas clínicas de la enfermedad: leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucocutánea (LMC), leishmaniosis difusa (LD) y leishmaniosis visceral (LV) (2). En todas estas formas clínicas la enfermedad aparece como consecuencia de la proliferación del parásito en las células del sistema mononuclear fagocítico, ya sea en el hígado y bazo (leishmaniosis visceral), en la dermis (leishmaniosis cutánea y cutánea difusa) o en la mucosa oro-faríngea (leishmaniosis mucocutánea). Estas infecciones pueden ser causadas por alrededor de 21 especies de *Leishmania*, las cuales pueden ser transmitidas a los humanos por alrededor de 93 diferentes especies de insectos flebótomos de los 800 conocidos (3,21). Como ya se mencionó, en España la especie más relevante de *Leishmania* es *Leishmania infantum* y el vector más implicado en su transmisión son los flebotomíneos del subgénero *Larrosius*.

Cuando el flebótomo hembra (género *Lutzomyia* en el nuevo mundo, *Phlebotomus* en el viejo mundo) se alimenta de sangre de un vertebrado infectado, ingiere macrófagos parasitados con la forma amastigote de *Leishmania* (forma intracelular que carece de flagelo, 2-4 µm de diámetro) que se encuentran en el interior de la vacuola fagocítica. Ya dentro del intestino del vector, los amastigotes salen del macrófago y se inicia una transformación a promastigote procíclico. En esta fase el parásito se encuentra ubicado en la parte posterior del intestino del insecto, es poco infeccioso para el mamífero, posee poca motilidad y es altamente replicativo. Luego el parásito disminuye su capacidad replicativa y pasa por las formas de promastigote nectonomado y promastigote leptomonado hasta llegar a su forma final alargada conocida como promastigote metacíclico (15–20 µm x 1.5–3.5 µm con un flagelo de 15–28 µm). Esta forma es altamente infectiva, móvil y se encuentra ubicada en la parte anterior del intestino del insecto y en el aparato picador del mismo. El proceso de transformación de promastigote procíclico a metacíclico es conocido como metaciclogénesis. Además de los cambios morfológicos que se evidencian durante este proceso, también se presentan cambios bioquímicos y moleculares en el protozoo, como lo son una remodelación de los glicolípidos de membrana, lo que causa un engrosamiento del glicocáliz, además

también se induce la expresión de proteínas de membrana específicas de este estadio como la gp63. Cuando el flebótomo se alimenta de nuevo de sangre, deposita la forma metacíclica del parásito en el interior de la piel, dándole continuidad así al ciclo de transmisión de la infección (22).



**Figura 1.3** | Esquema simplificado del ciclo de vida de *Leishmania* spp. En verde se presentan los eventos que se llevan a cabo dentro del insecto vector y en color carne aquellos que transcurren dentro del hospedador mamífero.

Dentro del tejido del vertebrado, los promastigotes son reconocidos por macrófagos que los fagocitan por un mecanismo descrito como fagocitosis facilitada. En el reconocimiento y adherencia del parásito al macrófago se ha descrito la participación de varias macromoléculas localizadas en la membrana del protozoo que actúan como ligandos. Entre ellas, las más importantes y estudiadas son el LPG y la leishmanolisina o GP63 (23,24). El macrófago, a su vez, también expresa moléculas en su superficie que funcionan como receptores para el parásito, entre ellas se destacan: el receptor 3 del complemento, el receptor manosa-fucosa, el receptor de fibronectina y el receptor de fosfatidilserina. Este último es notablemente importante durante el proceso de entrada del parásito al macrófago, ya que el reconocimiento

de la fosfatidilserina en células de mamífero se ha descrito como un elemento crítico para el reconocimiento y la fagocitosis de células apoptóticas. La expresión de fosfatidilserina en la membrana del parásito confunde por tanto al macrófago, causando una supresión de sus funciones fagocíticas, lo que facilita la evasión de la respuesta inmune por parte del parásito. De esta manera, la presencia de parásitos en el inóculo que presenten un fenotipo similar a apoptosis es vital para el establecimiento de la enfermedad (25). Este reconocimiento de la fosfatidilserina es previo a la lisis celular, previniendo la liberación de componentes intracelulares tóxicos o inmunogénicos. Sin embargo, este proceso no es únicamente silencioso en lo que respecta a la inflamación y el desencadenamiento de la respuesta inmune, sino que es activamente anti-inflamatorio (26,27). Una vez reconocido por el macrófago el parásito es fagocitado y, ya dentro del fagolisosoma, gracias a los cambios de temperatura y pH, el promastigote se transforma en amastigote y comienza a replicarse. Debido a la proliferación de los amastigotes intracelulares, los macrófagos parasitados mueren y permiten la salida de los parásitos, que infectan nuevas células, amplifican la infección, causan daño en los tejidos y desencadenan la patología. Dependiendo del lugar donde el parásito se establezca y replique, se desarrollarán las distintas formas clínicas de la enfermedad. Si esto ocurre en la dermis se desarrollará una leishmaniosis cutánea; si es en el hígado y el bazo se desarrollará una leishmaniosis visceral y si migran a la mucosa oro-faríngea se desarrollará una leishmaniosis mucosa. El tropismo del parásito por ciertos órganos o tejidos es dependiente de la especie, pero el estado inmune del hospedero puede influenciar también este tropismo. Por ejemplo, la co-infección por *Leishmania* y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) incrementa el riesgo de desarrollar LV por un factor de 100 a 2000 en áreas endémicas para VIH. Además, la infección con VIH reduce la probabilidad de tener una buena respuesta al tratamiento e incrementa las probabilidades de una recaída. A la vez, la LV promueve la progresión clínica del VIH y el desencadenamiento de las condiciones que definen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Ambas enfermedades exhiben un efecto sinérgico en detrimento de la respuesta inmune celular debido a que atacan células relacionadas con la respuesta inmune (28).

### 1.1.2 Tratamiento de la Leishmaniosis

La OMS considera a la leishmaniosis como una de las principales enfermedades olvidadas debido a que afecta principalmente a poblaciones de bajos recursos en países subdesarrollados o en vía de desarrollo. Por lo anterior, el interés comercial por las industrias

farmacéuticas en el desarrollo de nuevas moléculas para combatir esta enfermedad es limitado. Aunque existen diversas alternativas para el tratamiento de la leishmaniosis, ninguno de los fármacos actualmente en uso puede ser considerado como ideal debido a sus altos niveles de toxicidad, sus subsecuentes efectos secundarios, y la larga duración del tratamiento que desemboca en un abandono del mismo. Además, en la mayor parte de los casos, estos tratamientos no eliminan al parásito por completo (29,30).

#### **1.1.2.1 Antimonio Pentavalente**

El antimoniato de meglumina (Glucantime) y el estibogluconato de sodio (Pentostam) son los fármacos de elección como primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis. A la fecha, el mecanismo de acción de los antimoniales se desconoce y su acción probablemente dependa de la reducción *in vivo* del  $Sb^V$  (antimonio pentavalente) a  $Sb^{III}$  (antimonio trivalente). En general se cree que el Sb actúa sobre varios blancos inhibiendo la glucólisis, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos e inhibiendo la fosforilación de ADP. También se ha reportado que causa un bloqueo no específico de los tioles en las proteínas de los amastigotes causando la inhibición de la topoisomerasa I. Además, se ha demostrado que el antimonio puede alterar el potencial oxido-reductor en ambas formas del parásito, promoviendo el eflujo de glutatión y tripanotión y, por tanto, haciendo al parásito más susceptible al estrés oxidativo. Los efectos adversos de los antimoniales incluyen cardiotoxicidad severa, pancreatitis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (31,32).

#### **1.1.2.2 Anfotericina B**

La anfotericina B, comercializada como Fungizone o AmBisome en su formulación lipídica, es un agente antimicótico que se usa desde la década de los 60 como segunda línea de tratamiento frente a la leishmaniosis. La actividad leishmanicida de la anfotericina B es atribuida a su selectividad por los esteroides, principalmente el ergosterol presente en la membrana de los parásitos, formando poros y desencadenando un influjo de iones que resulta en la lisis celular. Los efectos adversos de la anfotericina B incluyen nefrotoxicidad severa, hipoalcalemia y fiebre (33).

### **1.1.2.3 Miltefosina**

La actividad leishmanicida de la miltefosina fue reportada en 1987 y su mecanismo puede ser extrapolado de su efecto sobre las células de mamífero en donde causa una modulación de los receptores presentes en la superficie de la célula, una activación de fosfolipasas, de la proteína quinasa C y otras vías mitogénicas que derivan en apoptosis. Los efectos adversos de la miltefosina incluyen vómito, diarrea, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, y teratogenicidad (34).

### **1.1.2.4 Paramomicina**

La paramomicina fue aislada de *Streptomyces rimosus* en 1956. Es un amino glucósido efectivo contra una amplia variedad de bacterias y parásitos. Su actividad leishmanicida fue demostrada en los años 60 y aun así no se comprende del todo su modo de acción. Se sabe que se une a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo con la iniciación de la síntesis proteica, fijando el complejo ribosomal 30S-50S en el codón de inicio del mRNA y ocasionando así una acumulación de complejos de iniciación anormales. Los efectos adversos de la paramomicina incluyen nefrotoxicidad severa, hepatotoxicidad y ototoxicidad (35).

### **1.1.2.5 Pentamidina**

Las diaminas aromáticas fueron sintetizadas en principio como fármacos hipoglucémicos pero su uso como antiparasitario fue rápidamente descubierto, primero en el tratamiento de la tripanosomiasis africana y, desde 1939, en el tratamiento de la leishmaniosis. La pentamidina actúa en el genoma del parásito dificultando su replicación y la transcripción a nivel mitocondrial. Los efectos adversos de la pentamidina incluyen hiperglicemia debido a daño pancreático, hipotensión, taquicardia y cambios en el electrocardiograma (36).

### **1.1.2.6 Otros tratamientos**

Otros compuestos usados en la actualidad en el tratamiento de la leishmaniosis incluyen derivados de los imidazoles y triazoles (Fluconazol, Ketoconazol. etc.), análogos de bases nitrogenadas (Alopurinol) y análogos de quinonas (Sitamaquina).



El Fluconazol, Ketoconazol y el Itrakonazol son agentes antifúngicos de administración oral conocidos y bien tolerados que han sido usados para tratar tanto casos del subgénero *Leishmania* como del subgénero *Viannia*. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la 14 $\alpha$ -desmetilasa, interfiriendo en la vía de la síntesis de esteroides y afectando la biosíntesis de la membrana.

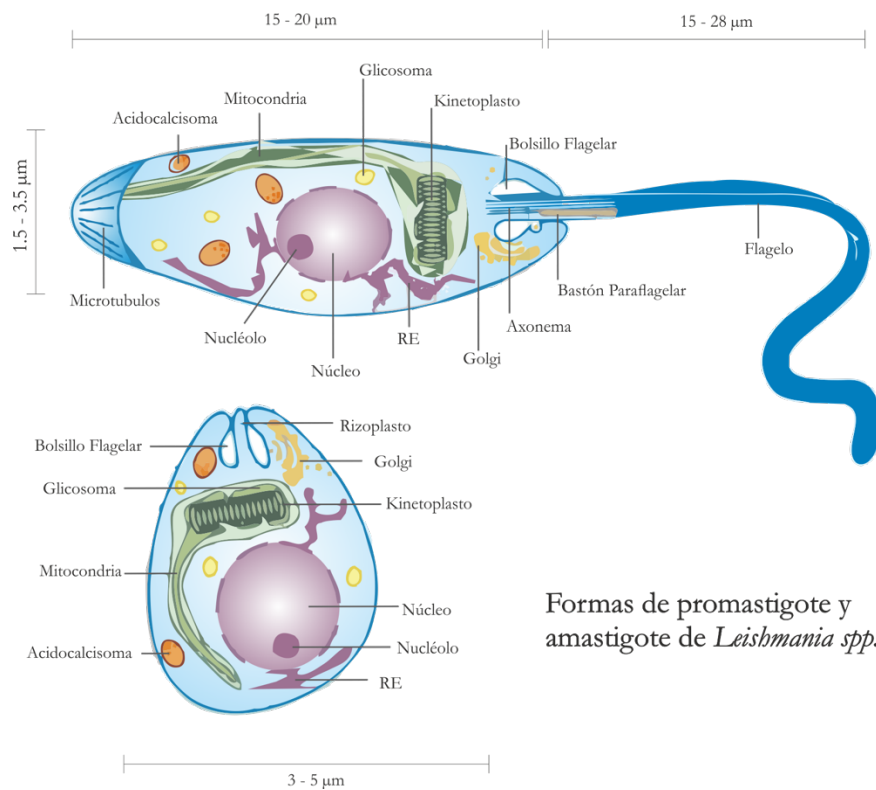
El alopurinol es un análogo de la hipoxantina que, al ser metabolizado por el parásito, se transforma en el nucleótido trifosfato de aminopirazolpirimidina que, a su vez, se incorpora al RNA celular causando una inhibición de la síntesis de proteínas. Sin embargo, en ensayos clínicos tanto en LC como el LV ha mostrado ser poco efectivo. Actualmente se usa como tratamiento de la leishmaniosis canina.

La sitamaquina o WR6026 fue desarrollada durante la segunda guerra mundial como un posible compuesto antimalárico y su efectividad contra *L. donovani* ha sido demostrada en hamsters, mostrando mejores resultados que los antimoniales. Además, los resultados alentadores contra la LV en India y Kenia en ensayos clínicos 2b y su administración oral la perfilan como una molécula prometedora. Su mecanismo de acción aún se desconoce, pero se sabe que produce una muerte similar a apoptosis en el parásito. **(37,38)**

## 1.2 Biología Celular, Molecular y Bioquímica de *Leishmania*

Además de poseer particularidades bioquímicas y moleculares, los *Tripanosomátidos* también comparten características tanto con eucariotas como con procariotas, debido probablemente a su pronta divergencia del árbol filogenético de los eucariotas (39). Por ello, tanto los parásitos protozoos del genero *Trypanosoma* como *Leishmania* son considerados “organismos antiguos”.

*Leishmania* posee dos formas durante su desarrollo y diversos reservorios y huéspedes mamíferos, por lo cual es considerado un parásito dimórfico y heteroxeno. Cada una de las formas corresponde a una adaptación a diferentes condiciones micro ambientales (disponibilidad de nutrientes, pH y temperatura) a las que el parásito se ve expuesto en sus diferentes hospederos: el mamífero y el insecto vector. En el insecto vector, *Leishmania* se replica de manera extracelular en forma de promastigote dentro del intestino, estando expuesto a una temperatura de 22-28°C y un pH de aproximadamente 8,5. En el momento en que los promastigotes son inoculados dentro del hospedero mamífero y son internalizados por los macrófagos de la piel, los promastigotes son expuestos a una temperatura de 31-35 °C y a un pH de 4,5-6,0. Este cambio de temperatura y pH promueve la transformación de promastigote a amastigote dentro del fagolisosoma (40). Sin embargo, a pesar de las diferencias entre estos ambientes, las adaptaciones que el parásito ha adquirido garantizan su supervivencia ante estos cambios. Además de las diferencias morfológicas evidentes (**Figura 1.4**), cada una de estas formas del parásito tiene también diferencias nutricionales, diferencias en la tasa de replicación y diferencias en las moléculas de superficie expresadas durante estos estadios (6,41).



Formas de promastigote y amastigote de *Leishmania spp.*

**Figura 1.4 | Estadios del Parásito.** El amastigote intracelular es más pequeño que la forma extracelular del parásito, el promastigote.

Tanto en promastigotes como amastigotes, el núcleo está rodeado por retículo endoplásmico y contiene un marcado nucleolo de un diámetro aproximado de 1 µm. El genoma nuclear de *Leishmania* tiene un tamaño de 33 Mb y se encuentra contenido generalmente en 34-36 cromosomas (42,43). El genoma posee secuencias policistrónicas de hasta cientos de genes transcritas a partir una región “*switch*” que define el sitio de inicio de la actividad de la RNA polimerasa II. Aunque los genes se encuentran agrupados de tal manera que recuerdan la organización policistrónica bacteriana, generalmente la función de los genes no está relacionada entre sí como en el caso de las bacterias (17,18,44). Los transcritos primarios generados, que en un principio pueden contener decenas o cientos de genes, son subsecuentemente procesados para generar transcritos maduros monocistrónicos. Durante este proceso, por un mecanismo de *transplicing*, a todos los mRNAs codificantes se les añade una secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5’ conocida como mini-exón (45). Así mismo, estos mRNAs sufren un proceso de poliadenilación en el extremo 3’ (46). Ambos procesos son realizados de manera simultánea (47).

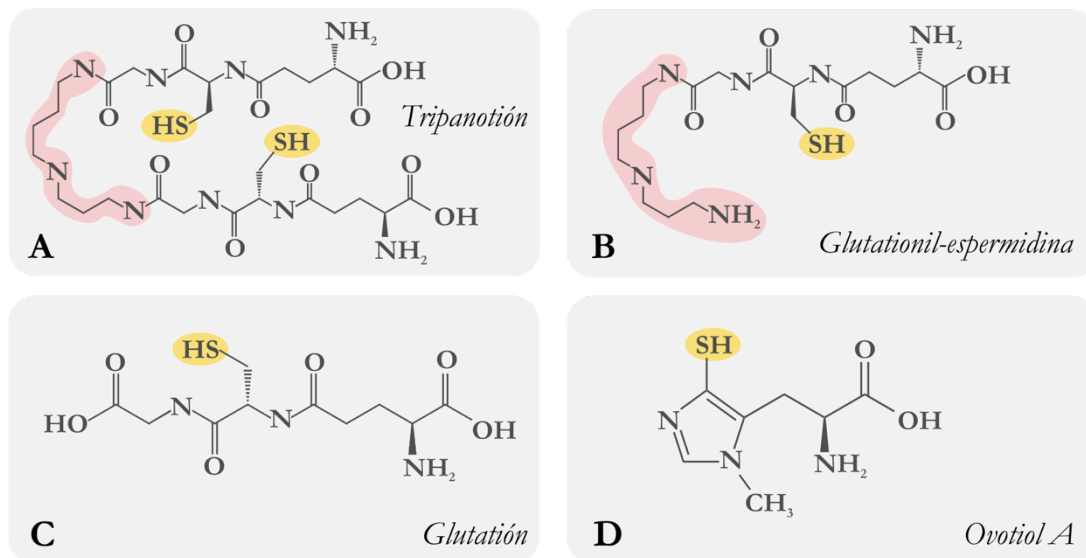
El kinetoplasto, que es el nombre que se le da al DNA mitocondrial de los tripanosomátidos, corresponde al 15% del DNA total de la célula y está conformado por 2 000-10 000 copias

de minicírculos concatenados, de aproximadamente 1 kb, que contienen secuencias que guían la edición del RNA del kinetoplasto (RN<sub>Ak</sub>) y por 20-25 maxi círculos de 20 kb que codifican RN<sub>A</sub>r y proteínas relacionadas con la generación de energía mitocondrial, como las subunidades de la citocromo oxidasa y la NADH deshidrogenasa (48).

### 1.2.1 Metabolismo de *Leishmania spp.*

En lo referente a la generación de energía, el parásito depende de la glicolisis y la fosforilación oxidativa. El orgánulo relacionado con la generación de ATP por vía glicolítica es el glicosoma, que es único de los tripanosomátidos. Del glicosoma sale 3-fosfo-glicerato hacia citoplasma, donde es transformado hasta piruvato con la subsecuente formación de ATP a partir de ADP. El glicosoma también se encarga de procesos como la beta-oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de pirimidinas y el metabolismo de purinas (49). En lo que respecta a la fosforilación oxidativa, esta se lleva a cabo a nivel mitocondrial y es similar a la de eucariotas superiores, con un ciclo de *Krebs* activo en ambos estadios parasitarios. Sin embargo, existen algunas diferencias a destacar entre las que se encuentran la presencia de un complejo mitocondrial I atípico y la presencia de NADH oxidasas alternativas similares a las de las plantas (50).

Tras ser fagocitado por el macrófago, el parásito debe sobrevivir a la exposición de oxidantes tóxicos como el peróxido de hidrogeno y el anión superóxido. Para esto, *Leishmania* cuenta con un sistema de control del estrés oxidativo basado en la conjugación de 2 moléculas de glutatión y una de espermidina. Este conjugado es conocido como tripanotión y es análogo al sistema del glutatión en eucariotas superiores (Figura 1.5A). El tripanotión entonces hace las veces de reductor permitiendo que el sistema redox de la célula pueda eliminar los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) a través de las múltiples triparedoxinas. Aunque en el parásito se encuentran diferentes tioles de bajo peso molecular tales como el glutatión, el ovotiol A (51) y la glutationil-espermidina, el tripanotión es el más abundante en la célula por lo que debe permanecer en un estado reducido. La reducción es catalizada por la (52) enzima tripanotión reductasa (TryR) que, por medio del NADPH formado en la vía de las pentosas-fosfato (VPP), cumple esta función. La ausencia de catalasas en estos parásitos se compensa por la presencia de altas concentraciones de peroxiredoxinas y, en el caso de los IRO, el parásito cuenta con diferentes superóxido dismutasas localizadas en distintos compartimientos celulares como los ya mencionados glicosomas(50,53,54).



**Figura 1.5 | Tioles de bajo peso molecular en *Leishmania spp.*** **A.** Tripanotión reducido, **B.** Glutathionil-espermidina, **C.** Glutathión reducido y **D.** Ovotiol A. En rosa se muestra el motivo espermidina y en amarillo los grupos sulfhidriilo de las moléculas.

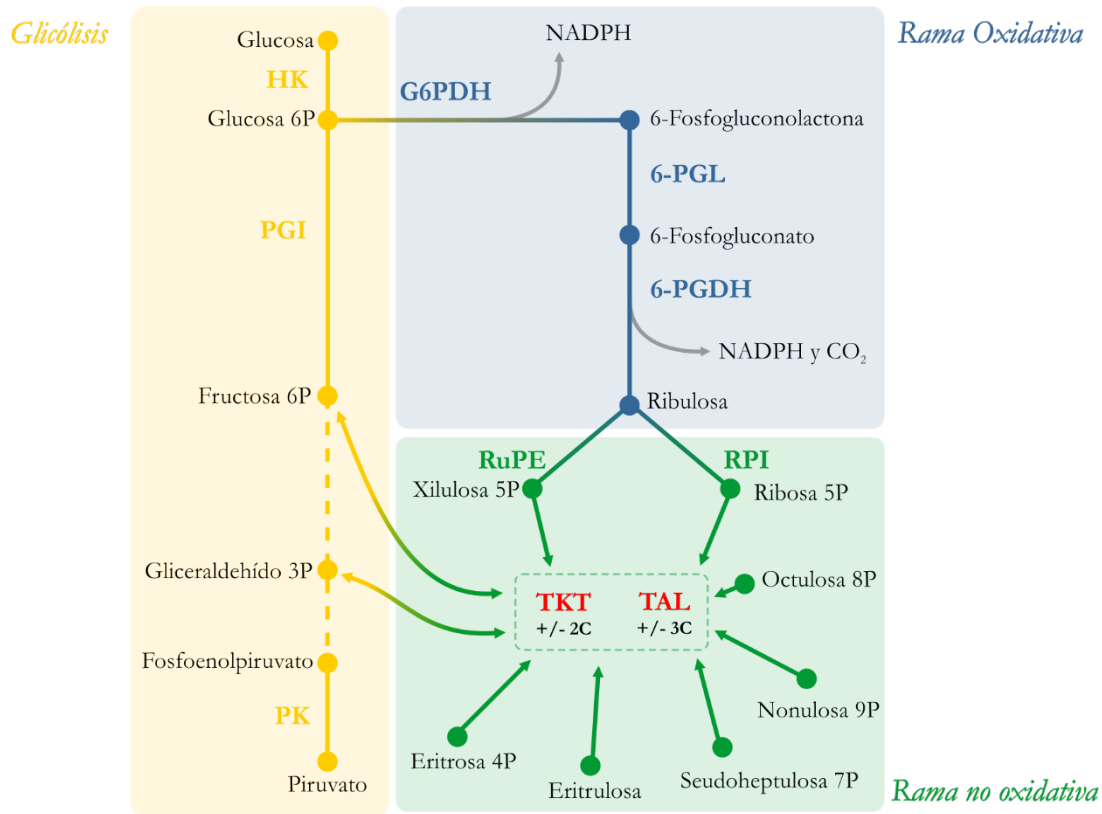
Las intrincadas relaciones que se dan entre el hospedador y el parásito, los procesos infecciosos y, en algunos casos, la identificación de blancos terapéuticos, son altamente dependientes del metabolismo del parásito. Por ello, la reconfiguración metabólica y las variaciones que puedan presentar en sus enzimas como consecuencia de mutaciones en el genoma contribuyen tanto a la resistencia a tratamientos como a la evasión de la respuesta inmune del hospedador.

Debido a su función en el suministro de NADPH, la vía de las pentosas es de gran importancia en la patología de estos parásitos y puede ser un interesante blanco terapéutico.

### 1.2.1.1 Vía de las pentosas fosfato (VPP)

La vía de las pentosas fosfato es un componente fundamental del metabolismo celular. Es importante para mantener la homeostasis, proveer de precursores de la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, generar moléculas reductoras y combatir el estrés oxidativo (55). La ruta comparte reacciones con la ruta de *Enter-Doudoroff* y el Ciclo de *Calvin* y se divide en una rama oxidativa y otra no-oxidativa. La rama oxidativa es muy activa en la mayoría de eucariotas y convierte la glucosa 6-fosfato en dióxido de carbono, ribulosa 5-fosfato (Ru5P) y NADPH. La producción de este último es esencial en el mantenimiento del balance redox en las situaciones de estrés. La vía no oxidativa es virtualmente ubicua y en ella se dan una

compleja secuencia de reacciones que permiten convertir entre sí azúcares C3, C4, C5, C6 y C7 para formar finalmente fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato que podrán entrar directamente en la glucólisis (56). (Figura 1.6)



**Figura 1.6 | Vía de las pentosas fosfato.** En *Leishmania spp.* esta vía puede llevarse a cabo tanto dentro de glicosoma como en el citosol. La glucosa 6P puede ser metabolizada ya sea por glicólisis (amarillo) o por la rama oxidativa de la VPP (azul). Ya que la rama no oxidativa (verde) puede ser considerada como una ruta relativamente promiscua, se representa como un centro intercambiador de carbonos(56,57). Enzimas: HK (hexoquinasa), PGI (fosfoglucoasa isomerasa), PK (piruvato quinasa), G6PDH (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa), 6-PGL (6-fosfogluconolactonasa, 6-PGHD (6-fosfogluconato deshidrogenasa), RuPE (ribulosa-5-fosfato epimerasa), RPI (ribosa-5-fosfato isomerasa), TKT (transketolasa), TAL (transaldolasa).

Los kinetoplastidios tienen una VPP completamente funcional. Estudios realizados tanto en *Trypanosoma cruzi* como en *Leishmania mexicana* han mostrado que esta vía es la responsable de metabolizar entre un 5 y un 10 % de la glucosa total (58,59). La mayoría de las enzimas canónicas de la vía tienen homólogos en estos parásitos y han sido clonadas, caracterizadas y cristalizadas en al menos uno de los tripanosomátidos de interés clínico (55). Aunque la mayoría de ellas son citosólicas, también han sido localizadas en los glicosomas (60).

El papel de las enzimas de la VPP en el glicosoma está relacionado con el intercambio de intermediarios con la vía glicolítica, el suministro de la ribosa 5-fosfato para la síntesis de

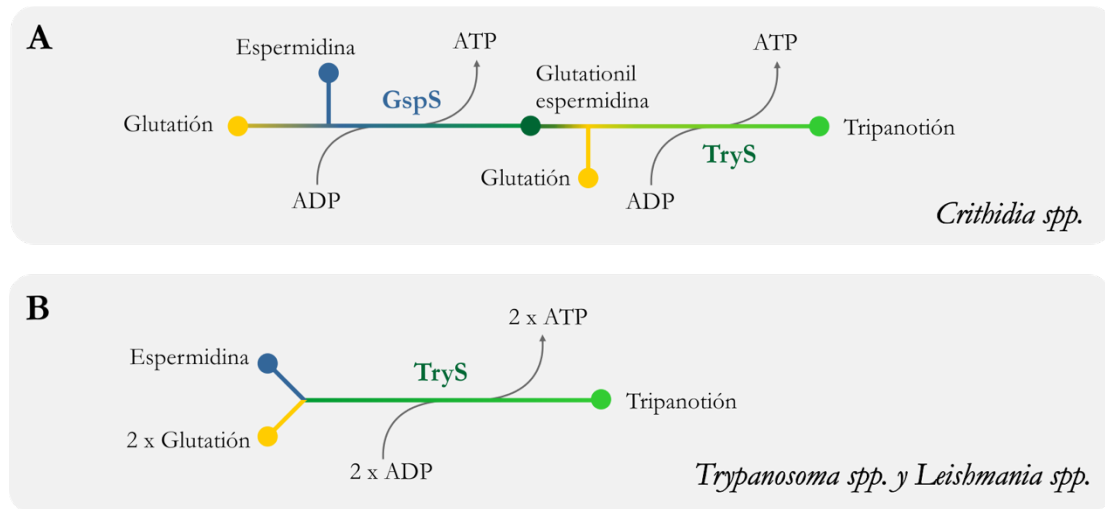
nucleótidos (que también se lleva a cabo en el glicosoma) y el suministro del NADPH para el sistema antioxidante del parásito. Este último papel es también de vital importancia en el citosol ya que, como se mencionó, en los tripanosomátidos la responsabilidad antioxidante recae enteramente sobre el tripanotión (55). Junto con la tripanotión reductasa, el tripanotión realiza todas las funciones que el sistema glutatión (GSH)/ glutatión reductasa (GR) tiene en otras células (61). Por lo tanto, gran parte del sistema antioxidante del parásito recae sobre el tripanotión, cuya reducción requiere del NADPH aportado por la VPP. Debido al rol esencial de esta vía en el metabolismo antioxidante, existen varios estudios centrados en la regulación de las enzimas que en ella participan como, por ejemplo, la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (62). Sin embargo, en este trabajo, vamos a centrarnos en el metabolismo del tripanotión y en la tripanotión reductasa.

### 1.2.1.2 Síntesis del tripanotión

La síntesis del tripanotión depende de la síntesis del glutatión (GSH) y la espermidina (Spd) seguido por la conjugación de ambos metabolitos. Como en otros organismos, el GSH es generado por la gama-glutamyl-cisteína sintetasa y la glutatión sintetasa, ambas proteínas esenciales (63,64). En *Leishmania spp.* la concentración de tripanotión en su forma reducida es mantenida entre 1 y 2 mM tanto por su síntesis *de novo* como por la reducción, mediante la TryR, de la especie oxidada (63).

Cuando hace más de 30 años se dilucidó la ruta de biosíntesis del tripanotión ( $T[SH]_2$ ), se pensó que su síntesis era llevada a cabo por dos enzimas diferentes. La primera de ellas era la glutationil-espermidina sintetasa (GspS) que, como su nombre indica, era la encargada de ligar una molécula de GSH a una molécula de espermidina (Spd) generando la glutationil-espermidina (Gsp). El proceso de biosíntesis se completaba por la Tripanotión Sintetasa (TryS), encargada de unir una segunda molécula de GSH a la glutationil-espermidina generada (Figura 1.7 A). De hecho, estas dos actividades enzimáticas pueden ser aisladas (GspS y TryS) y caracterizadas por separado (65).

Sin embargo, en 2002 Oza y colaboradores demostraron que la TryS era capaz de realizar ambos pasos en *T. cruzi* (66). Posteriormente esto fue confirmado en *T. brucei*, *C. fasciculata* y diferentes especies de *Leishmania* (67,68). (Figura 1.7 B)



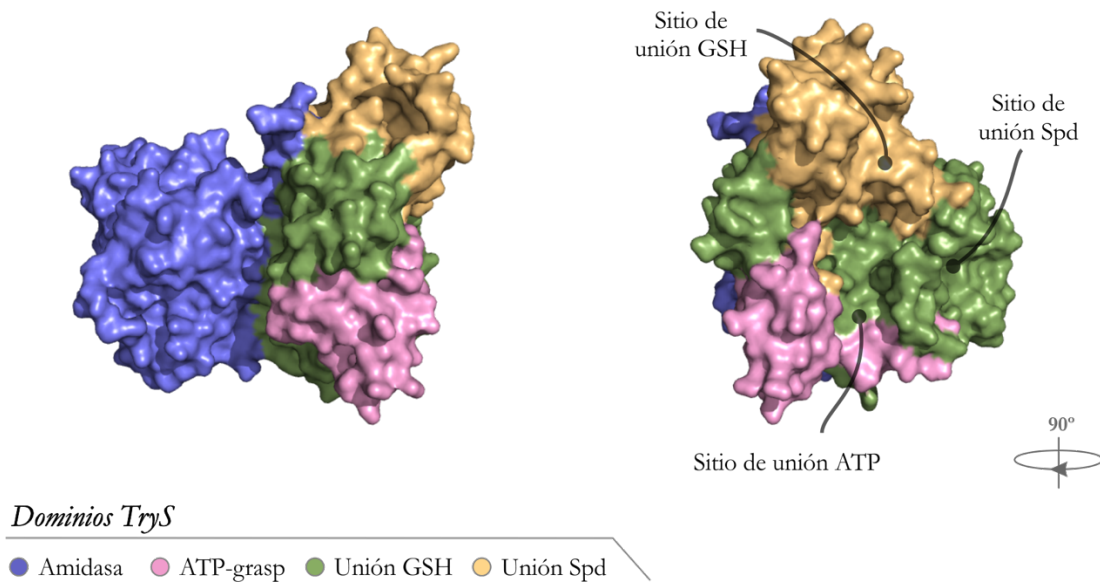
**Figura 1.7 | Síntesis del Tripanotión.** **A.** En *Crithidia spp.* la síntesis del T(SH)<sub>2</sub> está a cargo de la glutacionil-espermidina sintetasa (GspS) y la tripanotión sintetasa, **B.** En *Leishmania spp.* y *Trypanosoma spp.* en la síntesis solo participa la TryS.

En el caso *C. fasciculata*, tanto GspS como TryS son funcionales, pero solo la última es esencial (66). En *Leishmania spp.* se han detectado pseudogenes de GspS (67). Ello, aunado a estudios filogenéticos en los cuales la TryS se agrupa con la GspS de procariontes, permite postular que ambas enzimas pudieron haber divergido de la duplicación de una GspS ancestral (ambas comparten una identidad de más del 50%). Posteriormente, una de las copias evolucionó generando la TryS actual que es capaz utilizar dos sustratos diferentes. Lo anterior explicaría porque *C. fasciculata* mantiene ambas proteínas, en *Leishmania spp.* existen pseudogenes de GspS (proceso de pérdida del gen) y en *Trypanosoma spp.* solo se encuentra TryS (67,68).

La adjudicación en un principio a GspS y TryS como encargadas de la producción del tripanotión es explicada fácilmente al tener en cuenta que los experimentos iniciales realizados por Fairlamb y colaboradores se hicieron utilizando *Crithidia fasciculata* (69,70).

Por medio de la genética inversa, se demostró que en parásitos de *Trypanosoma* deficientes en TryS la caída de la concentración de tripanotión estaba asociada con la disminución también de la glutacionil-espermidina y un aumento del glutación, lo que indicaba que la TryS catalizaba la síntesis de tripanotión a partir de GSH y espermidina *in-situ* (71).





**Figura 1.8 | Dominios de la Tripanotión Sintetasa.** Se muestra la TryS con sus dominios amidasa (azul), ATP-grasp (rosa), de unión al GSH (amarillo), de unión a Spd (verde) y un giro de 90°. En el dominio sintetasa se muestran los sitios de unión del GSH, Spd y ATP. (PDB: 2VPS)

El manejo de dos sustratos tan distintos como Spd y glutationil-espermidina por una misma enzima puede ser explicado por un mecanismo en el cual los sitios de unión para el ATP, el GSH y la Spd están organizados de una manera tal que el GSH tras ser fosforilado en el carboxilo de su glicina permite la glutationilación en el N<sup>1</sup> de la espermidina. Tanto el dominio de unión del ATP (ATP-grasp) como el dominio de unión del glutatión son dominios bien estructurados. Los dominios ATP-grasp son conocidos por unir de manera particularmente fuerte la molécula de ATP, lo que hace prácticamente imposible su liberación antes de que sea hidrolizada. Sin embargo, el dominio de unión de Spd es particularmente plano y, de acuerdo a los modelados realizados, permite el movimiento de la molécula de glutationil-espermidina tras su formación de tal forma que el N<sup>8</sup> queda ubicado en el sitio activo y es glutationilado por el glutationil fosfato (72).

Las dos actividades enzimáticas implicadas en la glutationilación de la Spd (GspS y TryS) tienen también el potencial de cortar el tripanotión reducido, aunque su actividad amidasa es mucho más débil que su actividad ligasa (73). Esta reacción amidasa, sin embargo, no es la reacción reversa de la de ligación ya que se lleva a cabo en otro dominio catalítico independiente. Bajo esta premisa, la enzima podría, en principio, catalizar un ciclo fútil de síntesis y degradación de tripanotión. El significado fisiológico de esta actividad amidasa es aún desconocido, pero se especula que podría participar en el mantenimiento del balance

entre GS, Spd, glutationil-espermidina y TS, cada uno de los cuales por separado puede cumplir un rol fisiológico específico (68,73,74).

### 1.2.1.3 *Relevancia biológica del Tripanotión*

El tripanotión es mucho más que dos moléculas de glutatión unidas entre sí por una espermidina. Es también mejor reductor que el glutatión aunque el potencial redox de los tioles sea similar ( $-240 \pm 10$  mV para GSH y  $-242$  mV para el T[SH]<sub>2</sub>) (75). El tripanotión es un ditiol en una sola molécula y la formación del disulfuro intramolecular es cinéticamente más favorable que la oxidación intermolecular necesaria para formar GSSG (76,77). Además, el grupo amino cargado positivamente en el puente espermidina confiere a los tioles del T(SH)<sub>2</sub> un valor de pK de 7.4, coincidente con el pH fisiológico, lo que le permite ser altamente reactivo en los procesos de intercambio de tioles (76,77). Por lo anterior, el tripanotión está involucrado en muchos procesos celulares tales como: i) protección del DNA (ayudado por la carga positiva del ditiol) del daño generado por los radicales inducidos por la radiación (78); ii) eliminación de peróxido de hidrogeno, (siendo mucho más eficiente que otros tioles presentes en los tripanosomátidos como el GSH, el Gsp y el ovotiol (51)); iii) Reacción con el peroxinitrito, con reactividad superior a la de Gsp y GSH (79); iv) reducción de disulfuros proteicos y no proteicos tales como tioredoxinas y triparedoxinas, glutatión y ovotiol (51) (fue el primer tiol de bajo peso molecular que se demostró reducía de manera directa la ribonucleotido reductasa (80)); v) participación en los mecanismos de resistencia frente a agentes quimioterapéuticos (81) y vi) detoxificación del metilglioxal (aldehído pirúvico) que, en casi todos los organismos, es detoxificado por un sistema de glioxilasas I y II dependientes de GSH (82). En *L. major* y *L. donovani* este sistema emplea el T(SH)<sub>2</sub> como cofactor (83).

## 1.3 Tripanotión Reductasa

### 1.3.1 Generalidades

Según las recomendaciones del comité para nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), la tripanotión reductasa (EC 1.8.1.12):

- Es una oxidoreductasa (EC1).
- Actúa sobre un grupo sulfhidrilo del donador (EC1.8).
- Utiliza NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptor (EC.1.8.1).
- Utiliza T(SH)<sub>2</sub> como donador (EC.1.8.1.12).

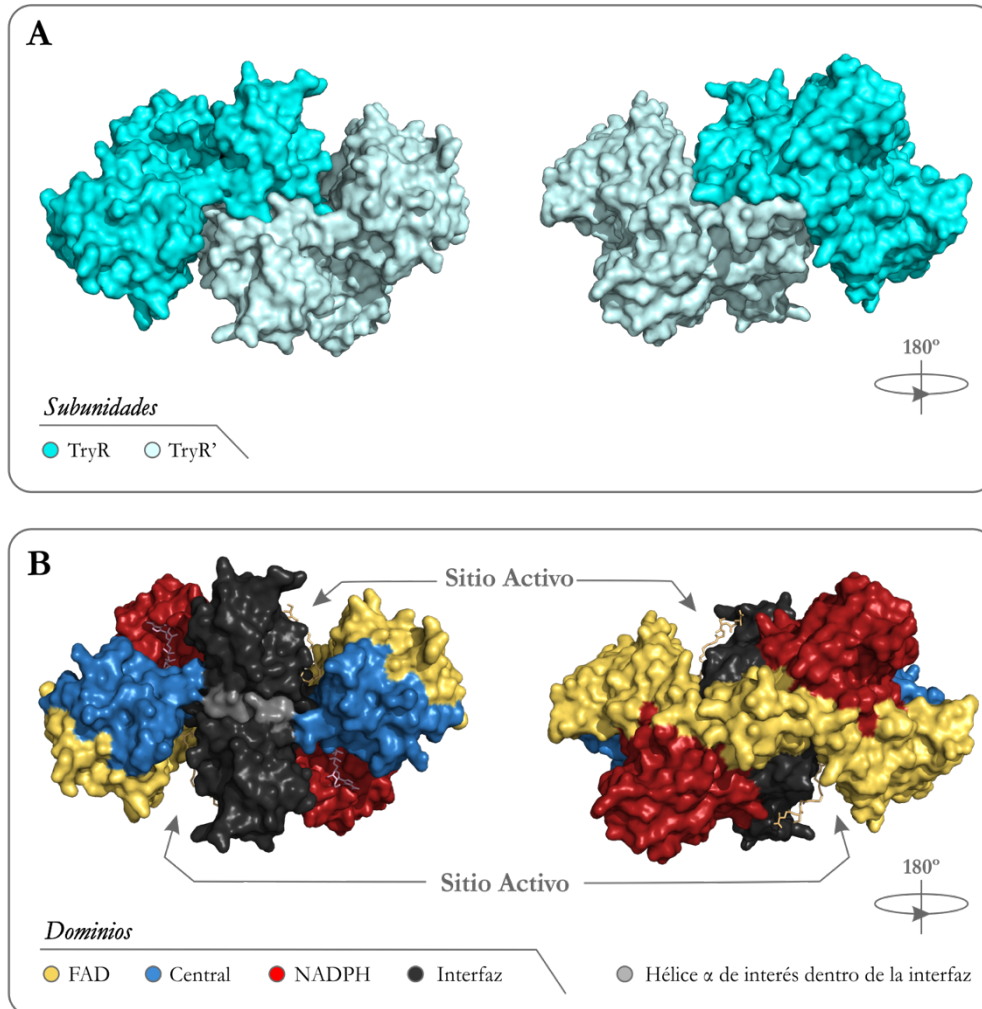
Resulta claro que esta nomenclatura hace referencia a la reacción inversa a la habitualmente catalizada por la enzima en la célula (**Ecuación 1.1**).



Más comúnmente, a la TryR se la reconoce como perteneciente a la familia de las oxidoreductasas de FAD, junto a glutatión reductasa (GluR), lipoamida deshidrogenasa (LPADH) y tioredoxina reductasa (TROR). Esta flavoenzima es la encargada de mantener el biotiol principal de los tripanosomátidos: el N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-(bisglutationil)-espermidina disulfuro conocido también como tripanotión disulfuro o simplemente como **tripanotión oxidado** (TS<sub>2</sub>) en su estado reducido (N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-(bisglutationil)-espermidina), conocido como dihidrotripanotión o simplemente **tripanotión reducido** (T[SH]<sub>2</sub>). Esta enzima es homóloga a la ubicua glutatión reductasa (GluR), encargada de mantener un ambiente intracelular reductor, pero ausente en los tripanosomátidos como *Leishmania spp.* y *Trypanosoma spp.* (75,83,84).

El gen de la tripanotión reductasa (*tryr*) de *L. infantum* es un gen de copia única de 1476 pb (LinJ.05.0350) que se encuentra localizado en el cromosoma 5 entre los nucleótidos 105 717 y 107 192. El producto de este gen es una enzima dimerica de simetría C2 compuesta por dos subunidades de 491 aminoácidos cada una y que pueden ser subdivididas en cuatro dominios: i) dominio de unión al FAD; ii) dominio de unión al NADPH; iii) dominio central

y iv) dominio de la interfaz. Cada dímero cuenta con dos sitios activos idénticos conformados por el dominio de unión al FAD y el dominio central de una subunidad y el dominio de la interfaz de la otra (84–87). (Figura 1.9)



**Figura 1.9 | Subunidades y dominios de la tripanotión reductasa. A.** Se muestra el dímero de la tripanotión reductasa conformado por las subunidades TryR y TryR' y un giro de 180°. **B.** Las mismas vistas de TryR presentadas en la figura A, diferenciando los dominios que la constituyen y la ubicación de los sitios activos conformados por aminoácidos procedentes de ambas subunidades. Nótese los dominios de unión al NADPH con la molécula en rosa y las moléculas de T(SH)<sub>2</sub> en amarillo en los sitios activos. (PDB: 4ADW)

La tripanotión reductasa comparte con la GluR muchas de sus propiedades en lo que a estructura y mecanismo de reacción se refiere. Mientras que el glutatión ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) está involucrado en la regulación de diversos aspectos del metabolismo, su forma tiol (GSH) funciona como un agente protector manteniendo el ambiente reductor intracelular. El GSH puede ser oxidado a glutatión disulfuro (GSSG) y esta reacción

potencialmente puede generar radicales dañinos y oxidantes. La GluR asegura el mantenimiento de una alta concentración de tioles catalizando la reducción del GSSG. Los tripanosomátidos usan el sistema TryR/T(SH)<sub>2</sub> en lugar del GluR/GSH, para realizar esta función protectora (81,84–87).

| Característica                  | Tripanotión Reductasa  | Glutación Reductasa |
|---------------------------------|------------------------|---------------------|
|                                 | <i>Leishmania spp.</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| Flavina                         | FAD                    | FAD                 |
| Dinucleótido                    | NADPH                  | NADPH               |
| Sustrato                        | TS <sub>2</sub>        | GSSG                |
| Carga del sustrato              | +1                     | -2                  |
| Subunidad (kDa)                 | 53,2                   | 52,5                |
| Aminoácidos por subunidad       | 491                    | 460                 |
| Estructura Oligomérica          | Dímero                 | Dímero              |
| K <sub>M</sub> Tripanotión (μM) | 25                     | -                   |
| K <sub>M</sub> Glutación (μM)   | -                      | 65                  |
| K <sub>M</sub> NADPH (μM)       | 10                     | 9                   |

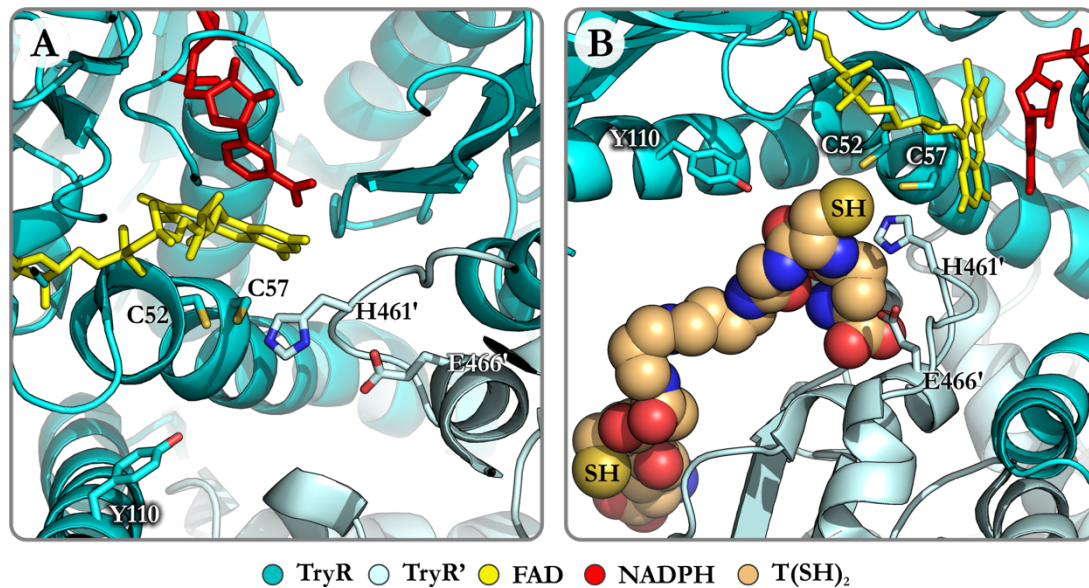
**Tabla 1.1** | Propiedades físico-bioquímicas de la tripanotión reductasa de *Leishmania spp.* y la glutación reductasa humana (75).

### 1.3.2 Sitio Activo

El sitio activo de la TryR no es un dominio como tal en una de las subunidades sino que está compuesto de residuos de los dominios FAD, NADPH y central de un monómero y el dominio interfacial del otro. Los sitios de unión del TS<sub>2</sub> y el NADPH se encuentran herméticamente separados por el anillo isoaloxazina del FAD (84) (Figura 1.10).

El sitio de unión del tripanotión de TryR se asemeja al del glutación de la GluR y la mutua especificidad exclusiva de las dos enzimas está dada por la amplitud de la cavidad y la distribución de las cargas en el sitio de unión al sustrato. La región externa del sitio activo de TryR es significativamente más amplia que la de GluR. De los 19 residuos que rodean al GSSG unido a GluR y solo 5 no se encuentran conservados en TryR; entre estos, 3 argininas que se encuentran sustituidas por residuos neutros o ácidos en la enzima del parásito. Estas alteraciones se correlacionan con las diferencias de carga que existen entre los sustratos GSSG (-2) y TS<sub>2</sub> (+1) (84). El tripanotión interacciona con el Glu108, la

Tyr 110 y el Glu18 del dominio FAD de uno de los monómeros y con la His461' del dominio interfacial de la otra subunidad. Además, la His461' cumple un rol en el mecanismo de reducción del tripanotión actuando como un intercambiador de protones estabilizado por el Glu466' (81,88). El dominio FAD también alberga las dos cisteínas catalíticas del sitio activo que son responsables de la transferencia del poder reductor desde el NADPH al TS<sub>2</sub>: la Cys57 y la Cys52. (Figura 1.10 B)



**Figura 1.10** | Centro Activo de la Tripanotión Reductasa. **A.** Vista general del sitio activo con los aminoácidos relevantes de ambas subunidades mostrados como varillas, **B.** Vista desde otro ángulo del sitio activo mostrando el tripanotión reducido. Se representan como varillas (“sticks”) el FAD (Amarillo) y el NADPH (Rojo) y como esferas (“CPK”) el tripanotión reducido (átomos de C en marrón claro). (PDB: 4ADW)

En resumen, el sitio activo de TryR posee carga negativa y es más grande e hidrófobo que el de GluR, siendo esta diferencia de cargas la causa fundamental de la discriminación de estas enzimas hacia sus respectivos sustratos. Ambas comparten entre sí más de un 30% de su secuencia y los residuos clave para la ejecución de su acción catalítica están conservados (69,70) (Tabla 1.2). Se sugiere que su acción catalítica se realiza por un mecanismo *ping-pong* dividido en dos fases que se encuentra desarrollado en el **Apartado 1.3.6.**

| Función  | Tripanotión Reductasa      | Glutati3n Reductasa |
|--|----------------------------|---------------------|
|  | <i>Leishmania infantum</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| Disulfuro sitio activo                             | Cys52                      | Cys58               |
| Disulfuro sitio activo                             | Cys57                      | Cys63               |
| Se apila entre los extremos del TS <sub>2</sub>    | Tyr110                     | Tyr114              |
| Base sitio activo                                  | His461'                    | His467'             |
| Puentes de hidr3geno a histidina del sitio activo. | Glu466'                    | Glu472'             |

**Tabla 1.2** | Residuos catal3ticos de la tripanot3n reductasa y comparaci3n con la glutati3n reductasa humana. El ap3strofo en los residuos indica que forman parte de la otra subunidad (75,81).

### 1.3.3 Dominio de Uni3n al FAD y Dominio Central

El dominio de uni3n al FAD est3 constituido por los residuos 1 al 161 y el dominio central por los residuos 289 al 260. Algunos autores describen que el dominio central, a pesar de no estar contiguo en la secuencia primaria, forma parte del dominio de uni3n al FAD (81).

Adem3s de la diferencia de cargas que existe entre los sitios activos de la GluR y la TryR, tambi3n hay una diferencia de tama3o entre estos. La diferencia en el espacio disponible en el sitio activo de la TryR con respecto a la GluR se debe a las rotaciones de las h3lices  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  (residuos 13-27 y 91-117) del dominio de uni3n al FAD. Las cadenas laterales de la Lys 28 y el Glu 118, que se encuentran conservadas en todas las TryR, est3n ausentes en la GluR. Estos dos residuos forman un puente salino que estabiliza la orientaci3n relativa de ambas h3lices. Por otra parte, las diferentes distribuciones de carga en los sitios activos vienen dadas por la existencia de 3 argininas en la GluR cuyas posiciones equivalentes est3n ocupadas por amino3cidos neutros o 3cidos (81).

Otra peculiaridad estructural de la TryR que influye sobre la posici3n de la h3lice  $\alpha 3$  es la existencia de un asa de 9 residuos justo enfrente de la secuencia catal3tica que est3 conservada en todas las FAD disulfuro oxidoreductasas. Varios 3tomos de este asa se encuentran a una distancia susceptible de formar enlaces de hidr3geno con el Asp 100 y la Asn 107 de la  $\alpha 3$  (84).

Como en otras prote3nas dependientes de FAD, el cofactor se une a la TryR en una configuraci3n extendida en la cual el anillo *o*-xileno de la isoaloxazina se encuentra alojado

en un bolsillo hidrófobo, mientras que el motivo pterina está fuertemente unido a la enzima mediante un enlace de hidrógeno entre N3 y el oxígeno del carbonilo de la Lys60. Los sitios de unión del disulfuro del tripanotión oxidado y del NADPH se encuentran aislados entre sí por la presencia del anillo de isoaloxazina del FAD **(89)**.

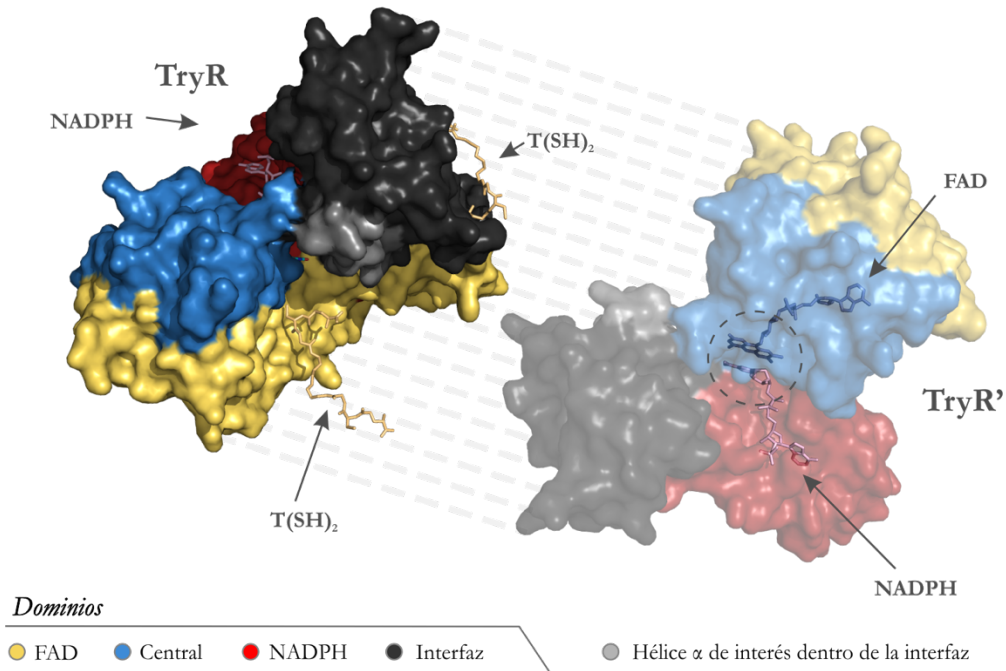
#### 1.3.4 Dominio de Unión al NADPH

Con respecto al dominio de unión al NADPH, la adenina del cofactor no interactúa directamente con la proteína, mientras que el grupo 2'-fosfato está fuertemente unido, a través de sus átomos de oxígeno, con las cadenas laterales de la Arg 222, la Arg 228 y la Tyr 221. Esta última tirosina es importante para la discriminación entre el NADPH y el NADH ya que en la GluR humana, que sí es capaz de unir NADH, este residuo corresponde a una isoleucina. El grupo pirofosfato se encuentra unido por medio de enlaces de hidrógeno a la Tyr 198 y a la Ile 199. La nicotinamida interactúa con el Glu 202 y la Ala 365 mientras que la ribosa interactúa con la Met 333 **(81,84)**.

#### 1.3.5 Dominio de la Interfaz de Dimerización

La interfaz de dimerización muestra una superficie relativamente grande de  $\sim 3190 \text{ \AA}^2$  accesible al disolvente y con unas características mayoritariamente apolares. En particular, la interfaz está compuesta de un 30% de residuos polares, 53% de residuos no polares y un 17% de residuos cargados. Los residuos que establecen enlaces de hidrógeno estabilizando la interfaz son: Lys 61, Gly 66, Phe 79, Gly 80, Trp 81, Asn 91, Tyr 210, Glu 436, Gln 439, Ser 440, Val 460, Pro 462, Ser 464 y Ala 465. Mientras que algunas de las interacciones descritas se encuentran conservadas en la GluR, otras son exclusivas de TryR: i) residuos en el asa que conecta las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del dominio de unión al FAD; ii) Tyr 210 del dominio de unión al NADPH y iii) Ser 440 de la interfaz. Al igual que en GluR, la interfaz contiene dos hendiduras catalíticas simétricas en las cuales se lleva a cabo la reducción del TS<sub>2</sub> **(81,84)**.





**Figura 1.11 | Subunidades de TryR separadas.** Separación de la tripanotión reductasa dimérica en sus monómeros TryR y TryR'. La TryR' se muestra translúcida para que se puedan ver las moléculas de NADPH y FAD unidas.

Cada hendidura está formada por la hélice  $\alpha_1$  y el extremo N terminal de la hélice  $\alpha_2$  del dominio de unión al FAD, por la única hélice  $\alpha$  del dominio central de la misma subunidad y las asas 395-398, 433 y 458 ubicadas en el dominio de la interfaz de la otra subunidad (81,84).

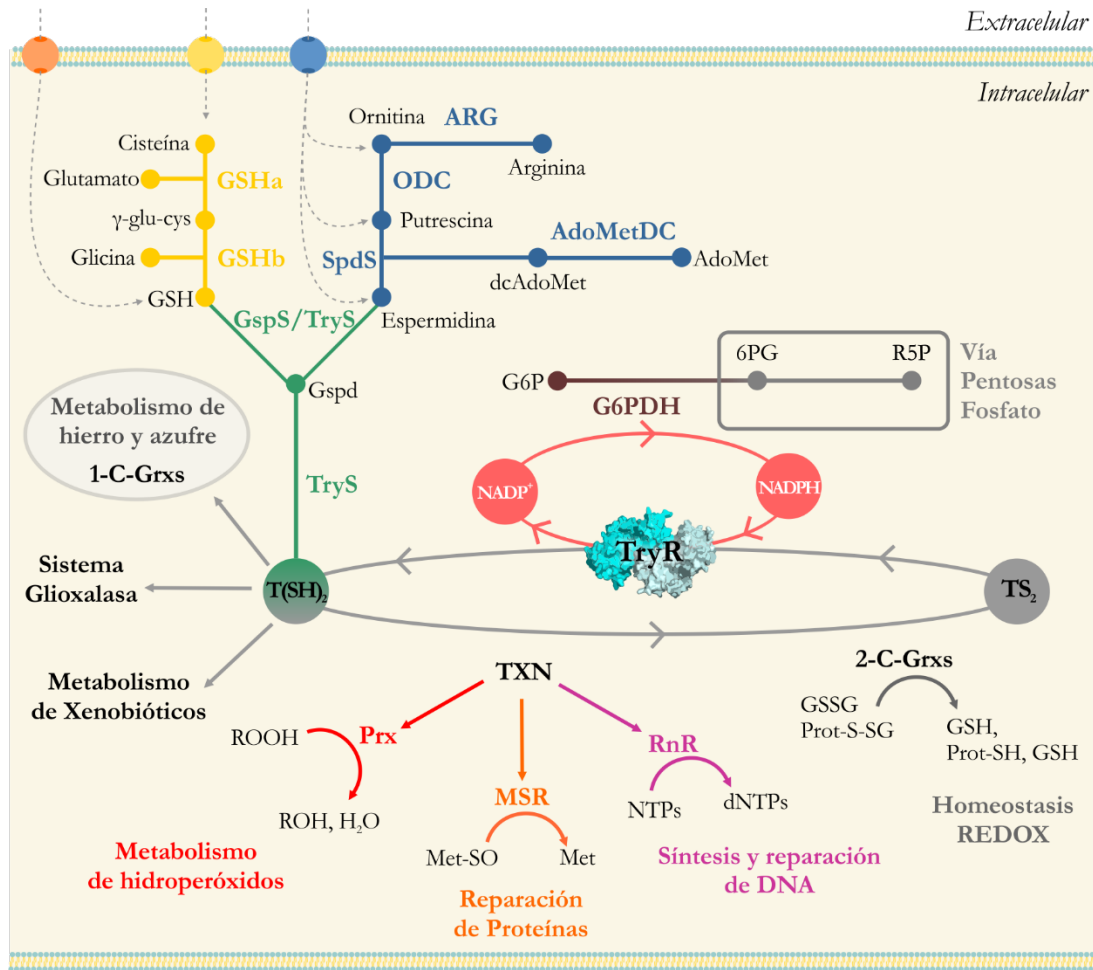
El dominio de la interfaz contiene 3 hélices  $\alpha$ , de las cuales la  $\alpha_2$  (435-447) es sobre la que se centra el interés de esta investigación. En la **Figura 1.11** se esquematiza la separación de la enzima en sus monómeros TryR y TryR'. En TryR se presenta en gris la hélice  $\alpha_2$  dentro del dominio de la interfaz de dimerización (negro) y la interacción entre el T(SH)<sub>2</sub> y el dominio FAD (amarillo) y una segunda molécula de T(SH)<sub>2</sub> interaccionando con el dominio de la interfaz (negro). TryR' está representada con una envoltorio transparente que permite visualizar la molécula de NADPH unida en su dominio (rojo) y la interacción entre la nicotinamida del NADPH y el anillo isoaloxazina del FAD, el cual se encuentra enterrado entre el dominio de unión al FAD (amarillo) y el dominio central (azul).



La primera parte, denominada reductiva, hace referencia a la unión a la enzima del NADPH, que reduce a la flavina del FAD y permite la formación del complejo de transferencia de carga entre esta y la cisteína 57 del sitio activo, que previamente se encontraba en forma de cistina junto a la cisteína 52. Después de la formación de este complejo, el NADP<sup>+</sup> se disocia y es seguramente reemplazado por otra molécula de NADPH. En este estado la enzima se encuentra en la forma denominada EH<sub>2</sub>. En la segunda parte, denominada oxidativa, el tiol de la cisteína 52 es activado por la histidina 461' y el glutámico 466' de la otra subunidad de TryR, permitiendo la formación de un disulfuro mixto entre un azufre del tripanotión y el azufre de la cisteína 52. La cisteína 57 ataca a este disulfuro mixto dando lugar a la restauración del puente disulfuro entre ambas cisteínas de sitio activo y la liberación del tripanotión reducido T(SH)<sub>2</sub>. Esta forma oxidada de la enzima es la denominada E<sub>0</sub> o E<sub>ox</sub> (75,94,95).

### **1.3.7 Contexto biológico del sistema Tripanotión/TryR en *Leishmania spp.***

En el apartado de metabolismo de *Leishmania spp.* se ha hablado de la vía de las pentosas fosfato (VPP) que aprovisiona, entre otras, a la TryR de su cofactor el NADPH aportándole su poder reductor. Así mismo, se ha desglosado la síntesis *de novo* del tripanotión y su relevancia biológica. Hasta el momento se ha mencionado con asiduidad la importancia de la TryR en el mantenimiento del ambiente reductor de la célula y de su exclusividad en el parásito y vital importancia para su supervivencia. Sin embargo, esta narrativa quedaría incompleta si no se mencionan algunos otros actores íntimamente ligados a nuestra enzima como son, entre otros, la vía de las poliaminas que provee a la TryS de sus sustratos para generar tripanotión y las peroxiredoxinas que, utilizando el potencial reductor de este último, facilitan la destoxicación de los hidroperóxidos. Todo esto, en conjunto, constituye lo que se podría considerar una única ruta metabólica en la cual las enzimas que participan se encuentran estrechamente ligadas a los mecanismos de supervivencia e infectividad del parásito y la TryR ocupa un rol central. Estas rutas son esenciales y además se encuentran ausentes o son fundamentalmente diferentes en el organismo hospedador, por lo que se consideran como excelentes puntos de inicio para la identificación de nuevas dianas terapéuticas específicas del parásito en la búsqueda de fármacos leishmanicidas (63,96–98).



**Figura 1.13 | Metabolismo del Tripanotión.** El esquema resume las diferentes vías implicadas en la síntesis, reducción y utilización del tripanotión. Metabolitos y enzimas implicadas en la captación y biosíntesis del GSH se encuentran en amarillo: GSHa ( $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetasa), GSHb (glutatió sintetasa). La captación y biosíntesis de las poliaminas se encuentran en azul: ARG (arginasa), ODC (ornitina descarboxilasa), AdoMetDC, (S-adenosinil-metionina descarboxilasa), SpdS (espermidina sintetasa). La síntesis del tripanotión se muestra en verde: GspS (glutationil espermidina sintetasa), TryS (tripanotión sintetasa). La reducción del tripanotión se muestra en gris: TryR (tripanotión reductasa). La oxidación del NADPH por la TryR se muestra en rosa y la G6PDH (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) en marrón. La vía de las pentosas fosfato previamente esquematizada se muestra en el recuadro gris. La utilización del  $T(SH)_2$  incluye el uso de la molécula como cofactor en la eliminación del metilglioxal en el sistema glioxalasa y como ligando de *clusters* hierro-azufre por 1-C-Grxs (monotiolglutaredoxinas). También como nucleófilo en la adición a fármacos electrófilos en reacciones catalizadas por la TST (tripanotión S-transferasa). También se muestran las reacciones mediadas por TXN (triparedoxinas), como: i) reducción de Pxs (peroxidasa) que descomponen diferentes hidroperóxidos a sus alcoholes respectivos y agua; ii) reducción de la MSR (metionina sulfóxido reductasa) que regenera la metionina de su forma sulfóxido y iii) reducción de la RnR (ribonucleótido reductasa) que produce desoxinucleótidos a partir de nucleótidos. También se muestran las 2-C-Grxs (ditiol glutaredoxinas) que reducen el GSSG y proteínas glutationiladas (99).

Particularmente, las enzimas pertenecientes al metabolismo del tripanotión y la ruta de las poliaminas, como la S-adenosil-metionina descarboxilasa (AdoMetDC) (100), la TryS (101)

y la TryR (102), han pasado tanto la validación como dianas (esenciales para la supervivencia del parásito) como la validación química (inhibición selectiva) (98).

En la **Figura 1.13** se resume el rol de la TryR, su contexto biológico en *Leishmania spp.* y la integración de las diferentes rutas anteriormente descritas o mencionadas.

## 1.4 La Tripanotión Reductasa como Diana Terapéutica

La TryR y la GluR poseen una identidad del 30% pero existen diferencias sustanciales en sus sitios activos. Como ya se mencionó, la TryR posee una amplia región hidrófoba cargada negativamente que le ayuda a acomodar la espermidina del tripanotión mientras que en GluR este sitio es menos voluminoso, de características hidrófilas y cuenta con una carga positiva que le ayuda a interactuar con el carboxilato de la glicina presente en el glutatión (92).

La TryR es una diana terapéutica validada, ya que -debido a la carencia de GluR y TrxR- es el único eslabón que conecta el metabolismo del NADPH con el de los tioles (63,75). Hasta el momento, para todos los tripanosomátidos estudiados, esta enzima es esencial. La obtención de parásitos de *L. donovani* viables carentes de las dos copias endógenas del gen de TryR fue solamente posible tras la expresión episomal de la secuencia codificante de TryR (103). Parásitos con una actividad remanente de 15% de TryR no parecen tener problemas al crecer en cultivo axénico pero su supervivencia en el interior de los macrófagos se ve seriamente comprometida (104). En el caso de *T. brucei*, en experimentos de *knock-out* condicional, la actividad de TryR no se pudo disminuir más allá de un 10%, siendo los parásitos resultantes altamente sensibles a hidroperóxidos exógenos y avirulentos en un modelo de infección animal (102).

La esencialidad es, por supuesto, uno de los prerequisites necesarios para que una proteína pueda ser tenida en cuenta como una buena diana terapéutica pero, además de este, también se deben de cumplir otros requisitos (98,105). La TryR cumple la mayoría de ellos: i) la proteína es susceptible de ser producida de manera estable y en grandes cantidades de manera recombinante; ii) se puede decir lo mismo de su único sustrato, el tripanotión oxidado (TS<sub>2</sub>) (106) y iii) el sitio activo es suficientemente diferente al de su homóloga humana. Una de las desventajas de la TryR es que la supervivencia del parásito solo se ve afectada cuando su actividad se ve disminuida en más de un 90% (102). Esto implica que los inhibidores competitivos que se desarrollen deben de tener una afinidad muy alta (98). Por esta razón se considera a los inhibidores no competitivos o irreversibles como alternativas más atractivas para esta enzima.

En los últimos 30 años se han realizado más de 1500 estudios de inhibidores de la TryR que podrían ser diferenciados en 6 categorías: i) compuestos tricíclicos y de difenilsulfuro, ii) derivados bicíclicos y heterocíclicos, iii) inhibidores de poliamina, iv) sustratos “subversivos”, v) inhibidores irreversibles y vi) compuestos organometálicos.

### 1.4.1 Derivados Tricíclicos y de Disulfuro de Difenilo

El antimalárico mepacrina fue el primero de los compuestos tricíclicos identificados como inhibidor de la TryR que, además, carecía de efecto alguno sobre la GluR humana. La mepacrina y otras 9-amino acridinas son inhibidores competitivos de la TryR con una  $K_i$  que varía entre 5 y 45  $\mu\text{M}$  y con la particular característica de unir más de una molécula inhibitoria de manera simultánea en el sitio activo. Los derivados de la mepacrina con urea y sulfamida con un grupo aromático en el N<sup>9</sup> de la molécula han mostrado ser, sin embargo, extremadamente tóxicos en células humanas (92).

Varios fármacos neurolépticos con un esqueleto tricíclico de fenotiazina (clorpromazina, tioridazina, trifluoperazina, etc.) son inhibidores competitivos de la TryR que presentan valores de  $K_i$  del orden de micromolar y con actividad moderada contra *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. donovani* ( $\text{EC}_{50}$  5-50  $\mu\text{M}$  – 48 h) (107). Una cuaternización de la alquilamina terciaria del átomo de nitrógeno de la clorpromazina con un grupo benzilo u otros dio como resultado inhibidores competitivos más potentes, llegando incluso a valores de 120 nM (107). Aunque las fenotiazinas tienen actividad tripanocida *in vitro*, la tioridazina y la trifluoperazina son inactivas en el modelo murino crónico de tripanosomiasis africana y la dibenzazepina tricíclica clomipramina no incrementa el tiempo de supervivencia en el modelo agudo (108). La clomipramina y la tioridazina parecen tener efectos *in vitro* frente a *T. cruzi* (109). La apertura del anillo central de las fenotiazinas con el fin de disminuir el efecto neuroléptico genera 2-aminodifenilsulfatos que son inhibidores casi tan potentes como los compuestos de los que derivan. La unión de dos 2-aminodifenilsulfatos a través de un espaciador de espermidina da como resultado un potente inhibidor competitivo con una  $K_i$  de 400 nM (92).

### 1.4.2 Compuestos bicíclicos y heterocíclicos

Este grupo posee una gran variedad estructural y la mayoría de los compuestos fueron descubiertos mediante aproximaciones de cribado de alto rendimiento contra *T. cruzi* usando la metodología basada en la reducción del ácido ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB). Este ensayo acoplado es muy útil debido a su bajo coste, si bien los valores de  $K_i$  obtenidos pueden ser algo menores que los reales como consecuencia de una sobreestimación de las concentraciones de sustrato. En estos ensayos asumimos que la concentración efectiva de sustrato es equivalente a la que se dispensa al inicio de la reacción, ya que el producto

generado por la enzima es inmediatamente transformado de nuevo a sustrato por su oxidación con DTNB. Sin embargo, es posible que esta reacción no sea lo suficientemente rápida como para que la concentración real de TS<sub>2</sub> sea exactamente igual que la dispensada al inicio de la reacción. Recientemente, y con el fin de solventar este problema, se viene usando la producción de grandes cantidades de tripanotión utilizando una TryS recombinante mutada de *C. fasciculata* **(110)**.

Un cribado de más de 100 000 compuestos identificó nuevas clases químicas con el potencial de ser empleadas como inhibidores de TryR. Entre las clases de moléculas identificadas se pueden contar: índoles conjugados, iminobenzimidazoles, aril/alquil piperidinas, benzhidrilos básicos, las quinazolinas y 1,2,4-triazinas **(111)**. Los compuestos identificados presentaban unos valores de CI<sub>50</sub> comprendidos entre 2 y 50 µM frente a la TryR de *T. cruzi* y con una potencia aumentada en *T. brucei*. Sin embargo, cabe anotar que la actividad tripanocida no siempre se relaciona con la inhibición enzimática y esto, sumado a la alta tasa de toxicidad en células humanas (MRC-5), sugiere que se necesita un mayor grado de optimización de los compuestos obtenidos.

El cribado de la quimioteca LOPAC<sup>®1280</sup> frente a la TryR de *T. cruzi* reveló 3 nuevas clases de inhibidores aptos para un desarrollo futuro: la indatralina, el GBR-12935 (benzhidriloxifenilpropil-piperazina) y el BTCP (benzotiofeno-piperidina) **(110)**. Varios análogos de indatralina diseñados para estudiar la relación entre la estructura y la actividad mostraron una pérdida de actividad frente a TryR con pequeños cambios en la CE<sub>50</sub> contra el parásito, indicando que la molécula puede tener dianas diferentes a la TryR **(112)**. Por otra parte, estudios estructurales en GBR-12935 condujeron a un derivado de piperazina-fenotiazina que es un potente inhibidor competitivo de la TryR, mas no de la GluR humana, capaz de matar parásitos de *T. brucei* a concentraciones sub-micromolares **(110)**. En el caso de BTCP, los estudios iniciales revelaron que se trataba de un inhibidor competitivo con una  $K_i < 1 \mu\text{M}$  y los análogos sintetizados a partir de este no aumentaron su potencia **(113)**. Sin embargo, estudios posteriores en los que se diseñaron análogos, utilizando motivos diaril-sulfuro para ocupar el sitio hidrófobo de unión al tripanotión y el surco apolar alrededor de las cisteínas catalíticas, permitieron la identificación de nuevas moléculas que inhiben de manera competitiva la TryR de *T. cruzi* y muestran un alto índice de selectividad por la enzima del parásito en comparación con la GluR humana. El conjugado más potente es capaz de matar parásitos de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. donovani*, pero muestra una alta toxicidad frente a mioblastos murinos. Uno de los resultados más interesantes del estudio de los derivados biarílicos de BTCP frente a las TryR de *T. cruzi* y de *T. brucei* señala que, si bien en ambos casos se produce



la unión al centro activo, la orientación de las moléculas en el mismo es contraria. Esto indica que, aunque haya un alto grado de identidad entre estas proteínas, es erróneo extrapolar los datos inhibitorios obtenidos solo con la TryR de una especie a las demás.

Otro estudio de alto rendimiento con 62 000 moléculas identificó quinolinas y pirimidopiridazinas que exhibían perfiles inhibitorios complejos de características mixtas y incompetitivas frente a la TryR de *T. cruzi*, mostrando poca inhibición de la GluR humana. Aunque se halló relación entre su estructura y su actividad, los autores de este estudio no pudieron mejorar la potencia de estos compuestos. La serie a partir de las quinolinas mostró solo un efecto medio contra células humanas (MRC5) pero sus valores de CE<sub>50</sub> frente a los parásitos fueron mucho más bajos que las CI<sub>50</sub> obtenidas frente a TryR, lo que denota efectos inespecíficos (114).

Un cribado utilizando parásitos vivos con una quimioteca de compuestos basados en azoles detectó un derivado de tiomorfolina como una molécula prometedora (115). El compuesto inhibe de manera competitiva la TryR y mata los amastigotes de *L. infantum* pero es tóxica para células humanas (KB). La estructura cristalográfica de TryR en estado reducido y unida al NADPH junto a esta molécula muestra que dos moléculas de la mostaza de quinacrina se unen al sitio activo (92,116).

Por último, una aproximación combinada *in silico/in vitro* dio como resultado 82 inhibidores nuevos para la TryR de *T. cruzi* con actividades en el rango de nM (117). Los compuestos más activos mostraron unas CI<sub>50</sub> para TryR menores de 1 µM con perfiles incompetitivos o no competitivos. Tres de los compuestos afectaron mínimamente la proliferación de la forma circulante de *T. brucei*.

La utilización de esta aproximación combinada en la búsqueda de nuevas moléculas supone una mejora sustancial al aumentar el número de *hits* desde un 1.8% del ensayo de alto rendimiento *in vitro*, hasta un 17% en el combinado.

### 1.4.3 Derivados de poliaminas

Los derivados de poliaminas se diseñaron con el fin de explotar la diferencia entre los sustratos de la TryR y la GluR. Esta aproximación ha llevado a la obtención de potentes inhibidores competitivos como la penta-(3-fenilpropil)-espermina y las difenil-propil-poli-amino-biguanidas, con unos valores de  $K_i$  de 150 y 950 nM, respectivamente. Estos compuestos son fuertes tripanocidas pero no se ha observado una correlación clara entre la inhibición de la TryR y la muerte del parásito (107). Estos compuestos fueron conjugados

con quinonas con el objetivo de mejorar el índice de selectividad de las nafto- y antraquinonas. Los conjugados resultaron ser inhibidores no competitivos de la TryR de *T. cruzi* con valores de  $K_I$  de 3-15  $\mu\text{M}$  y, algunos de ellos, con un comportamiento “subversivo”. La conjugación con quininas causó una disminución en la potencia de las moléculas originales contra *T. cruzi*, *L. donovani* y *T. brucei* y, en algunos casos, un índice de selectividad mejorado frente a mioblastos de ratón. Sin embargo, aún no se ha demostrado una clara correlación entre estructura y actividad (118).

#### 1.4.4 Sustratos subversivos

Los sustratos subversivos son compuestos que pueden ser reducidos por la TryR, u otras flavoenzimas, a su radical respectivo. Este radical reacciona de manera espontánea con el oxígeno molecular dando como resultado aniones superóxido. De esta manera, un sustrato subversivo convierte una reductasa antioxidante en una enzima prooxidativa (92,119).

Varias 1,4 naftoquinonas, tales como la menadiona, la plumbangina y el lapacol, han sido estudiadas como sustratos subversivos de la TryR. El derivado más potente contiene dos 1,4 naftoquinonas unidas a un espaciador de poliamina y tiene una alta selectividad por la TryR de *T. cruzi* cuando se compara con la GluR humana (119). Recientemente, se han diseñado híbridos de quinona y cumarina como inhibidores duales contra la TryR y la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (120). Sin embargo, la mayoría de las moléculas creadas perdieron la habilidad de inhibir la GAPDH aunque mantuvieron su actividad contra TryR. El mejor derivado mostró un valor de  $\text{CI}_{50}$  frente a GAPDH de 5.4  $\mu\text{M}$  frente a los 2.7  $\mu\text{M}$  de TryR y, a pesar de su alta eficiencia antiparasitaria frente a *T. b. rhodesiense*, el compuesto demostró ser tóxico para mioblastos de rata. Otros conjugados que resultaron ser potentes tripanocidas y menos tóxicos resultaron ser pobres inhibidores de TryR.

En el caso de los derivados de nitrofurano como el nifurtimox y el chinifur, que en un principio fueron considerados como sustratos subversivos, se ha demostrado que el mecanismo de acción *in vivo* puede ser diferente. Al parecer, la generación de metabolitos tóxicos por una nitroreductasa es probablemente el mecanismo que produce las hidroxilaminas que generan los cationes de nitrerio que promueven la ruptura de las cadenas de DNA o que directamente reaccionan con los tioles libres (121).

### 1.4.5 Inhibidores irreversibles

Todos los inhibidores que se unen de forma covalente a la TryR descritos hasta ahora modifican la Cys 52 del sitio activo. Como ya se ha mencionado, en la proteína oxidada, el residuo forma un puente disulfuro con la Cys 57, el cual es reducido por el NADPH durante el ciclo catalítico. De esta manera, la Cys 52 libre ataca al tripanotión oxidado generando un disulfuro mixto entre la enzima y el sustrato. Este disulfuro es posteriormente reducido por la Cys 57, generando así tripanotión reducido y recuperándose el enlace disulfuro entre las dos cisteínas del sitio activo. La Cys 52 puede ser modificada por varios inhibidores covalentes.

El primer inhibidor irreversible de la TryR descrito fue la nitrosourea carmustina y el ajoeno, este último un conocido organosulfuro presente en el ajo (*Allium sativum*). Sin embargo, ambos compuestos también inactivan la GluR humana (92).

Varias bases de Mannich, al igual que otros alcaloides macrocíclicos naturales como la lunarina que tienen cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, también inhiben la TryR de forma irreversible mediante un mecanismo tiempo-dependiente (107). Por otra parte, glicósidos de isotiocianato y tiocarbamato aislados de *Moringa peregrina*, además de inhibir la TryR de *T. cruzi* de forma irreversible, también matan eficazmente a *T. b. rhodesiense* y, en un modelo murino, mostraron una disminución inicial de la parasitemia. Sin embargo, este tipo de compuestos son altamente tóxicos para los animales (122).

El ebsulfuro, un análogo de azufre del ebselen (un conocido mimético de la glutatión peroxidasa) identificado a través de otro estudio de alto rendimiento, mostró ser un inhibidor irreversible de la TryR tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei* y, en conjunción con nifurtimox, demostró una fuerte actividad antiparasitaria frente a *T. b. brucei* y *T. b. gambiense* y una baja toxicidad frente células humanas (L929) (123). Los intentos de generar análogos de este compuesto con mejores índices de selectividad solo condujeron a moléculas con una  $CE_{50}$  10 veces superior que también fue acompañada por una toxicidad más baja en células HEK293T. Aunque los compuestos derivados mostraron solo una actividad moderada contra *T. brucei* en un modelo de infección murina, los derivados de ebsulfuro parecen ser moléculas interesantes para un desarrollo futuro.

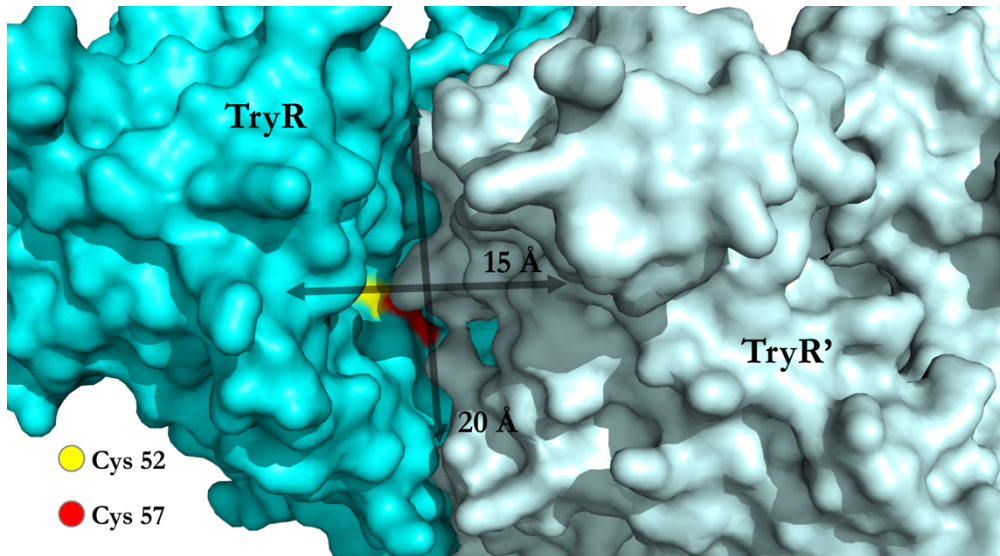
#### 1.4.6 Compuestos organometálicos

Los primeros complejos organometálicos descubiertos que afectan a la TryR fueron los derivados de Pt(II)-terpiridinas. Estos compuestos inactivan de manera irreversible la TryR de *T. cruzi* sin afectar a la GluR humana, siendo capaces de inhibir el crecimiento de *T. brucei* circulante a concentraciones nanomolares (92). Los complejos de nitrofuril-tiosemicarbazona de Pd(II) parecen actuar mediante diversos mecanismos entre los que se encuentran la unión al DNA, la producción de estrés oxidativo y la inhibición irreversible de la TryR. Estos compuestos inhiben el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* con unos valores de CE<sub>50</sub> de 3μM (107).

La auranofina, un fármaco que contiene oro y es utilizado para el tratamiento de artritis, inhibe la TryR de *L. infantum* con valores de CI<sub>50</sub> del orden de sub-micromolar. Un cristal de baja resolución del complejo TryR/auranofina mostró un ión de Au(I) unido entre las dos cisteínas del sitio con un cloruro como tercer ligando (124). Una serie de compuestos de Au (I) mostraron una fuerte actividad contra amastigotes de *L. major* y *L. amazonensis*. Además, tanto la auranofina como algunos de sus derivados muestran índices de selectividad que oscilan entre 80 y 240 cuando son comparados con macrófagos murinos, revelando el potencial de estos farmacóforos de oro. Hasta el momento 3 modelos murinos de infección con *L. major* han demostrado que la auranofina tiene un efecto leishmanicida *in vivo* que, en algunos casos, es incluso mejor que el de la anfotericina (125).

#### 1.4.7 La interfaz de dimerización: la diana inexplorada

Los diferentes tipos de moléculas que se desarrollan o se descubren con capacidad de inhibir la TryR tienen en común que su mecanismo de acción está asociado al sitio activo de la enzima, ya sea como un inhibidor competitivo clásico (mepacrina), como un inhibidor subversivo que aprovecha la actividad de la enzima (menadiona) o como un inhibidor irreversible que la modifica (carmustina). Cabe destacar que mediante los estudios de alto rendimiento se han descubierto algunas moléculas cuyo comportamiento no es competitivo, pero aún faltan por dilucidar sus interacciones con la enzima.



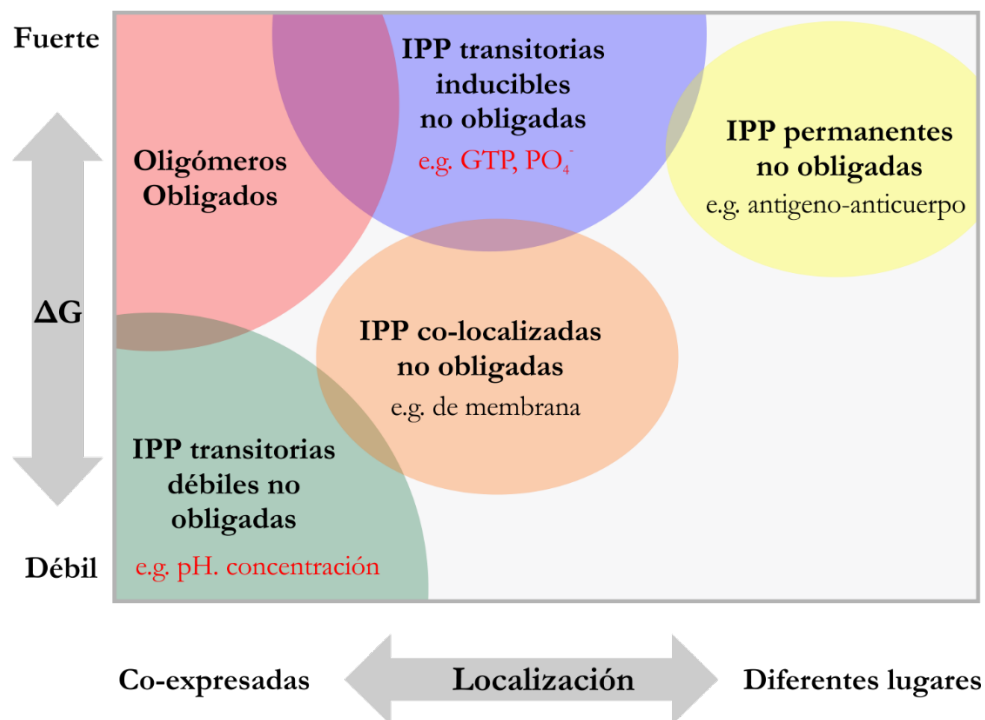
**Figura 1.14 | Sitio activo TryR.** El sitio activo está compuesto por ambas subunidades y es considerablemente amplio (15 x 15 x 20 Å) (117).

Desde el punto de vista racional, una aproximación que se centre en el sitio activo de la enzima es muy atractiva debido a que el tamaño del sitio y la carga de este pueden ser usados a favor del diseño. (Figura 1.14) Por otra parte, estos mismos factores hacen que el sitio parezca un poco promiscuo ya que cualquier molécula con una carga y tamaños adecuados inhibiría la reacción, sobre todo si la actividad de la reacción inhibida se determina en presencia de bajas concentraciones de sustrato (111).

Debido a que la TryR necesita su conformación dimérica para ser activa, la interfaz de dimerización se presenta como un blanco interesante. A pesar de que las interacciones proteína-proteína (IPP) suelen ser complejas y difíciles de estudiar, impedir la interacción entre los monómeros de una proteína dimérica no es un concepto nuevo. De hecho, ya en 1997, se desarrolló una metodología para estudiar inhibidores peptídicos de la dimerización en la GluR humana (126). En 2004 también se demostró que un inhibidor dirigido a la interfaz de dimerización de la proteasa del virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi era capaz de inhibir la actividad de esta proteína dimérica (127). Actualmente existen diversos estudios en fase de desarrollo que pretenden usar una determinada interfaz proteína-proteína como diana terapéutica, existiendo algunas moléculas que incluso han alcanzado un desarrollo clínico en áreas tan diversas como cáncer, asma, enfermedades cardiovasculares, esclerosis múltiple, degeneración macular, colitis ulcerativa y psoriasis (128).

## 1.5 Proteínas diméricas y la interfaz de dimerización como diana terapéutica.

Con el fin de cumplir su función en el intrincado ambiente intracelular, las macromoléculas deben interactuar unas con otras para cumplir su función cualquiera que ella sea. Las proteínas, por ejemplo, llevan a cabo diversas funciones para las que deben interactuar con ácidos nucleicos, lípidos, moléculas pequeñas u otras proteínas. Las IPP son las encargadas de la regulación de diferentes funciones a nivel celular: transducción de señales, formación de complejos inmunes, regulación de la expresión génica y agregación de componentes estructurales. Estas asociaciones entre proteínas, en un principio eventos aleatorios, han sido esenciales en la evolución de estas macromoléculas biológicas (129).



**Figura 1.15** | Relación entre los diferentes tipos de interacciones proteína-proteína, su afinidad de unión y localización de sus protómeros. Los desencadenantes que controlan las interacciones transitorias están indicados en rojo.

Las IPP se pueden dar entre dos o más proteínas iguales (homo-oligómeros) o entre proteínas distintas (hetero-oligómeros). Por otra parte, en relación con la obligatoriedad de la interacción, puede distinguirse entre oligómeros obligados y no obligados. En aquellos de carácter obligado, los monómeros no pueden existir como una entidad ya que son inactivos

y generalmente solo son funcionales cuando se encuentran acomplejados, muy común en el caso de los homo-oligómeros. Los hetero-oligómeros, por otra parte, suelen ser oligómeros de carácter no obligatorio y sus monómeros no suelen estar co-localizados. Por ello, estos deben ser estables en su forma monomérica hasta lograr la interacción con su contraparte **(130)**.

También se pueden diferenciar las IPPs en base a la estabilidad del complejo, distinguiéndose entonces entre complejos permanentes, a los cuales por razones obvias pertenecen los oligómeros estructuralmente obligados, y complejos transitorios. Los complejos transitorios suelen ser oligómeros con asociaciones débiles que se asocian y disocian rápidamente u oligómeros con asociaciones más estables en las cuales un desencadenante molecular, como un ligando, puede inducir una asociación o disociación de un monómero cambiando el equilibrio oligomérico **(130)**.

Las IPP que participan en la transducción de señales o en la regulación celular suelen ser de naturaleza temporal y débil. Cabe destacar que las diferencias entre las diferentes categorías de IPPs suelen estar poco definidas ya que los complejos proteicos se encuentran altamente influenciados por las condiciones ambientales que existen dentro de la célula que, al cambiar, modifican la naturaleza y las características las interacciones **(130) (Figura 1.15)**.

Las IPPs también participan en diversos procesos patológicos, por lo que el desarrollo de moléculas que puedan interferir en la formación de complejos proteicos representa uno de los desafíos más interesantes en el diseño de fármacos **(130)**.

El estudio de las enzimas diméricas, como la TryR, presenta por tanto gran interés en el diseño de fármacos ya que representa un nicho particular de dianas terapéuticas cuya inhibición, aunque dificultosa, es de alto interés terapéutico.

### **1.5.1 Propiedades de las interfaces de dimerización**

Las características estructurales de las superficies proteicas que interaccionan con otras proteínas son de gran importancia en el reconocimiento molecular. Por ello, se ha prestado especial atención a la exploración de estos dominios únicos en las proteínas diméricas. Las principales características de las interfaces monómero-monómero en dímeros fueron analizadas por Jones y colaboradores **(131)**, los cuales encontraron una relación lineal entre el área superficial accesible (ASA) y el peso molecular de los protómeros, encontrando que las superficies generalmente presentaban un área de entre  $369.1 \text{ \AA}^2$  y  $4746 \text{ \AA}^2$  con una proporción de 68.1% de aminoácidos no polares. La distribución de los grupos funcionales

en las interfaces de dimerización mostró una predominancia de residuos apolares en el núcleo de la interfaz y residuos polares en la periferia. El carácter predominantemente no polar de las interfaces analizadas puede ser explicado por el hecho de que, durante el plegamiento de las proteínas, los residuos hidrofóbicos son llevados al interior de la estructura disminuyendo de esta manera las interacciones poco favorables con el solvente. En general, las proteínas solubles adoptan una conformación globular con el propósito de reducir el total de superficie proteica en contacto con el solvente **(131)**.

Aun cuando la mayor parte de los residuos de la interfaz son apolares, entre los aminoácidos polares suelen estar presentes la arginina y asparagina. Por el contrario, la cisteína y el triptófano muestran una animadversión particular por ubicarse en la interfaz. Excluyendo el triptófano entonces, cuyo grupo funcional es muy voluminoso pudiendo generar problemas en la asociación de las subunidades, los residuos aromáticos (en particular la tirosina) se encuentran con bastante recurrencia presentes en la interfaz y son considerados como un buen “pegamento” para mantener dos subunidades juntas. Tenemos entonces que las interfaces tienen más carácter hidrofóbico que el resto de la proteína y que son comúnmente definidas como parches hidrófobos en la superficie de las proteínas **(131)**.

De acuerdo a la frecuencia de las estructuras secundarias presentes en la interfaz estas se pueden agrupar en 4 tipos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$  y *coils*. La mayoría de los dímeros que han sido analizados pertenecen a la categoría  $\alpha$  (53%) mientras que  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$  y *coils*, representan el 21.8, el 12.5 y 12.5% respectivamente. Cabe anotar que las interfaces tipo  $\beta$  son a su vez clasificadas en 3 grupos: extendidas, apiladas y complejas **(131)**.

El enlace de hidrógeno es un componente intrínseco de las interacciones proteína-proteína y se ha sugerido que mientras las interacciones hidrófobas sirven de guía para la unión entre las subunidades, son los enlaces de hidrógeno y los puentes salinos los que caracterizan la especificidad de esta asociación. El número de enlaces de hidrógeno en las estructuras analizadas varía entre 0 y 46, con un promedio de 0.88 por cada 100 Å<sup>2</sup> en aquellas ASAs enterradas con un tamaño superior de 1500 Å<sup>2</sup>. Así mismo, el número de puentes salinos suele oscilar entre 0 y 5. Es normal que los residuos se proyecten a través de la interacción, encontrándose dispersos a lo largo de la interfaz y actuando como ganchos que sujetan ambas subunidades entre sí **(131)**.

Entre el diverso número de IPPs que se pueden encontrar en una célula, las interacciones entre monómeros para formar dímeros son de las más fuertes y sus ASAs de las más extensas, por lo que el tiempo de vida medio de este tipo de interacciones es mucho mayor que el de cualquier otra IPP. *Zhanhua* y colaboradores **(132)** realizaron un análisis de las propiedades



de las interfaces de dimerización de estructuras depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) (156 homodímeros y 170 heterodímeros). Estas estructuras fueron diferenciadas basándose en parámetros tales como: i) el número de residuos, ii) el número de enlaces de hidrógeno, iii) la hidrofobicidad y iv) la composición, en lo que respecta a residuos, de la interfaz de dimerización **(132)**.

El número medio de residuos encontrados en la interfaz de dimerización obtenido fue 81 para homodímeros y 51 para heterodímeros. En el caso de los enlaces de hidrógeno los resultados fueron más variables, oscilando entre 0-51, con una media de 18, para los homodímeros y 0-98, con una media de 12, para los heterodímeros **(132)**.

Si bien las interfaces de los homodímeros tienen un mayor número de residuos y de enlaces de hidrógeno, la densidad de estos últimos por residuo es más alta en los heterodímeros que en los homodímeros. En cuanto a la hidrofobicidad, se encontró que en los homodímeros la interfaz suele ser más hidrófoba que en los heterodímeros, que tienen una prevalencia mayor de residuos hidrófilos y cargados. Es importante tener en cuenta entonces que la asociación de monómeros idénticos es impulsada en mayor medida por las interacciones hidrófobas y que en el caso de los heterodímeros predominan las hidrofílicas **(132)**.

### **1.5.2 Modelos de plegado de las proteínas diméricas**

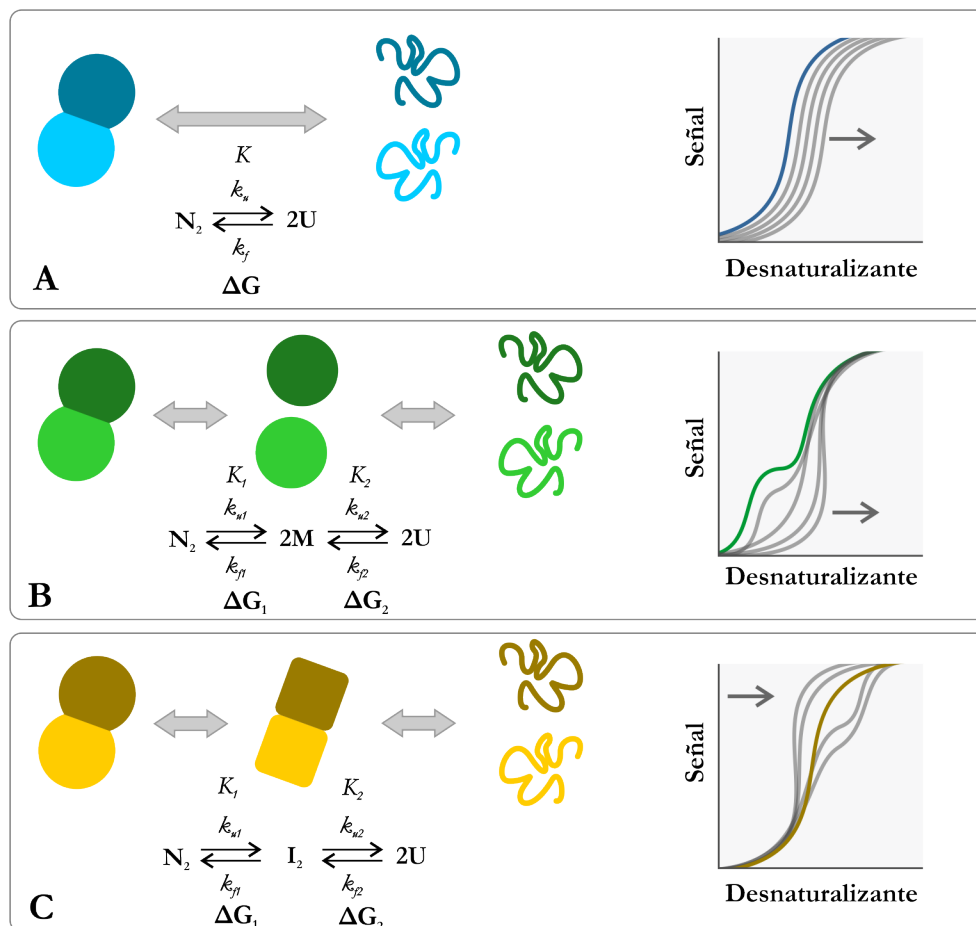
La gran diversidad existente de complejos proteicos hace especialmente dificultosa la identificación del proceso de asociación que guía el plegado correcto de las proteínas. Para los complejos transitorios y no obligados, en los que las subunidades interaccionan solo en una fase específica de su tiempo de vida medio, la asociación es un proceso completamente diferente al del plegamiento de las subunidades individuales. Las subunidades suelen tener una estructura terciaria estable que garantiza el encuentro con su contraparte. Por el contrario, los oligómeros estructuralmente obligados, particularmente los homo-oligómeros, se forman durante la traducción compartiendo ribosoma y factores de plegamiento, por lo que la asociación de las subunidades y el proceso de plegamiento no pueden ser considerados eventos independientes **(133)**. Tras la traducción, la cadena polipeptídica lineal adopta una conformación favorable en la cual el plegamiento promueve el enterramiento de los residuos hidrófobos. Los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de *van der Waals*, los enlaces iónicos y, en algunas ocasiones, los enlaces covalentes estabilizan las estructuras terciarias de las proteínas. La asociación o el ensamblaje de varias cadenas polipeptídicas con el fin de generar una proteína con una estructura cuaternaria se puede llevar a cabo en un proceso que integra el

plegamiento en uno de sus pasos. Después de la traducción, la cadena polipeptídica se pliega de manera adecuada gracias a la interacción con los factores de plegamiento (chaperonas) que previenen la formación de asociaciones inapropiadas con otras proteínas que podrían llevar a un plegamiento inadecuado. Durante el proceso de plegamiento, las proteínas pueden interactuar con más de una chaperona con el fin de lograr su conformación final óptima. Un plegamiento no adecuado suele conducir a la degradación de la proteína generada **(133)**. Para aquellas proteínas que requieren de un proceso de oligomerización, la subunidad plegada debe encontrar a su subunidad complementaria en el complejo ambiente intracelular. La conformación de este tipo de complejos tras el plegamiento puede ser dividido entre complejos homo y heterópicos. La formación de los complejos homo-oligoméricos mediante la asociación de subunidades idénticas es facilitada por el hecho de que las subunidades son sintetizadas por el mismo ribosoma. Sin embargo, la formación de un complejo hetero-oligomérico es más dificultosa debido a que depende de la interacción de dos subunidades proteicas distintas. La formación de estos complejos hetero-oligoméricos puede estar guiada por dos mecanismos: i) el intercambio de subunidades entre complejos homo-oligoméricos y ii) la asociación de subunidades individuales. Estas subunidades individuales suelen encontrarse asociadas a chaperonas hasta que otra subunidad adecuada para la formación del complejo es hallada, llevándose a cabo así la finalización del proceso de plegamiento **(134)**. El descubrimiento de chaperonas específicas sugiere que estas proporcionan asistencia en las diferentes vías que comandan el plegamiento, la asociación y la degradación de los complejos **(134)**.

Según el equilibrio cinético y los datos de desnaturalización de 40 proteínas diferentes y dependiendo de su estabilidad y el número de estados intermedios, los dímeros han sido categorizados en tres clases. Las proteínas Clase A cuentan con dos estados, el dímero plegado y el monómero sin plegar. En el caso de las proteínas Clase B y C, además de estos dos estados existe un tercero parcialmente plegado que en el caso de la Clase B es monomérico mientras que en la Clase C es dimérico **(135,136)**. **(Figura 1.16)**

Los dímeros que presentan un mecanismo de equilibrio Clase A son típicamente de menos de 100 residuos por monómero y su plegamiento presenta, por lo general, una cinética de dos estados. Los dímeros que presentan un equilibrio de 3 estados, Clase B y C, suelen ser de más de 100 residuos por monómero y su mecanismo de plegamiento es de cinética compleja. Durante los experimentos de equilibrio de plegamiento, los modelos predictivos mostraron que los dímeros Clase A forman una curva sigmoidea cuya forma se mantiene al aumentar la concentración de agente desnaturalizante, si bien las curvas se desplazan

progresivamente hacia la derecha. En el modelo de dos estados, la asociación de las subunidades es un proceso bimolecular. Así, en contra de lo que sucede a las proteínas monoméricas con unas cinéticas de plegamiento que muestran exponenciales simples independientes de la concentración de proteína, los dímeros de Clase B y C muestran cinéticas no exponenciales, tanto durante el plegamiento como durante la desnaturalización, observándose dependencia de la concentración de proteína en el estado de transición (137). Típicamente, el equilibrio cinético de desnaturalización de una proteína en tres etapas muestra un comportamiento bimodal independiente de si el intermediario es monomérico o dimerico. Las proteínas con un estadio intermediario monomérico muestran un comportamiento bimodal a concentraciones bajas de proteína y las proteínas con un intermediario dimerico muestran un comportamiento bimodal a concentraciones altas de proteína.



**Figura 1.16 | Mecanismos de plegamiento y desnaturalización de proteínas dimericas. A.** Clase A: Transición de dos estados, **B.** Clase B: Transición de tres estadios con un intermediario monomérico y **C.** Clase C: Transición de dos estadios con intermediario dimerico. En los equilibrios N hace referencia a la conformación nativa, I a los intermediarios y U a las formas desnaturalizadas o sin plegar (*unfolded*) (137).

La diferencia en energía libre de Gibbs asociada al proceso de desnaturalización ( $\Delta G_u$ ) es distinta para las proteínas dimericas y monomericas. El  $\Delta G_u$  se encuentra entre 3 y 15 kcal/mol para proteínas monomericas y entre 8 y 40 kcal/mol para proteínas dimericas. El proceso de desnaturalización para dímeros de tamaño superior requiere generalmente un mayor  $\Delta G_u$  **(137)**.

La  $\Delta G_u$  del proceso de desnaturalización/plegado y el ASA enterrado total en la interfaz no parecen tener ningún efecto en la elección del modelo de plegado. Sin embargo, el tamaño de las subunidades sí que parece influenciar el modelo de elección. Generalmente, los dímeros compuestos de subunidades de menos de 100 aminoácidos siguen un modelo de plegamiento en dos etapas y aquellos con más de 250 aminoácidos siguen un modelo de 3 etapas con una predilección por intermediarios dimericos. Entre los dímeros de tres estadios, los intermediarios monomericos son más comunes pero, por regla general, se prefiere un intermediario monomérico cuando el porcentaje de ASA enterrado es menor y se prefiere un intermediario dimerico cuando el tamaño de la proteína es mayor **(138)**.

### 1.5.3 Evolución de las proteínas dimericas

Desde el punto de vista de la evolución proteica, la oligomerización es un avance al suponer eficacia genética. Existen varias ventajas que están asociadas con el proceso de oligomerización: i) la complejidad se incrementa debido a la creación de un nuevo sitio en la interfaz de dimerización, ii) la regulación alostérica es posible por la asociación o disociación de proteínas multiméricas, iii) la proteína es estabilizada debido a que al ser de mayor tamaño es más resistente a la degradación y iv) las interacciones con ligandos son facilitadas gracias a que los cambios conformacionales son más fáciles debido a la flexibilidad conferida por los complejos multidominio **(136)**. Por ejemplo, la mayoría de las proteínas de unión al DNA y RNA son únicamente funcionales en su estado dimerico debido a que poseen una función de pinza que requiere de dos brazos que aprisionen el blanco. Esta función puede ser regulada cambiando el equilibrio entre los estados monomericos y dimericos. Otro ejemplo es el de la proteasa de HIV, la cual aloja a sus sustratos en una cavidad espaciosa creada por dos monómeros paralelos conectados en un extremo. La dimerización también juega un papel más complejo en el mantenimiento de la estabilidad de una proteína durante el proceso de plegamiento. Para los dímeros que no requieren de un estadio intermedio como son los de Clase A, aquellas cadenas desnaturalizadas o parcialmente plegadas pueden facilitar el

plegamiento de la proteína o pueden retener cadenas polipeptídicas en una conformación no favorable y causar agregación. De esta manera entonces, una agregación temprana entre los monómeros puede inducir que una proteína se pliegue de manera adecuada. Para los dímeros de Clase B, los intermediarios monoméricos plegados están en un estado similar al de glóbulo fundido y el proceso de asociación puede inducir en ellos una conformación funcional (136). *Ali* y colaboradores (129) revisaron los mecanismos evolutivos que guían la asociación entre proteínas. Teniendo en cuenta que las interfaces son parches hidrófobos en la superficie de una proteína, mutaciones que generen o expongan zonas hidrófobas tienden a aumentar la probabilidad de que se den interacciones que lleven a la formación de dímeros, particularmente de aquellos que requieran de un intermediario durante el plegamiento. El cambio de dominios es otra teoría plausible para la evolución de proteínas multiméricas. En este caso las proteínas existen ya sea como monómeros o dímeros y, en la forma dimerica, un dominio funcional de uno de los monómeros interactúa con un dominio en el monómero opuesto y viceversa, dando como resultado una asociación entre monómeros. Otro mecanismo alternativo para la formación de dímeros es la fusión de un gen que codifica para un dominio de oligomerización con el gen de una proteína monomérica, produciendo una proteína nueva que se asocia mediante el dominio recién adquirido (129).

A nivel génico, las mutaciones, las translocaciones génicas y las fusiones podrían inducir la formación de una proteína con un multidominio asimétrico tomado por proteínas distintas con funciones diferentes. El descubrimiento de los segmentos de dominio ancestrales, pequeñas secuencias peptídicas codificadas por genes primordiales que son capaces de formar oligómeros en solución, llevó a la hipótesis de que estos pequeños segmentos fueron proteínas ancestrales que bajo presión evolutiva se convirtieron en dominios dentro de proteínas monoméricas (129,139,140).

#### 1.5.4 Inhibición de la dimerización

Las enzimas dimericas son susceptibles de ser inhibidas mediante la unión de un ligando en la interfaz de dimerización. Sin embargo, la identificación de moléculas con capacidad inhibitoria se dificulta debido a la poca accesibilidad de las interfaces y los cambios que estas pueden sufrir tras la unión con el ligando. Actualmente existen 4 modelos posibles de inhibición: i) el inhibidor se une a la interfaz del monómero, ii) el inhibidor se une al dímero en un área alrededor de la interfaz, iii) el inhibidor se une a una secuencia proteica expuesta únicamente durante el proceso de plegamiento previniendo la asociación de las subunidades

durante el proceso y iv) el inhibidor se une a una cierta distancia de la interfaz pero genera unos cambios conformacionales tales que afectan el equilibrio dímero/monómero causando lo que se denomina inhibición alostérica (141).

### 1.5.5 Estudios computacionales en proteínas diméricas

El mismo tipo de interacciones no covalentes que guían el plegamiento de las proteínas tienen efecto en la energía de unión de un complejo proteico. La afinidad de unión entre subunidades proteicas está determinada por el efecto neto de todos los factores que contribuyen a la unión, incluyendo aquellos que la favorecen y los que no (142–147). La afinidad de la unión está relacionada con la energía libre de unión  $\Delta G_b$ , dada en la **Ecuación 1.2**

$$\Delta G_b = -RT \ln K$$

**Ecuación 1.2** | Energía libre de unión: R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en grados Kelvin y K es la constante de afinidad de la unión.

El  $\Delta G_b$  total para dos proteínas que están plegadas en el estado no unido puede ser calculado como la suma de la interacción del término de energía libre, el cual tiene componentes entálpicos y entrópicos, además de un término que tenga en cuenta la pérdida de entropía translacional, rotacional, vibracional y conformacional. Además, cuando se forman estadios conformacionales de los dímeros/monómeros antes de que se forme el complejo final estable, se debe añadir un término que tenga en cuenta la energía de esta fase de isomerización (148). Los cálculos más simples de energía libre tienen en cuenta los monómeros como cuerpos rígidos, de modo que no se consideran los cambios conformacionales que estos puedan sufrir durante la unión. Sin embargo, la flexibilidad de las proteínas puede influenciar de manera significativa sobre la termodinámica de la asociaciones proteína-proteína (149,150).

Algunos de los métodos iniciales que se emplearon para calcular la contribución de la desolvatación a las energías libres de unión usaban parámetros de solvatación atómica y las áreas superficiales accesibles al solvente o SASA (145–148). Las interacciones entre el soluto y el solvente pueden describirse usando bien campos de fuerza de mecánica molecular explícitos (en detalle atómico) o bien de forma implícita (tratando el solvente como un continuo dieléctrico) descomponiendo la energía libre de solvatación en contribuciones

polares y no polares **(151–153)**. Durante muchos años se han preferido las aproximaciones menos detalladas y por tanto menos costosas desde el punto de vista computacional frente a los modelos explícitos, que hoy día sí resultan aplicables a la mayor parte de los problemas. Entre los más populares están los llamados métodos de *Poisson-Boltzmann* (PB), las aproximaciones generalizadas de *Born* (GB) y los métodos combinados **(154–157)**. Bertorani y colaboradores **(158)** estudiaron la dependencia de la energía libre de unión de 7 complejos proteicos homo y heterodiméricos con la concentración salina empleando cálculos de PB. Los resultados obtenidos se correspondieron con los datos experimentales a los que se tenía acceso, sugiriendo que este tipo de cálculos pueden describir las bases físicas de los efectos no específicos de las sales en las interacciones proteína- proteína.

Cuando se cuenta entonces con datos experimentales de la energía libre de unión de un complejo proteico en particular, los modelos correlativos pueden ser de utilidad para la predicción las afinidades de unión de complejos similares. Estas aproximaciones correlativas empleadas para la estimación de la energía libre de dimerización han sido combinadas con protocolos de *docking* de cuerpo rígido para predecir, por ejemplo, las interfaces putativas en los homodímeros del receptor de neurotensina 1 **(159)**.

#### **1.5.5.1 Identificación de puntos calientes (*hot spots*)**

Los primeros en aplicar el llamado “barrido”( *scanning*) de alanina a una IPP fueron Clackson y Wells **(160)** en el estudio del receptor de la hormona del crecimiento humana. Sus resultados sugirieron que el cambio de energía libre de unión que conduce a la formación de un complejo proteína-proteína no se encuentra distribuido de manera uniforme en la interfaz sino que, por el contrario, se localiza mayoritariamente en unos cuantos residuos conservados **(161,162)**. Estos *hot spots*, o puntos calientes, parecen estar organizados en grupos (*clusters*) en regiones de alta densidad de empaquetamiento local. Los residuos energéticamente menos importantes se encuentran rodeando estos *hot spots*, presuntamente para protegerlos del solvente **(161,163)**. El triptófano, la tirosina, la arginina, la fenilalanina, la glutamina y la metionina suelen ser, con bastante asiduidad, residuos *hot spot* **(161,164–166)**. Algunos autores han definido no solo *hot spots*, sino también *warm spots* (puntos tibios) y *null spots* (residuos nulos), siendo los primeros aquellos que tienen una contribución a la energía libre de unión superior a las 4 kcal/mol, los segundos de 1-4 kcal/mol y los y últimos los que aportan <1 kcal/mol. Estas designaciones fueron definidas al medir la diferencia de energía libre de unión ( $\Delta\Delta G_b$ ) después de sustituir el residuo de interés por alanina **(163,167–169)**.

La identificación de los *hot spots* es de particular interés en el descubrimiento de moléculas pequeñas dirigidas a las IPPs (170–173). Existen diversos métodos computacionales que predicen qué residuos pueden ser *hot spots* (174). Los métodos más rigurosos utilizan la perturbación de la energía libre de unión y los métodos de integración termodinámica junto a simulaciones de dinámica molecular para calcular la  $\Delta\Delta G_b$  tras un cambio por alanina (175). También existen métodos computacionales de mutagénesis que pueden ser empleados para estudiar los efectos cinéticos de diferentes sustituciones de aminoácidos en la homodimerización (141,176,177). Otros autores han realizado aproximaciones completamente distintas para la predicción de *hot spots* en las que describen las estructuras proteicas como redes de conexión (178,179). En los análisis de interfaz usando esta metodología de redes los residuos más altamente conectados se correlacionaban con los datos experimentales de *hot spots* previamente identificados.

#### 1.5.5.2 *Determinación de los bolsillos de unión para los inhibidores*

Tras la identificación de los residuos clave para la dimerización es necesario detectar los sitios potenciales de unión del ligando a la interfaz de la interacción monómero-monómero. Las moléculas pequeñas que se unen en las hendiduras, preferiblemente cerca de los residuos *hot spots*, pueden prevenir la dimerización o perturbar la estructura dimérica (180). Al igual que en la identificación de los *hot spots* mencionada en el apartado anterior, existen diversos programas que asisten en la identificación de estos sitios de unión para los ligandos (181,182). La mayoría de estos emplean una aproximación geométrica o energética. Aunque se puede emplear una mezcla de diferentes metodologías para la predicción de estos sitios, ninguna ofrece unos resultados 100% fiables.

Existen surcos o hendiduras en la interfaz que solo se forman tras la asociación de un monómero con su compañero, constituyendo las llamadas interfaces de carácter adaptativo (183,184). Mientras que esta flexibilidad y plasticidad de la interfaz proporciona sitios nuevos de unión para los ligandos, también supone un reto para la detección de estos sitios, sobre todo cuando se emplean aproximaciones basadas únicamente en la estructura. Para solventar esto se han desarrollado diferentes protocolos que combinan la dinámica molecular con algoritmos que calculan diferentes propiedades de los bolsillos tales como el volumen, la polaridad y la profundidad, logrando identificar de esta manera bolsillos transitorios presentes en las interfaces (185–196).



En un estudio realizado sobre la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), una enzima homodimérica, se logró interferir en la dimerización de manera inusual empleando una molécula pequeña que se une al sitio activo de la enzima. El sitio activo de esta enzima se encuentra alejado de la interfaz pero la molécula pequeña logra inducir un cambio conformacional en la proteína que termina por perturbar su conformación dimérica, funcionando entonces como un inhibidor alostérico (197). Cabe aclarar que aunque esta aproximación empleando inhibidores alostéricos es prometedora, no siempre es posible de implementar (171).

### 1.5.5.3 Diseño de inhibidores

El cribado virtual es una técnica computacional empleada para la búsqueda de ligandos novedosos o cabezas de serie a partir de una base de datos virtual (198). El cribado virtual basado en estructura emplea el acoplamiento (*docking*) molecular de ligandos virtuales en los sitios de unión de proteínas cuya estructura tridimensional es conocida (199). Otra aproximación *in silico* es definir un farmacóforo común para una serie de ligandos que se unen a una diana común para así inferir la estructura complementaria del sitio receptor. Por ejemplo, el algoritmo denominado *Fingerprints for Ligands and Proteins* (FLAP) (200), construye todos los farmacóforos de 4 puntos posibles para un sitio dado. Posteriormente, se criba frente a estos farmacóforos una quimioteca virtual con el fin de hallar aquellos ligandos que coincidan con los requerimientos estipulados del sitio de interés. Posteriormente, se ordenan los ligandos encontrados de acuerdo a la puntuación (*scoring*) recibida en el proceso de *docking*. También se pueden emplear técnicas de *novio* para diseñar nuevos inhibidores de IPPs (201,202). Para ello se construyen los posibles ligandos basándose en los átomos o fragmentos moleculares dentro del sitio de unión de acuerdo a los requerimientos espaciales y de interacciones no covalentes. Esta aproximación de diseño de fármacos se beneficia de la disponibilidad de datos de difracción de rayos X sobre cristales de proteínas y del entendimiento obtenido a partir de experimentos biofísicos (202).

Con el fin de solventar específicamente el reto de descubrir moléculas pequeñas con la capacidad de inhibir IPPs, *Che* y colaboradores (203,204) han descrito una aproximación teórica para descubrir peptidomiméticos basada en la denominada hipótesis del andamiaje privilegiado. De acuerdo a esta hipótesis, cualquier estructura orgánica capaz de imitar un motivo de reconocimiento en una proteína, es un andamio privilegiado que podría inhibir la dimerización de la misma.

## 1.5.6 Inhibidores Peptídicos y Peptidomiméticos

Por regla general un buen punto de inicio cuando se desea diseñar un péptido que perturbe una IPP o, en nuestro caso, la interfaz de dimerización, es la síntesis de un péptido que se corresponda con la región de la interfaz y tenga en cuenta puntos críticos de la interacción, como los ya descritos *hot spots*. El siguiente paso es limitar la conformación del péptido mediante la ciclación, formación de enlaces cruzados (*crosslinking*) o la inserción de una estructura ya existente (205).

Otra de las metodologías utilizadas es el denominado trasplante de residuos. En este caso, los residuos responsables de perturbar una IPPs se trasplantan a una estructura más estable, como el polipéptido pancreático aviar (206).

A continuación, haremos un breve repaso de algunas de las proteínas dimericas de origen viral, bacteriano y eucariótico en las cuales la estrategia de la perturbación de la interfaz de dimerización como método de inhibición de la actividad ha sido implementada con éxito.

### 1.5.6.1 Integrasa de VIH

La integrasa de VIH cataliza la inserción del DNA viral en el genoma de la célula hospedadora. La proteína está compuesta por tres dominios: el dominio N-terminal con un motivo de unión a Zn, el dominio catalítico y el dominio C-terminal, el cual se encarga de la unión al DNA de manera inespecífica. La interfaz de esta proteína está formada por cuatro hélices  $\alpha$  y una lámina  $\beta$  de ambos monómeros, encontrándose el dominio catalítico en esta interfaz (207). Un péptido con la secuencia de aminoácidos del 147 al 175 que contenía parte de la interfaz demostró ser un inhibidor de la actividad integrasa *in vitro* a concentraciones de 1,2 mM (208). Péptidos derivados de las hélices  $\alpha$  1 y 5 del núcleo catalítico demostraron ser capaces de inhibir la actividad integrasa en un 50% a concentraciones del orden de nanomolar, perturbando el equilibrio de asociación y disociación del dímero (209). Otros péptidos derivados de cinco regiones del núcleo catalítico lograron inhibir la actividad 3'-endonucleasa a concentraciones de micromolar perturbando el entrecruzamiento entre los dímeros (210).

### **1.5.6.2 Proteasa de Herpesvirus**

La proteasa de Herpesvirus es una proteasa de serina encargada del procesamiento temprano de la estructura que compone la cápside viral. Esta proteína existe en un equilibrio entre sus estados monomérico y dimérico, siendo este último el responsable de la actividad catalítica (211). Cada subunidad posee un sitio activo con la tríada catalítica Ser-His-His, pero los sitios catalíticos no están en contacto entre sí. En la interfaz de dimerización, compuesta de varios bolsillos hidrófobos, interaccionan una hélice  $\alpha$  ( $\alpha_5$ ) de una subunidad con 3 hélices  $\alpha$  de la otra ( $\alpha_5$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$ ) (212). Se trasplantaron los residuos identificados en  $\alpha_5$  como necesarios para interferir en el proceso de dimerización al polipéptido pancreático aviar con el fin de obtener una estructura helicoidal estable en solución. Por medio de experimentos de filtración en gel se demostró que la incubación de la proteína con este péptido conducía a un aumento en el pico correspondiente al monómero y una reducción en el pico del dímero. Experimentos de actividad enzimática mostraron, además, que un exceso molar del péptido causaba una disminución de la actividad de hasta el 50% (212).

### **1.5.6.3 Timidilato Sintasa de *L. casei***

La timidilato sintasa es un homodímero que cataliza la metilación reductiva de la desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP), un precursor esencial en la síntesis del DNA. Ya que la biosíntesis de dTMP depende única y exclusivamente de esta ruta en todos los organismos, esta enzima es una diana terapéutica atractiva en la búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer (213). Su sitio activo está formado por residuos de ambas subunidades, por lo que cualquier alteración en la estructura cuaternaria de la proteína sería deletérea para la actividad. La interfaz de esta sintasa está formada por la interacción entre dos estructuras de 6 láminas  $\beta$ . Un péptido diseñado que forma una de las horquillas  $\beta$  de la estructura en la interfaz demostró inhibir de manera efectiva la actividad de la enzima promoviendo su agregación (214,215).

### **1.5.6.4 Triosa Fosfato Isomerasa de *P. falciparum* y *T. cruzi***

La triosa fosfato isomerasa (TFI) cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato y, en la mayoría de organismos estudiados, está presente en forma de homodímero (216). En la interfaz de esta proteína se hallan dos asas (1 y 3) que

han demostrado ser esenciales para la asociación entre las subunidades ya que mutaciones que alteran la secuencia de residuos de esas estructuras conducen a variantes de la proteína que muestran una actividad enzimática reducida y defectos en el proceso de asociación (217). Basados en estas asas se diseñaron péptidos que son capaces de reducir la actividad de la TFI de *P. falciparum* y alterar la estabilidad de su estructura cuaternaria (218).

En el caso de la TFI de *Trypanosoma cruzi* se reportó que la ditiodianilina (DTDA) es capaz de inhibir la dimerización de la enzima con una  $CI_{50}$  de 258 nM (219). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se logra perturbar la estructura de la proteína es diferente. Al parecer, DTDA induce la alquilación de una cisteína que promueve un cambio conformacional en la interfaz, más específicamente en el asa 3. Esta perturbación de la interfaz conlleva una agregación de la proteína causando así la inhibición de la misma (219,220).

#### 1.5.6.5 *Glutación Reductasa Humana*

Al igual que la tripanotión reductasa, la glutatión reductasa humana (hGluR) es un homodímero cuyos monómeros están acomplejados cada uno de ellos con una molécula de FAD como grupo prostético. Aunque cada monómero tiene un sitio catalítico, ambos están constituidos por residuos procedentes de ambas subunidades. Por esta razón el monómero aislado es inactivo (126). A diferencia de las enzimas virales descritas, la disociación de la hGluR *in vitro* no es sencilla debido a la alta estabilidad del dímero gracias a la amplia zona de interacción entre ambas subunidades. Experimentos de dilución de la proteína nativa demostraron que su conformación como dímero es altamente estable, manteniendo su actividad hasta llegar a concentraciones picomolares. Esto sugirió que el diseño de los inhibidores para la hGluR debería estar enfocado en su unión a las subunidades durante el proceso de plegamiento. Un péptido que se corresponde con una hélice  $\alpha$  de la interfaz fue capaz de inhibir el 50% de la actividad de la GluR a 20  $\mu$ M (126) en un ensayo de plegamiento y reactivación en el que se empleó un agente caotrópico para separar las subunidades. No fue posible detectar ningún efecto sobre la enzima en ausencia de agentes inductores de la desdimerización.

### 1.5.7 Métodos para la detección de la disociación de proteínas diméricas

Existen diversas metodologías que permiten la detección de dímeros y monómeros en equilibrio tales como la cromatografía de exclusión molecular (CEM), la centrifugación analítica de equilibrio de sedimentación (CAES), la fluorescencia y la resonancia de plasmones.

#### 1.5.7.1 *Cromatografía de exclusión molecular (CEM) y centrifugación analítica de equilibrio de sedimentación (CAES).*

La CEM ha sido ampliamente utilizada para determinar las velocidades de disociación para aquellas enzimas con una  $K_D$  del orden de micromolar y para homodímeros que requieran de un desencadenante, como es el caso de la iNOS. Los resultados cuantitativos obtenidos a partir de esta metodología suelen depender de la separación espacial de los monómeros y los dímeros y la distribución no homogénea de la concentración de proteína a lo largo de la columna. En el caso de un intercambio rápido monómero/dímero, el equilibrio de disociación dependerá del tiempo de elución, pero, incluso si el intercambio monómero/dímero ha alcanzado la fase estacionaria, el grado de equilibrio de disociación obtenido no refleja la realidad con respecto a la muestra antes de ser eluida. De igual manera, la proteína podría también interaccionar con la fase estacionaria, lo cual también tendría un efecto sobre la  $\Delta G$  de disociación del dímero. La CAES puede solucionar estos problemas debido a que las fuerzas mecánicas y químicas están en equilibrio y a que se puede analizar la distribución radial de las proteínas para obtener información cualitativa de las reacciones de asociación que llevan a cabo las proteínas estudiadas (126,221–223).

#### 1.5.7.2 *Fluorescencia*

Los métodos fluorescentes son más sensibles a los cambios en la conformación cuaternaria de las proteínas. Los cambios en el espectro de emisión de fluorescencia pueden ser detectados tras agregar el inhibidor de la dimerización. Sin embargo, la aplicabilidad de esta metodología depende del número de residuos de triptófano presentes en la proteína (224). Para solventar esto es posible la adición de etiquetas (*tags*) fluorescentes en posiciones estratégicas que permitan detectar la disociación de los complejos proteicos. Por ejemplo, en el caso de la timidilato sintasa de *L. casei*, la cisteína presente en el sitio activo puede dansilarse

de manera que se pueden evaluar los cambios en el estado conformacional de la proteína mediante cambios detectados en la emisión de fluorescencia (214).

### **1.5.7.3 Resonancia de Plasmones (SPR)**

La resonancia de plasmones superficiales, SPR por sus siglas en inglés, es una metodología óptica ampliamente utilizada para el estudio de las interacciones entre macromoléculas. La SPR se basa en el cambio de la frecuencia de los plasmones superficiales de un film metálico sobre el cual se encuentra inmovilizada una macromolécula a la que se denomina ligando (en este caso una proteína dimérica o sus subunidades). Cuando el ligando interactúa con una molécula de interés (analito), es posible detectar en tiempo real la unión entre las dos moléculas, las velocidades del proceso de asociación/disociación y la cantidad de analito unido (225). Cabe señalar que los resultados darían información acerca de la interacción de los dímeros y monómeros con el inhibidor, pero no de la capacidad de la molécula inhibitoria de actuar como un agente disociador. Además, a pesar de la potencia de esta técnica, su implementación en proteínas diméricas con una constante de disociación baja es complicada debido a las dificultades que supondría unir las subunidades de forma individual (126,218).

### **1.5.7.4 Cristalografía de Rayos X**

La cristalografía de rayos X es la metodología más poderosa entre las aquí mencionadas, ya que permite determinar cómo y en dónde se une un inhibidor a una proteína. Esta información es muy útil en el desarrollo de nuevos fármacos ya que permite, de manera racional, diseñar sobre una base estructural posibles modificaciones que mejoren la afinidad del inhibidor por su diana. Esta técnica es bastante robusta y los métodos computacionales y experimentales empleados en la actualidad, tales como el uso de técnicas avanzadas en la expresión de proteínas recombinantes, el uso de robots cristalográficos y el acceso a fuentes de radiación de sincrotrón, se encuentran bien desarrollados. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las estructuras cristalinas representan un promedio en el tiempo y en el espacio de las moléculas presentes en el entramado del cristal, las cuales pueden tener variaciones conformacionales en su estructura. Estas variaciones conformacionales suelen ser ignoradas, pero pueden contener información acerca del movimiento de las estructuras dentro de la proteína y de su flexibilidad que podrían ser importantes para su función (226). Además, la implementación de esta metodología desde el punto de vista técnico es bastante compleja y

su éxito está supeditado a la disponibilidad de un cristal de la proteína de interés junto a su inhibidor, lo cual no siempre es posible. Esta técnica ha sido usada con éxito para determinar la naturaleza disociativa de un inhibidor de la integrasa del VIH cuando el cristal reveló que el inhibidor se encontraba entre las subunidades (227).

#### **1.5.7.5 Estrategias Alternativas**

Las metodologías mencionadas tienen 3 características fundamentales: i) su alta complejidad técnica, ii) el uso de equipos altamente especializados y iii) la dificultad de su implementación para proteínas con una constante de disociación baja. Con el fin de superar estos obstáculos se pueden emplear metodologías alternativas que, de manera indirecta, nos den información acerca del proceso de disociación de dímeros a monómeros. Una de estas metodologías es producir proteínas con mutaciones en la interfaz de dimerización que hagan que la conformación cuaternaria de la proteína sea más inestable y probar los inhibidores sobre estas mutantes (219). Otra estrategia empleada es el uso de un ensayo de desnaturalización/renaturalización en el cual se usan agentes caotrópicos, como el hidrocloreto de guanidina, para desnaturalizar una proteína. Tras la desnaturalización se añade una molécula inhibidora mientras se disminuye la concentración de desnaturalizante para permitir la renaturalización de la proteína. Tras la renaturalización, se mide la actividad remanente de la proteína en presencia de inhibidor versus un control (126). Se han utilizado con éxito diferentes variantes de proteínas nativas en la identificación de moléculas que afectan el proceso de dimerización en la TFI de *T. cruzi* y el de desnaturalización/renaturalización en hGluR (126,219).

En 2006 *Sluis-Cremer* y colaboradores (228) implementaron con éxito una metodología novedosa para detectar inhibidores de la dimerización de la Transcriptasa Reversa (TR) del VIH en la cual no se requiere el uso de agentes desnaturalizantes ni es necesario desestabilizar la proteína mediante cambios en la naturaleza de los aminoácidos que forman la interfaz de dimerización. Además, la detección no depende de equipos especializados y, al ser realizada en placas multipocillo, es fácilmente escalable. En este ensayo se fusionaron *tags* (FLAG y HIS) a cada una de las subunidades que componen la TR (p66 y p51) y estas fueron co-incubadas para generar una proteína que contenía ambos *tags*. Posteriormente se fijó la TR de manera específica (HIS) sobre una placa de poliestireno y, tras ser incubada con un inhibidor, se detectó el dímero remanente utilizando anticuerpos que reconocían la subunidad que no estaba unida a la placa (FLAG). De esta manera se lograron identificar

varias moléculas que tenían la capacidad de perturbar el estado dimérico de la TR del VIH (228).



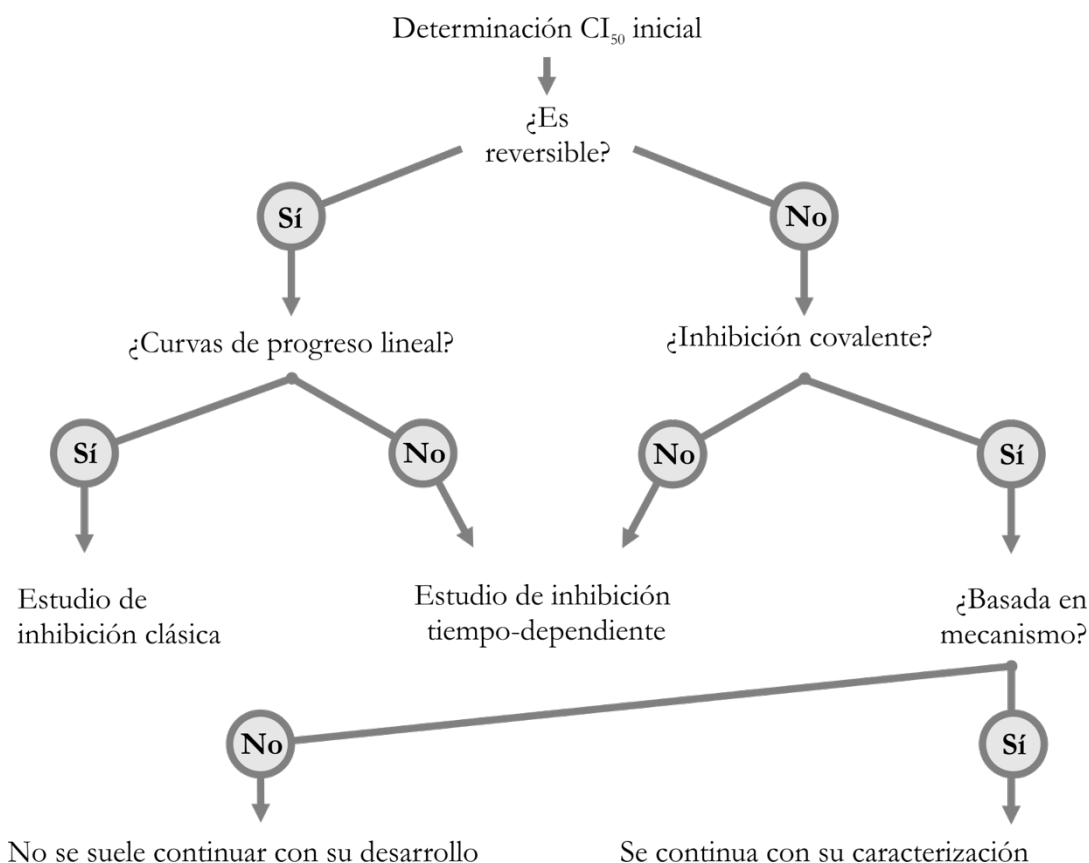
## 1.6 Herramientas Bioquímicas para el Estudio de Inhibidores Enzimáticos

Cuando se diseña un inhibidor enzimático que se pretende que afecte a la supervivencia de un organismo patógeno, la meta es lograr encontrar una molécula que pueda servir como guía (ya sea en una estrategia antigua o nueva) que lleve al desarrollo de un cabeza de serie susceptible de ser optimizado con el fin último de obtener un fármaco (229).

Este camino es un proceso iterativo que incluye la síntesis de una multitud de moléculas con pequeñas variaciones entre sí seguida de innumerables evaluaciones bioquímicas y biológicas. La meta inicial es entender los determinantes estructurales de la afinidad entre la molécula y su diana a través del desarrollo de una relación entre la estructura y la actividad haciendo uso de ensayos enzimáticos *in vitro*. Partes subsecuentes de este tipo de estudios, como la actividad intracelular, la actividad *in vivo*, la optimización de la permeabilidad de membrana, la biodisponibilidad oral y otros parámetros farmacocinéticos, todas ellas esenciales para el desarrollo de fármacos, forman parte ya de otro tipo de estudios diferentes (229).

A través de pequeñas variaciones químicas realizadas de manera sistemática, como es el caso de la sustitución de aminoácidos en una secuencia peptídica, se pueden plantear hipótesis acerca de las interacciones esenciales de la molécula con la proteína diana. Este proceso iterativo puede ser alimentado con información estructural de cristalografía de rayos X, espectroscopía de RMN o modelado computacional. De esta forma, los compuestos son repetidamente modificados hasta que se obtienen las características físicas, bioquímicas y biológicas deseadas (229).

Para comenzar, es necesario evaluar los compuestos con el fin de entender su mecanismo de inhibición sobre la enzima diana. Esta información es crítica para asegurar que las modificaciones generadas son correctamente evaluadas en términos de afinidad relativa. En la **Figura 1.17** se propone un diagrama de flujo de los diferentes estudios bioquímicos que deberían ser realizados para determinar el mejor método de evaluación (229).



**Figura 1.17** | Propuesta de diagrama de flujo a seguir durante la evaluación de inhibidores enzimáticos (229).

Como se puede ver en el diagrama de la **Figura 1.17**, el primer paso en la evaluación de un compuesto es la determinación de la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ). Este valor se define como la concentración de inhibidor necesaria para saturar la mitad de la población enzimática en condiciones experimentales específicas y es usada con regularidad como una medida de potencia relativa entre compuestos. **Ecuación 1.3**.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{100}{1 + \left(\frac{CI_{50}}{[I]}\right)}$$

**Ecuación 1.3** | Ecuación para el cálculo de la  $CI_{50}$  en términos de % de inhibición en lugar de actividad fraccional.

Es muy importante tener en cuenta que los valores de  $CI_{50}$  son específicos del ensayo realizado y que se ven impactados significativamente dentro del mismo por cambios sutiles en las soluciones como lo son el pH, la fuerza iónica, la temperatura y, más importante aún, la concentración de sustrato. Por ello, es de vital importancia la implementación de un ensayo altamente reproducible que permita determinar de manera fiable un efecto dosis-respuesta

entre un inhibidor y su enzima diana para obtener un valor de  $CI_{50}$  que permita comparar la potencia de diferentes variantes del mismo (229). Después de determinar la  $CI_{50}$  y según las características que presente el inhibidor, como reversibilidad y linealidad, se puede elegir de forma deliberada la aproximación bioquímica más adecuada para el inhibidor en cuestión.

### 1.6.1 Más Allá de la Dosis-Respuesta.

Aunque las curvas dosis-respuesta son de utilidad al comparar una variedad de inhibidores entre sí en un ensayo específico, se quedan cortas cuando se pretenden estudiar los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la inhibición. Al estudiar la afinidad relativa, por ejemplo, de un inhibidor competitivo reversible, se puede hipotetizar la estructura de su sitio activo cuando se carece de modelos tridimensionales de cristalografía de rayos X. Además, el conocer el mecanismo de inhibición permite realizar diferentes comparaciones cuantitativas entre diferentes compuestos frente a la enzima diana o la afinidad de un compuesto en particular entre diferentes blancos potenciales. Al conocer el mecanismo, las comparaciones se pueden realizar bajo las bases racionales de la constante de disociación entre la enzima y el inhibidor ( $K_i$ ). Esta definición también ayuda si se quiere determinar la energía libre de unión de Gibbs ( $\Delta G$ ) y los cambios de esta en función de los cambios estructurales en el compuesto o la enzima. En última instancia entonces, se podrían definir las contribuciones energéticas de diferentes tipos de interacciones específicas entre grupos de la enzima y el compuesto y, a partir de estos, evaluar toda la energía de unión de la interacción (229).

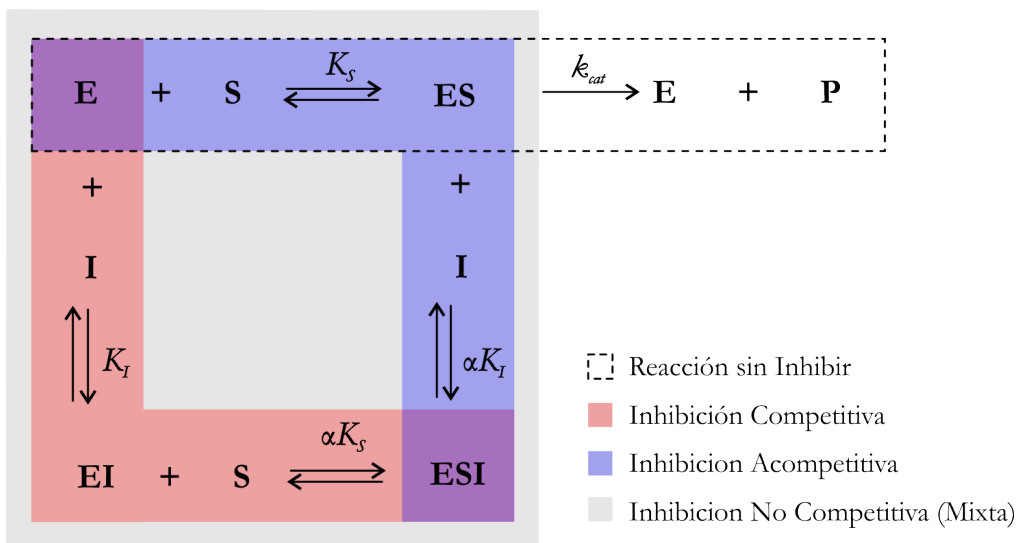
Los inhibidores enzimáticos son comunes en la naturaleza, aportando mecanismos de control, siendo los más comunes aquellos que se unen de forma reversible a su proteína diana con una alta velocidad de asociación y disociación. Las moléculas que se comportan de esta manera son conocidas como inhibidores reversibles clásicos y se ajustan a modelos clásicos de inhibición (competitiva, acompetitiva y no competitiva). Sin embargo, también existen inhibidores que pueden actuar de forma irreversible con una naturaleza de unión fuerte y que establecen el equilibrio de asociación y disociación en una escala de tiempo más lenta (inhibidores tiempo-dependientes) (229,230).

## 1.6.2 Modelos clásicos de inhibición (Inhibición Lineal)

Los denominados modelos clásicos de inhibición han sido descritos de manera extensa en los libros de bioquímica básica por lo que solamente se van a definir de forma somera.

Con el fin de entender las bases moleculares de la inhibición es de utilidad reflexionar acerca del equilibrio en solución que ocurre entre la enzima (**E**), su sustrato (**S**) y el inhibidor (**I**).

En la **Figura 1.18** se esquematizan las potenciales interacciones que se pueden presentar entre las diferentes moléculas en una reacción con un inhibidor clásico. En este esquema  $K_s$  es la constante de equilibrio de la disociación del complejo **ES** a enzima sustrato libre,  $K_I$  es la constante de disociación del complejo **EI** y  $k_{cat}$  es la constante de la formación de producto a partir de los complejos **ES**. El factor  $\alpha$  hace referencia al efecto del inhibidor en la afinidad de la enzima por su sustrato y, de igual manera, al efecto del sustrato en la afinidad de la enzima por el inhibidor.



**Figura 1.18** | El esquema engloba los equilibrios presentes en una reacción sin inhibidor (líneas punteadas) y en presencia de un inhibidor competitivo (rojo), un inhibidor acompetitivo (azul) y un inhibidor no competitivo (gris).

### 1.6.2.1 Inhibición Competitiva

La inhibición competitiva hace referencia al caso en el cual el inhibidor se une de manera exclusiva a la enzima libre (**E**) y no al complejo **ES**. En este tipo de inhibición tanto el inhibidor como el sustrato compiten por la misma forma de la enzima y, generalmente, su

unión a esta es mutuamente excluyente. Comúnmente, la unión del inhibidor se produce en el sitio activo, compitiendo directamente con el sustrato por el mismo sitio de unión a la enzima. En la inhibición competitiva  $\alpha=\infty$  (229,230) (no existe formación del complejo **ESI**). El cálculo de la  $K_I$  para los inhibidores competitivos está dado por la **Ecuación 1.4**.

$$v = \frac{V_{MAX}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Ecuación 1.4 | Inhibición competitiva}$$

### 1.6.2.2 Inhibición Acompetitiva

Los inhibidores incompetitivos se unen únicamente al complejo **ES**. El efecto aparente del inhibidor incompetitivo es la disminución de la  $V_{MAX}$  y la disminución de la  $K_M$  (incrementando la afinidad de la enzima por su sustrato). Por lo anterior, los inhibidores incompetitivos son caracterizados por un  $\alpha < 1$  (229,230) (El complejo **ESI** no se disocia de forma apreciable a **EI + S**). El cálculo de la  $K_I$  para los inhibidores incompetitivos está dado por la **Ecuación 1.5**.

$$v = \frac{V_{MAX}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_I}\right) + K_M} \quad \text{Ecuación 1.5 | Inhibición incompetitiva}$$

### 1.6.2.3 Inhibición No Competitiva (mixta)

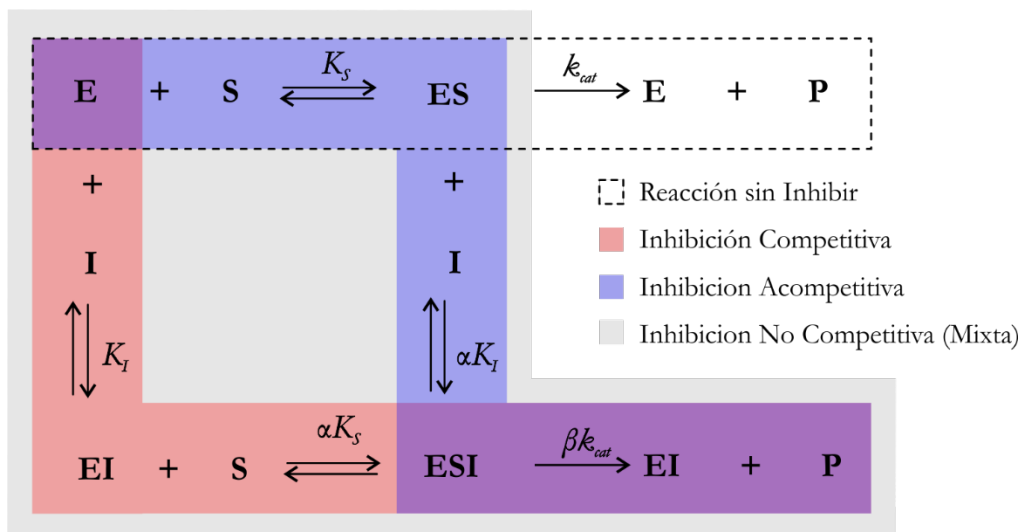
La inhibición no competitiva hace referencia al caso en el cual el inhibidor muestra una afinidad tanto por la enzima libre como por el complejo **ES**. De hecho, tanto la unión competitiva, como incompetitiva son casos restringidos de inhibición no competitiva en los cuales el valor de  $\alpha$  tiende a infinito o a cero respectivamente. De aquí que también sea conocida como inhibición mixta (229,230). El cálculo de la  $K_I$  para los inhibidores no competitivos está dado por la **Ecuación 1.6** (Que en realidad puede considerarse como la ecuación general que describe los tres tipos de inhibición clásica).

$$v = \frac{V_{MAX}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_I}\right) + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Ecuación 1.6 | Inhibición no competitiva}$$

### 1.6.3 Inhibición Hiperbólica.

En los modelos clásicos de inhibición descritos hasta el momento se asume que el complejo formado por enzima-sustrato-inhibidor (**ESI**) es siempre catalíticamente inactivo. Sin embargo, esta premisa no es siempre correcta. En el caso de la inhibición mixta, en la que el inhibidor suele unirse a un sitio distinto del centro activo, es razonable contemplar la posibilidad que el complejo **ESI** sea catalíticamente activo, aunque con un valor de  $k_{cat}$  distinto al del complejo **ES**. De hecho, la nueva  $k_{cat}$  tendrá un valor menor que el de la original en el caso de compuestos que actúan como inhibidores, pero podrá tener incluso un valor superior en el caso de activadores.

El esquema general de inhibición se complica por tanto ligeramente al incluir la posibilidad de generar producto a partir del complejo **ESI**. (**Figura 1.19**)



**Figura 1.19** | El esquema engloba los equilibrios ya mostrados en la **Figura 1.18** añadiendo el caso en el cual se genera producto a partir del complejo **ESI** con el modificador  $\beta$ .

El factor  $\beta$  hace referencia a la modificación causada por el inhibidor en la velocidad de formación de producto una vez formado el complejo **ES** ( $k_{cat}$ ). Un inhibidor que bloquee por completo la actividad de la enzima tendrá un valor de  $\beta$  igual a cero (estaremos hablando de un inhibidor clásico) mientras que aquel que la bloquee de manera parcial tendrá un valor entre cero y uno. De igual forma, si  $\beta$  resultará ser  $>1$ , estaríamos hablando de un activador. De esta forma, el valores de  $\alpha$  proporciona información del grado de modificación que un ligando, ya sea sustrato o inhibidor, tiene en la unión del otro ligando definiendo diferentes modos de interacción del inhibidor con la enzima (229,230). Por otra parte, el valor de  $\beta$  da

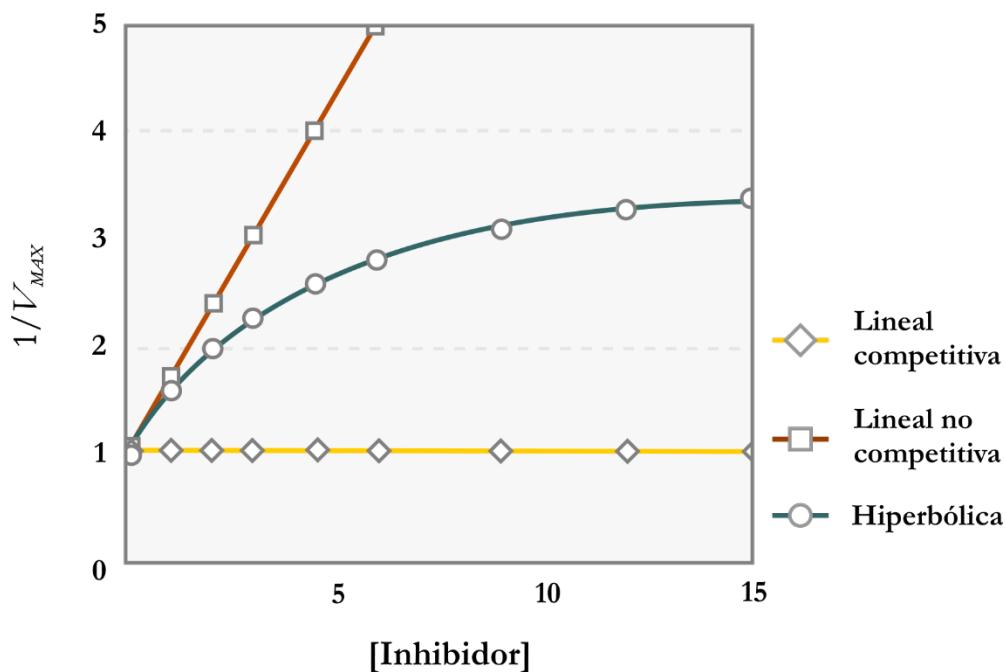
idea de la variación de la eficiencia catalítica del complejo **ES** causada por la unión al inhibidor. Este proceso de catálisis está descrito por la **Ecuación 1.7**.

$$v = \frac{V_{MAX} S}{K_M \left( \frac{1 + \frac{I}{K_I}}{1 + \frac{\beta I}{\alpha K_I}} \right) + S \left( \frac{1 + \frac{I}{\alpha K_I}}{1 + \frac{\beta I}{\alpha K_I}} \right)}$$

**Ecuación 1.7** | Ecuación general que engloba los modelos de inhibición clásicos e inhibición hiperbólica.

En realidad, esta expresión puede considerarse como la ecuación general aplicable tanto a los tres modelos clásicos como al de inhibición hiperbólica (231).

Las denominaciones lineal e hiperbólica aplicadas a estos dos tipos de inhibición derivan de la forma de la gráfica que se obtiene al representar  $1/V_{MAX}$  frente a las distintas concentraciones de inhibidor ensayadas. En los modelos clásicos, esta representación genera una recta, mientras que en los casos en los que el complejo **ESI** puede dar lugar a la aparición de producto, la representación genera una curva hiperbólica que da nombre al tipo de inhibición (231) (**Figura 1.20**).



**Figura 1.20** | Representación de las pendientes  $1/V_{MAX}$  frente a la concentración de inhibidor en la inhibición lineal e hiperbólica.

### 1.6.4 Inhibición Tiempo-Dependiente

Los inhibidores de carácter competitivo suelen establecer su equilibrio de unión con la proteína diana en una escala de tiempo rápida con respecto a la velocidad de la reacción de la enzima. Sin embargo, existen uniones de naturaleza fuerte que establecen este equilibrio en una escala de tiempo más lenta. Generalmente, cuando este es el caso, el investigador opta por obviar esta complicación experimental pre-tratando la enzima con el inhibidor (pre-incubación) por un tiempo y así asegurar que el equilibrio se alcance antes de iniciar la reacción con el sustrato (229,230).

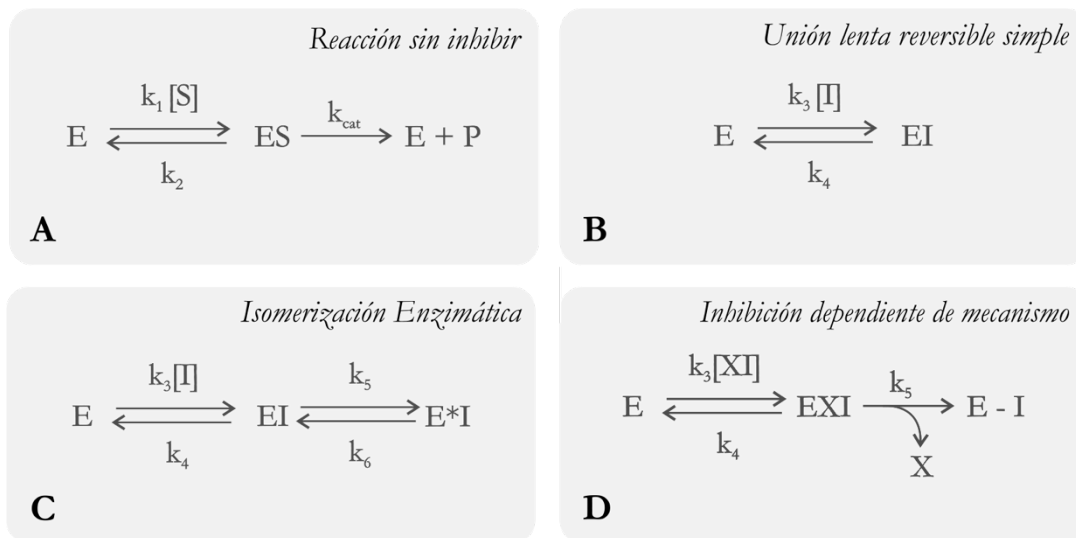
Al intentar diseñar moléculas novedosas que se distancien en su modo de acción de los modelos clásicos de inhibición, es importante tener en cuenta que el tipo de inhibición que estos presenten puede no ajustarse a los modelos matemáticos generales descritos en los libros de bioquímica básica. Ya en el trabajo doctoral del Dr. David Moreno se demostró que el denominado péptido 3 necesitaba de un tiempo de incubación para tener un efecto sobre la TryR (91). Los inhibidores que suelen requerir de una pre-incubación uniéndose de manera lenta a la enzima y requiriendo de un tiempo para producir su efecto se conocen como inhibidores *slow binding* o tiempo-dependientes.

#### **1.6.4.1 Modelos de inhibición tiempo-dependientes.**

Se pueden distinguir cuatro modos de interacción diferentes entre un inhibidor y una enzima que darían como resultado una cinética tiempo-dependiente. Los equilibrios relacionados en estos procesos se encuentran representados en la **Figura 1.21**

En la **Figura 1.21 A** se muestra el equilibrio característico de la reacción no inhibida. La constante  $k_1$  hace referencia a la constante de velocidad del proceso de unión del sustrato a la enzima para formar el complejo **ES**. La constante  $k_2$  hace referencia a la constante de velocidad del proceso de disociación del complejo **ES** a enzima libre y sustrato.  $k_{cat}$  es la constante catalítica.





**Figura 1.21 | Mecanismos de inhibición tiempo-dependientes.** **A.** Reacción en ausencia de inhibidor, **B.** Unión lenta reversible simple, **C.** Isomerización enzimática y **D.** Inhibición dependiente de mecanismo (230).

La **Figura 1.21 B** ilustra el equilibrio en un proceso de inhibición simple reversible que conduce a una inhibición tiempo-dependiente debido a que tanto  $k_3$  como  $k_4$  presentan unos bajos valores en comparación con  $k_{cat}$ . Como con los inhibidores de unión rápida, la constante del equilibrio de disociación  $K_I$  viene dada por la **Ecuación 1.8**.

$$K_I = \frac{k_4}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{Ecuación 1.8}$$

Según la **Figura 1.21 C**, la enzima encuentra al inhibidor y establece un equilibrio de unión que, al igual que en el **Figura 1.21 B**, sigue estando definido por las constantes  $k_3$  y  $k_4$ . Sin embargo, según este esquema, la unión del inhibidor induce un cambio conformacional en la enzima (isomerización) que conduce a un nuevo complejo enzima-inhibidor  $E^*I$ . Las constantes de formación y disociación de este nuevo complejo están dadas por  $k_5$  y  $k_6$  respectivamente. La constante de disociación para el complejo inicial  $EI$  sigue estando dada por  $K_I$ , pero una nueva constante de disociación para la segunda conformación de la enzima debe de ser tomada en cuenta ( $K_I^*$ ). Esta segunda constante de disociación viene dada por la **Ecuación 1.9**.

$$K_I^* = \frac{K_I k_6}{k_5 + k_6} = \frac{[E][I]}{[EI] + [E^*I]} \quad \text{Ecuación. 1.9}$$

Para que todos estos equilibrios realmente den lugar a un proceso de inhibición tiempo-dependiente,  $K_I^*$  debe ser mucho menor que  $K_I$ . Así, en esta situación la isomerización de la enzima lleva a una unión mucho más fuerte entre la enzima y el inhibidor.

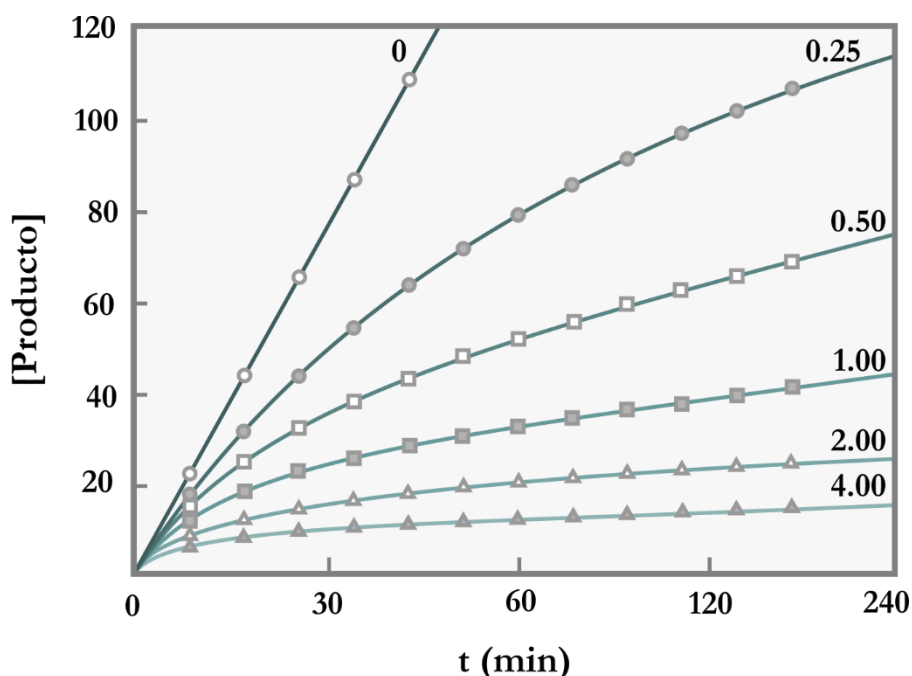
Hay que tener en cuenta que para observar un comportamiento de cinética de unión lenta no es suficiente con que la conversión de **EI** a **E\*I** sea lenta. La reacción reversa debe ser lenta también. De hecho, para que la unión lenta sea detectada, la constante reversa ( $k_6$ ) debe ser mucho más pequeña que la constante de isomerización ( $k_5$ ). En el caso extremo que  $k_6 \ll k_5$ , no será posible detectar el retorno a la conformación **EI** y el paso de isomerización de la enzima parecerá conducir a una inhibición irreversible. Bajo estas condiciones  $k_6$  puede ser considerada despreciable y la isomerización puede ser tratada como un paso irreversible dominado por la constante de velocidad  $k_5$ .

Finalmente, en la **Figura 1.21 D** se consideran dos modelos de interacción del inhibidor con la enzima para los cuales  $k_6$  es realmente igual a cero; es decir, se está produciendo una inactivación irreversible de la enzima. En todos los esquemas inhibitorios tenidos en cuenta hasta ahora, incluso en el caso de la inhibición de unión fuerte y lenta, la  $k_6$  no es igual a cero. Esta constante puede llegar a ser muy pequeña y por motivos prácticos ser considerada como una inhibición irreversible, pero, si se espera el tiempo suficiente y con la dilución adecuada del complejo **EI**, se puede recuperar de nuevo una población de enzima libre activa. En el caso de un inhibidor irreversible, la enzima que ha quedado unida al inhibidor queda permanentemente inactivada. Ningún periodo de tiempo y bajo ninguna dilución se podrá recuperar enzima libre activa tras la unión de este tipo de inhibidores. Tales inhibidores son conocidos como inactivadores enzimáticos (230).

El primer ejemplo de una inhibición irreversible es el proceso conocido como marcaje por afinidad (*affinity labelling*) o modificación covalente (*covalent modification*) de la enzima. En este caso, el inhibidor se une a la enzima y, de manera covalente, modifica uno o varios residuos catalíticos esenciales de la misma. La modificación covalente incluye una alteración química de la molécula inhibidora, pero el proceso está basado en una modificación química que ocurre en ausencia de la reacción catalítica. Los marcadores de afinidad son útiles no solo como inhibidores de la actividad enzimática sino también como herramientas valiosas en investigación. Algunos de estos compuestos son muy selectivos hacia residuos específicos por lo que pueden ser utilizados para identificar residuos importantes en los ciclos catalíticos de la enzima a la que inactivan (232,233).

La segunda forma de inactivación irreversible que debe ser tomada en cuenta es la inhibición basada en el mecanismo. En esta, la molécula inhibitoria se une al sitio activo de la enzima y es reconocida por esta segunda como un análogo del sustrato. El inhibidor es, de esta manera, modificado por la actividad catalítica de la enzima para formar un complejo **E-I** que habrá perdido su función catalítica de forma permanente. Muchos de estos inhibidores inactivan a la enzima al formar aductos **E-I** irreversibles. En otros casos, a pesar de que el inhibidor es posteriormente liberado de la enzima, esta queda permanente atrapada en un estado en el cual no puede realizar su actividad catalítica. Debido a que son químicamente alterados por el mecanismo de la catálisis enzimática en el sitio activo, los inhibidores basados en el mecanismo funcionan siempre como inactivadores competitivos. Según *Copeland (229)*, este tipo de inhibidores cuentan con las siguientes 7 características: i) la inhibición se da de manera tiempo dependiente, ii) la cinética de inactivación es saturable, iii) el sustrato debe proteger contra la inactivación, iv) la inactivación debe ser irreversible, v) la estequiometría de inactivación debe de ser  $\leq 1:1$  con la enzima, vi) la inactivación requiere de la catálisis y vii) la inactivación debe ocurrir antes de que se libere la enzima en forma activa.

#### 1.6.4.2 Curvas de la inhibición tiempo-dependiente



**Figura 1.22** | Ejemplo del progreso de las curvas de reacción en presencia de diferentes concentraciones un inhibidor tiempo-dependiente para una reacción iniciada al añadir la enzima a una mezcla del sustrato con el inhibidor. Las curvas están numeradas de acuerdo a la concentración relativa de inhibidor presente. Nótese que durante el curso de la reacción sin inhibidor el comportamiento de la reacción es lineal (230).

El progreso de las curvas de inhibición para una reacción enzimática en presencia de un inhibidor de unión lenta no muestra la relación lineal simple entre producto-vs-tiempo que se observa en una inhibición reversible simple. En su lugar, la formación de producto a lo largo del tiempo será una función curvilínea debido a la lenta aparición de la inhibición con estos compuestos.

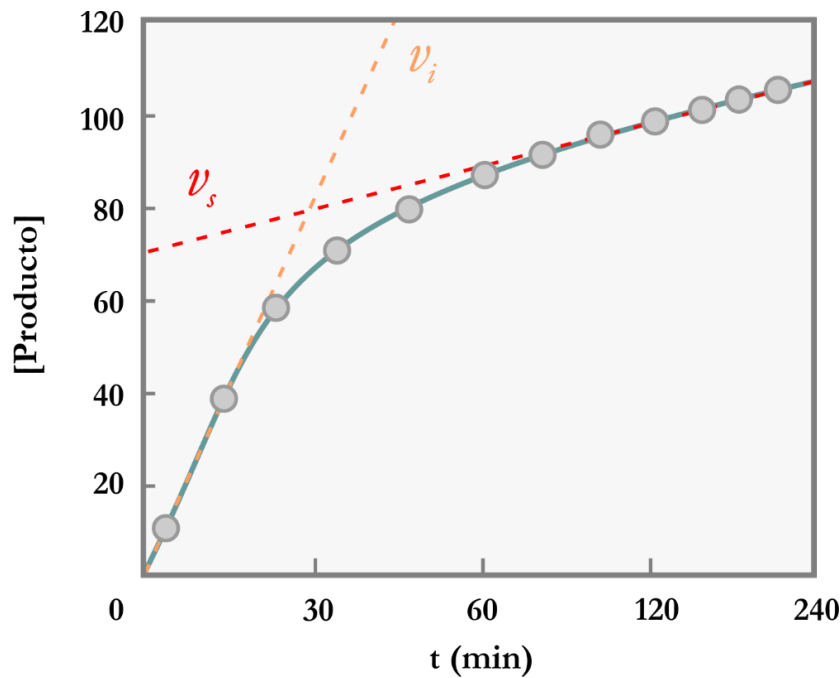
La **Figura 1.22** ilustra las curvas de progresión de una reacción en presencia de un inhibidor de unión lenta cuando la reacción se inicia por adición de la enzima. En ausencia de inhibidor se observa una relación lineal entre la concentración de producto y el tiempo, lo que nos indica que la reacción catalizada transcurre a una velocidad constante. Obviamente, esta relación lineal solo se mantiene durante el margen de tiempo en el que la disminución de la concentración de sustrato no es lo suficientemente relevante como para afectar a la velocidad de reacción. Sin embargo, incluso en estas condiciones iniciales, en presencia de un inhibidor de unión lenta la velocidad de la reacción disminuye progresivamente con el paso del tiempo hasta alcanzar una velocidad final menor que la inicial. Es importante volver a destacar que este tipo de comportamiento solo puede observarse durante los tiempos iniciales de la reacción catalizada en los que la disminución de sustrato no es lo suficientemente relevante como para causar una disminución de la velocidad en ausencia de inhibidor. Por lo anterior, es importante evaluar diferentes concentraciones de enzima, sustrato e inhibidor con el fin de encontrar un intervalo adecuado de cada una de ellas para así realizar las medidas tiempo-dependientes. Las condiciones ideales para este tipo de estudios son aquellas en las que se dispone de una reacción acoplada que permite regenerar el sustrato a partir del producto, de manera que la concentración de sustrato se mantiene constante durante un largo periodo de tiempo.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, las curvas a diferentes concentraciones de inhibidor (y una determinada concentración constante de sustrato) se pueden describir mediante la **Ecuación 1.10**.

$$[P] = v_s t + \frac{v_i}{k_{obs}} [1 - \exp(-k_{obs} t)]$$

**Ecuación 1.10** |  $v_i$  y  $v_s$  hacen referencia a las velocidades del estado inicial y estacionario (final, *stationary*) de la reacción en presencia del inhibidor.  $k_{obs}$  es la constante de velocidad de primer orden aparente para la interconversión entre la  $v_i$  y la  $v_s$ , y  $t$  es tiempo.

Uno de los parámetros clave para entender, y por ende describir, el proceso de inhibición lenta de una enzima es la  $k_{obs}$ . Esta constante describe la curvatura característica de la gráfica que representa la aparición de producto a lo largo del tiempo causada por los inhibidores de unión lenta. Por tanto, hace referencia a la conversión de la velocidad inicial de la reacción ( $v_i$ ) a la velocidad estacionaria final ( $v_s$ ) durante el proceso de inactivación enzimática por parte del inhibidor (**Figura 1.23**).



**Figura 1.23** | Curva de progreso típica de una reacción enzimática (línea verde con círculos) en presencia de un inhibidor de unión lenta. La velocidad inicial ( $v_i$ ) y la velocidad final o estacionaria ( $v_s$ ) están definidas por los valores de las pendientes en los momentos iniciales y finales de la curva como se indica por las líneas punteadas naranja y roja, respectivamente (**230**).

*Morrison y Walsh* (**234**) han facilitado expresiones matemáticas explícitas para  $v_i$  y  $v_s$  en el caso de un inhibidor competitivo de unión lenta, mostrando que, en el caso de los inhibidores del **esquema C**, estas son funciones de  $V_{MAX}$ ,  $[S]$ ,  $K_M$  y bien  $K_I$  o  $K_I^*$ . En la práctica, si se cuenta con suficientes datos experimentales, basta con tratar la **Ecuación 1.10** como una ecuación empírica que nos permita extraer, a partir de los datos experimentales, los valores de  $v_i$ ,  $v_s$  y, más importante aún,  $k_{obs}$ . Hay que tener en cuenta que  $v_i$  podría variar o no con la concentración de inhibidor, dependiendo de los valores relativos de  $K_I$  y  $K_I^*$  y la relación entre  $[I]$  y  $K_I$ . El valor de  $v_s$  será un valor finito diferente de cero mientras que el inhibidor no sea un inactivador enzimático irreversible, en cuyo caso el valor de  $v_s$  eventualmente llegará a cero. Nuestro propósito será emplear la ecuación de forma empírica, permitiendo

que  $v_b$ ,  $v_s$  y  $k_{obs}$  sean parámetros ajustables cuyos valores puedan ser determinados por un análisis no lineal de ajuste de curvas.

### 1.6.5 Tipos de inhibición tiempo dependiente.

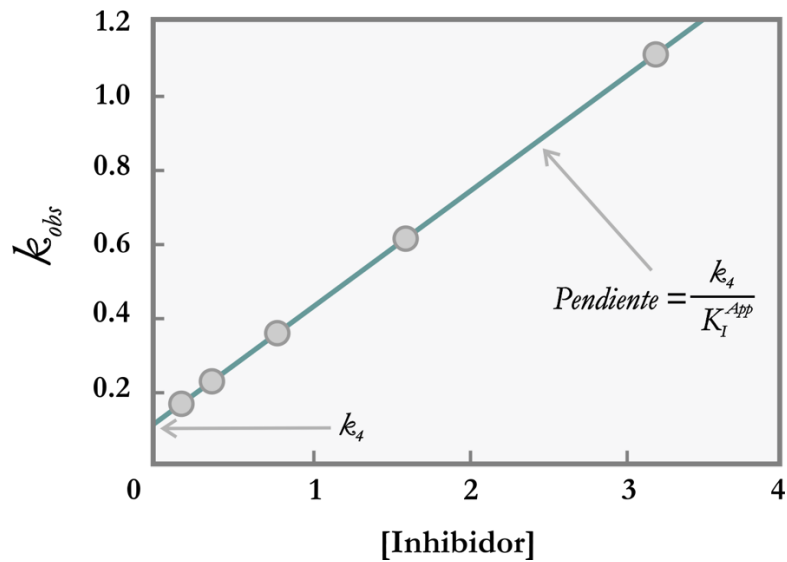
Para distinguir entre los esquemas ilustrados en la **Figura 1.19** se debe determinar el efecto de la concentración de inhibidor sobre la constante de velocidad aparente  $k_{obs}$ , efecto que será distinto en cada uno de ellos.

#### 1.6.5.1 Unión lenta reversible simple.

Para un inhibidor que se une a la enzima de acuerdo a la **Figura 1.21B**, unión lenta reversible simple, la relación entre  $k_{obs}$  y la concentración de inhibidor viene dada por la siguiente ecuación:

$$k_{obs} = k_4 \left( 1 + \frac{[I]}{K_I^{app}} \right) \quad \text{Ecuación 1.11}$$

$K_I^{app}$  es la  $K_I$  aparente, que estará relacionada con la  $K_I$  verdadera mediante diferentes funciones dependiendo del modo de interacción entre la enzima y el inhibidor, es decir, en función de que la inhibición sea competitiva, no competitiva o acompetitiva. De la **Ecuación 1.11** se puede deducir que una gráfica que represente los valores de  $k_{obs}$  en función de la concentración de inhibidor debería dar como resultado una línea recta cuya pendiente sería igual a  $k_4/K_I^{app}$  y que cortará al eje de ordenadas en un valor igual a  $k_4$  (**Figura 1.24**). De esta manera, un análisis de regresión lineal de estos datos permitirá deducir fácilmente los valores de  $k_4$  y  $K_I^{app}$ .



**Figura 1.24** | Gráfica de  $k_{obs}$  como función de la concentración de un inhibidor tiempo dependiente de acuerdo a un inhibidor de unión lenta reversible simple (230).

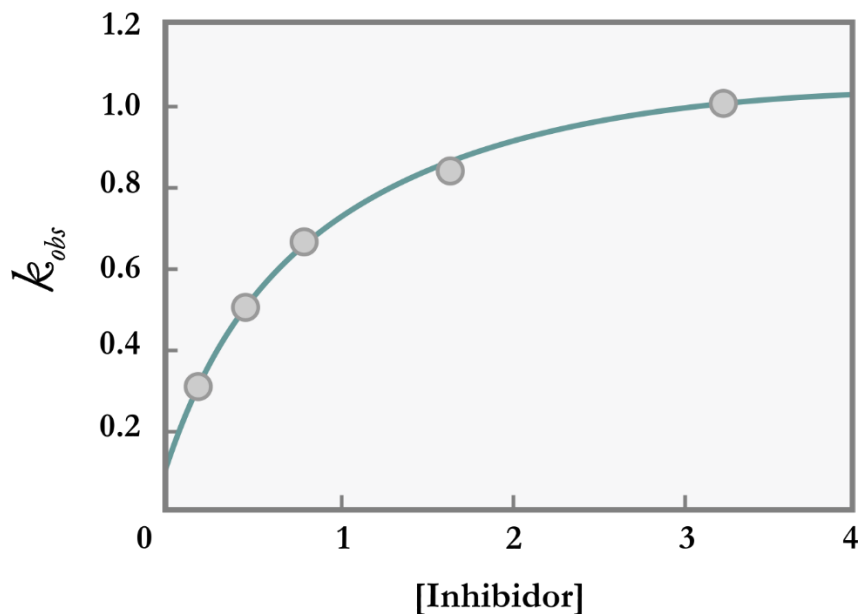
### 1.6.5.2 Isomerización Enzimática

Para aquellos inhibidores que se ajusten a la **Figura 1.21 C**, isomerización enzimática, la  $k_{obs}$  se relaciona con la concentración de inhibidor según la **Ecuación 1.12**.

$$k_{obs} = k_6 + \left( \frac{k_5[I]}{K_I^{app} + [I]} \right) \quad \text{Ecuación 1.12}$$

$$k_{obs} = k_6 \left[ \frac{1 + \frac{[I]}{K_I^{*app}}}{1 + \frac{[I]}{K_I^{app}}} \right] \quad \text{Reestructuración de 1.12}$$

La forma de las ecuaciones anteriormente planteadas predice que la  $k_{obs}$  variará como una función hiperbólica respecto de la concentración de inhibidor, tal y como se muestra en la **Figura 1.23**. El punto de corte en el eje de ordenadas permitirá estimar el valor de  $k_6$  mientras que el valor máximo de  $k_{obs}$ , esperado a una concentración infinita de inhibidor tomará el valor de  $k_5 + k_6$ . De aquí que, utilizando un ajuste no lineal de los datos a la **Ecuación 1.12**, se puedan determinar de manera simultánea los valores de  $k_6$ ,  $K_I^{app}$  y  $K_I^{*app}$ .



**Figura 1.23** | Gráfica de  $k_{obs}$  como función de la concentración de un inhibidor tiempo dependiente de acuerdo a un inhibidor que causa isomerización enzimática (230).

Nótese que, si la  $K_I$  es mucho más grande que la  $K_I^*$ , la concentración de inhibidor requerida para una inhibición de unión lenta sería mucho menor que la  $K_I$ . En estas circunstancias, la concentración de EI en el estado estacionario sería cinéticamente insignificante y la expresión para la  $k_{obs}$  quedaría reducida a la mostrada en la **Ecuación 1.13**.

$$k_{obs} = k_6 \left[ 1 + \frac{[I]}{K_I^{*app}} \right] \quad \text{Ecuación 1.13}$$

En este caso, la gráfica de  $k_{obs}$  en función de la concentración de inhibidor daría de nuevo una relación lineal, como en el caso de los inhibidores de unión lenta reversible. De hecho, cuando se obtiene una relación lineal en la gráfica de  $k_{obs}$  versus la concentración de inhibidor no es posible hacer una distinción entre unión lenta reversible e isomerización enzimática.

### 1.6.5.3 Marcaje por afinidad / Inhibición dependiente del mecanismo

Si la constante cinética  $k_6$  es muy pequeña, como en el caso de la isomerización enzimática, o cero, como en el esquema D (inhibición dependiente del mecanismo), el inhibidor actúa como inactivador irreversible de la enzima. En tales casos la ecuación de la  $k_{obs}$  se reduce a:



$$k_{obs} = \left[ \frac{k_5 [I]}{K_I^{app} + [I]} \right] \quad \text{Ecuación 1.14}$$

De nuevo una gráfica de  $k_{obs}$  en función de la concentración de inhibidor dará como resultado una curva hiperbólica, pero en este caso el punto de corte en el eje de las ordenadas será cero, reflejando el valor cercano a cero (o inexistente) de  $k_6$ .

Para los inhibidores irreversibles, la reacción reversa de **EI** a **E** libre e **I** libre está perturbada por la irreversibilidad del evento subsecuente de inactivación (representado como  $k_5$ ). Por esta razón *Tipton, Wilson y Kitz* (235,236) plantean que, para inactivadores irreversibles, el término  $K_I$  no representa la constante de disociación del complejo **EI**. En su lugar, el término  $K_I^{app}$  presentado en la **Ecuación 1.14** se define como la concentración aparente de inhibidor requerida para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de inactivación de la enzima (236). Con esta definición, los parámetros  $k_5$  y  $K_I^{app}$  son análogos a los parámetros de *Michaelis-Menten*  $V_{MAX}$  y  $K_M$  respectivamente. Manteniendo esta similitud, de la misma manera que la ratio  $k_{cat}/K_M$  es la mejor medida para definir la eficiencia catalítica de una enzima, la potencia inhibitoria de un inhibidor irreversible queda definida por la constante de segundo orden obtenida de la ratio  $k_5/K_I$ .

#### 1.6.5.4 Distinción entre los diversos tipos de inhibición de unión lenta.

Casi todos los inhibidores de unión lenta funcionan como inhibidores competitivos, uniéndose al sitio activo de la enzima (234,237). Sin embargo, es posible que la interacción entre el inhibidor y la enzima presente no solo un comportamiento competitivo sino también no-competitivo y acompetitivo.

Con el fin de determinar el modo de inhibición y así asegurar el uso de las relaciones adecuadas entre  $K_I^{app}$  y  $K_I$  y entre  $K_I^{*app}$  y  $K_I^*$ , se debe estudiar el efecto de la variación de las concentraciones de sustrato (a una concentración fija de inhibidor) en el valor de  $k_{obs}$ .

Las formas generales para estas relaciones se encuentran consignadas en siguientes ecuaciones:

$$k_{obs} = \frac{k}{1 + [S]/K_M} \quad \text{Ecuación 1.15 | Inhibición competitiva}$$

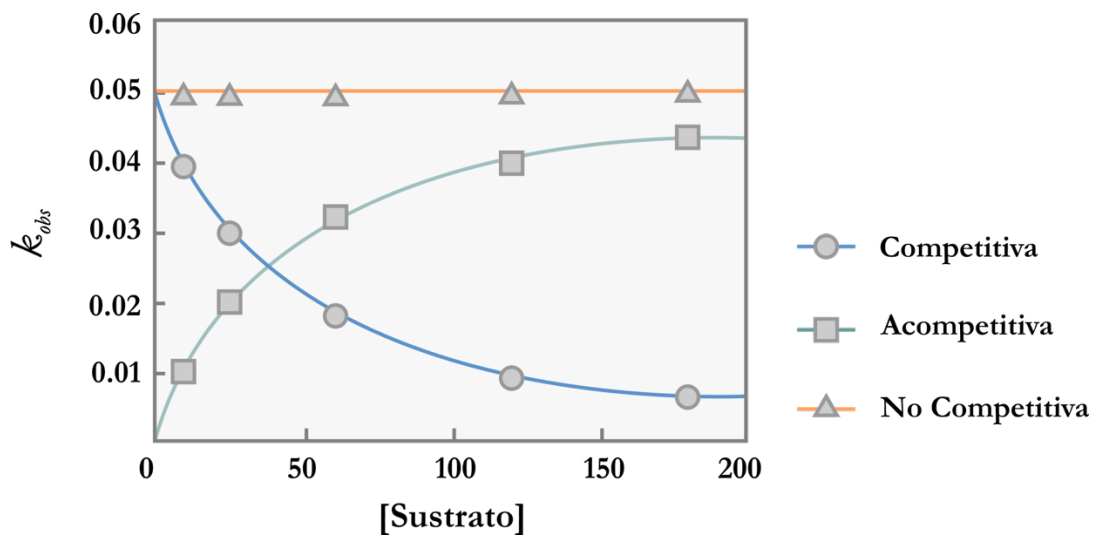
$$k_{obs} = k \quad \text{Ecuación 1.16 | Inhibición no competitiva}$$

$$k_{obs} = \frac{k}{1 + K_M/[S]}$$

**Ecuación 1.17** | Inhibición acompetitiva

La constante  $k$  en estas ecuaciones hace referencia a una variable empírica que se utiliza con el fin de realizar los ajustes de curva. De las **Ecuaciones 1.15, 1.16 y 1.17** se puede inferir que, en el caso de un inhibidor competitivo de unión lenta, el aumento de la concentración de sustrato causará una disminución de los valores de  $k_{obs}$ . En el caso de los inhibidores no competitivos, la  $k_{obs}$  no se verá afectada por cambios en la concentración de sustrato (en realidad esto solo puede afirmarse para el caso en que  $\alpha=1$ ). Por último, en los inhibidores acompetitivos, el valor de la  $k_{obs}$  se incrementará según aumente la concentración de sustrato (229,238).

Estas relaciones entre la  $k_{obs}$  y la concentración de sustrato se encuentran ilustradas en la **Figura 1.26**.



**Figura 1.24** | Comportamiento esperado de la  $k_{obs}$  con respecto a la concentración de sustrato para inhibidores tiempo-dependientes. Los círculos hacen referencia a una inhibición competitiva, los cuadrados a una inhibición acompetitiva y los triángulos a una inhibición no competitiva (230).

### 1.6.5.5 Determinación de los valores de $K_I$ y $K_I^*$

La gráfica que representa los valores de  $k_{obs}$  en función de la concentración de sustrato (**Figura 1.24**) nos permite identificar el tipo de inhibición causada por el inhibidor de unión lenta. Ahora, una vez determinado si se trata de una inhibición competitiva, acompetitiva o no competitiva, será posible determinar los valores reales de  $K_I$  y  $K_I^*$  a partir de sus valores

aparentes. En realidad, la relación entre estas constantes y sus valores aparentes es la misma independientemente de que se trate de una inhibición clásica o tiempo-dependiente. Teniendo en cuenta la concentración de sustrato utilizada para el cálculo de la  $K_I^{app}$  y la  $K_M$  de la enzima será posible transformar  $K_I^{app}$  en  $K_I$  (e igualmente  $K_I^{*app}$  en  $K_I^*$ ). Esta relación dependerá del modo de interacción entre enzima e inhibidor y está dada por cualquiera de las **Ecuaciones 1.18 – 1.21** según el caso (229,230).

$$K_I^{app} = K_I \left( 1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$$

**Ecuación 1.18** | para inhibidores competitivos.

$$K_I^{app} = \frac{[S] + K_M}{\frac{K_M}{K_I} + \frac{[S]}{\alpha K_I}}$$

**Ecuación 1.19** | para inhibidores no competitivos.

$$K_I^{app} = K_I$$

**Ecuación 1.20** | para inhibidores no competitivos cuando  $\alpha=1$

$$K_I^{app} = K_I \left( 1 + \frac{K_M}{[S]} \right)$$

**Ecuación 1.21** | para inhibidores acompetitivos.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

## 2.1 Hipótesis

La actividad enzimática de la tripanotión reductasa puede ser inhibida mediante el empleo de péptidos que, al simular parte de la interfaz de dimerización de la enzima, son capaces de inducir la separación de las dos subunidades que la componen.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo General

Desarrollar un péptido basado en la hélice  $\alpha$  ubicada entre los aminoácidos 435 y 447 del dominio que constituye la interfaz de dimerización de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* que sea capaz de desestabilizar la estructura dimérica de la enzima y disminuir su actividad catalítica.

### 2.2.2 Objetivos Específicos

- Mejorar el proceso de inducción y purificación de la tripanotión reductasa hasta alcanzar un nivel de pureza compatible con experimentos de cristalización
- Implementar un ensayo robusto y escalable de actividad de la tripanotión reductasa que permita evaluar de manera sencilla un alto número potenciales inhibidores.
- Desarrollar una metodología modular que permita cuantificar el estado de dimerización de la tripanotión reductasa y otras proteínas diméricas.
- Mejorar el péptido prototipo inicial mediante la identificación de los residuos más relevantes para el proceso de inhibición enzimática.
- Evaluar posibles mejoras en la actividad inhibidora de los péptidos mediante estrategias de estabilización de su estructura helicoidal.
- Determinar el mecanismo de acción de los péptidos más relevantes mediante estudios de cinética enzimática.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### **3.1 Reactivos**

Los reactivos para análisis utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EEUU). Los reactivos empleados en los procedimientos rutinarios de biología molecular fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU). En caso contrario, su origen se especifica en los procedimientos respectivos en los que fueron utilizados.

Los péptidos inhibidores de la TryR fueron sintetizados por el Grupo de Nucleósidos adscrito al Instituto de Química Médica (CSIC, Madrid). La síntesis de aquellos que fueron obtenidos de forma comercial se encargó a Peptide Protein Research (Hampshire, Reino Unido) y Genosphere Biotechnologies (Paris, Francia).

### **3.1 Análisis Bioinformáticos**

#### **3.1.1 Reconstrucción filogenética**

Para la reconstrucción filogenética de la TryR se usó la aplicación MEGA 6.0 que, en un entorno integrado, permite realizar alineamientos de secuencias, seleccionar el modelo más adecuado según el alineamiento, construir el árbol filogenético y realizar el análisis de *bootstrapping* (239). Los procedimientos seguidos se encuentran consignados en los apartados 4.1.1 y 4.1.3.

#### **3.1.2 Dinámica Molecular, definición del farmacóforo y cribado virtual.**

Los diversos análisis de dinámica molecular de la interacción de los diferentes péptidos con la enzima, la definición del farmacóforo y el cribado de moléculas pequeñas fueron realizados en el laboratorio del Dr. Federico Gago por los doctores David Moreno Mateos, Pedro Alejandro Sánchez Murcia, Marta Ruiz-Santa Quiteria Saavedra y Álvaro Cortés Cabrera. Los programas, procedimientos y equipos empleados se encuentran consignados en sus respectivas memorias doctorales (91,240–242).

### 3.1.3 Análisis de regresión no lineal (*Curve Fitting*)

Para los ajustes de regresiones no lineales de los datos obtenidos en los experimentos de inhibición se empleó el paquete informático GraFit 6.0 de Erithacus Software (Horley, UK). Esta aplicación incluye diferentes tipos de modelos teóricos de inhibición y permite introducir ecuaciones propias que no estén disponibles en el paquete (243).

## 3.2 Biología Molecular

### 3.2.1 Procedimientos Generales

Los procedimientos generales de biología molecular tales como la extracción de ácidos nucleicos, PCR, electroforesis en gel de agarosa, SDS-PAGE, clonación molecular y demás metodologías estándar que se han utilizado en este trabajo no se detallan en profundidad por estar extensamente descritos en la literatura (244). Los oligonucleótidos, mapas de los plásmidos y las secuencias de los genes y proteínas empleados en este trabajo se encuentran consignados en el **Anexo 1**.

### 3.2.2 Obtención de Proteínas Recombinantes

Las proteínas recombinantes utilizadas en esta tesis doctoral fueron producidas en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta de Merk Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU) y purificadas utilizando el sistema de purificación ÄKTA *purifier* junto a las columnas de cromatografía de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

#### 3.2.2.1 *Tripanotión Reductasa HIS-HIS y HIS-FLAG (TryR HH y TryR HF)*

El gen de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) se clonó en los plásmidos pRSET A para la versión de la enzima con el *tag* HIS (TryR HH) y en pET24a (Merck Millipore, Billerica, USA) para la versión con FLAG (TryR FF). En pET24a, la secuencia FLAG fue introducida de tal forma que se expresara en el extremo amino terminal de la TryR (**Tabla 3.1**).



Estos plásmidos fueron transformados en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  para su amplificación y en BL21 (DE3) Rosetta para la producción de las proteínas recombinantes. La transformación con los dos plásmidos para obtener bacterias capaces de producir las especies de TryR HF (HIS-FLAG) fue realizada con 1  $\mu$ l de una mezcla de ambos plásmidos a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l c/u. Para la producción de la TryR HH se siguió el protocolo de transformación de rutina. Las bacterias se incubaron en medio de lisogenia o LB (por sus siglas en inglés) sólido y líquido, según correspondiera, utilizando los antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/ml), kanamicina (50  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (25  $\mu$ g/ml) acorde al plásmido y a la cepa bacteriana utilizada.

|             |  |
|-------------|--|
| Nucleótidos | <b>5' GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG 3'</b> |
| Aminoácidos | DYKDDDDK                                     |

**Tabla 3.1** | Secuencia codificante (nucleótidos) y de aminoácidos del epítipo FLAG

Las bacterias BL21 (DE3) Rosetta con los plásmidos de interés en medio líquido se pusieron a crecer en agitación constante (250 RPM) a 37 °C hasta una densidad óptica de 0.5 AU a 600 nm, momento en el que se indujo la expresión de la proteína mediante adición de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM a una temperatura de 26 °C durante 16 horas. Tras este tiempo, las bacterias fueron colectadas por centrifugación y el precipitado bacteriano se resuspendió en tampón de lisis (NaCl 300 mM, Tris·HCl pH 7.0 50 mM, imidazol 25 mM) en una proporción de 10 mL por gramo de precipitado bacteriano. Tras la suspensión de las bacterias, se añadió el coctel inhibidor de proteasas PIC de Roche (Basilea, Suiza) según recomendación del fabricante y lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, incubándose en hielo por 30 minutos. Tras la incubación, la muestra se sonicó en frío mediante pulsos de medio segundo durante 30 minutos usando una micropunta a una potencia del 50 % y una amplitud de 7, empleando el sonicador *Branson cell disruptor B15* (Missouri, EEUU). Tras la sonicación se realizó una precipitación por centrifugación del detrito celular generado tras la lisis (47 000 RCF, 1 hora), tomándose el sobrenadante que contiene la TryR recombinante. Para disminuir la densidad de la muestra, esta fue sonicada de nuevo, con los ajustes ya descritos, por cinco minutos para posteriormente ser filtrada a través de una membrana de PVDF de 0.22  $\mu$ m de Merk Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU). La muestra filtrada se recirculó a 4 °C durante

16 horas a través de una columna de afinidad (HisTrap HP de GE) previamente equilibrada con tampón de lisis.

Tras la recirculación de la muestra, la columna se conectó al FPLC y se lavó con 100 mL de tampón de lisis al cual se le aumentó de manera gradual (gradiente) la concentración de imidazol de 25 mM a 150 mM. La proteína se eluyó con tampón de lisis con 200 mM de imidazol. A la proteína purificada se le realizó un cambio de tampón utilizando una cromatografía de exclusión molecular con una columna de Sephadex G-25 (HiTrap 26/10 desalting) dejando la proteína en un tampón que contiene Tris·HCL pH 7.5 y NaCl 50 mM. La proteína se concentró empleando un Amicon® de 30 000 MWCO Merk Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU) hasta llegar a una concentración de 2 mg/ml, tras lo que se añadió glicerol en proporción 1:1 y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Tras cada purificación se realizó un inmunoblot para constatar la presencia de los *tags* FLAG y HIS empleando los anticuerpos utilizados en el ensayo de dimerización (**Apartado 3.5**) y un ensayo de actividad para evaluar la actividad específica de la enzima.

### 3.2.2.2 *Tripanotión Reductasa para cristalización.*

El plásmido utilizado para la obtención de la TryR para cristalización es una modificación del pRSET A utilizado para la producción de la TryR HH en el que se ha introducido una secuencia de reconocimiento de la Proteasa 3c de Rhinovirus.

|             |  |
|-------------|--|
| Nucleótidos | <b>5' CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC 3'</b> |
| Aminoácidos | LEVLFQ↓GP                                    |

**Tabla 3.2** | Secuencia codificante (nucleótidos) y de aminoácidos de la región de reconocimiento de la proteasa 3c de Rhinovirus. La flecha indica la posición en que la proteasa realiza el corte.

La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo en las bacterias BL21 (DE3) Rosetta siguiendo un protocolo similar al empleado para la purificación de la TryR HF, obteniéndose resultados equiparables en todos los experimentos realizados. Tras realizar el intercambio de tampón mediante la columna de exclusión molecular, la proteína se digirió con la proteasa 3c de Rhinovirus en una proporción de 1:30 (proteasa:TryR). Tras la digestión, la muestra se recircula a través de las columnas de GST-trap y HisTrap conectadas tándem. De esta

forma la proteasa se queda unida a la columna GST-trap y las colas de histidina escindidas de TryR a la columna HisTrap, quedando la TryR digerida en el eluido.

La producción de la proteasa 3c de Rhinovirus empleada para el corte de los *tags* de la TryR se describe en el siguiente apartado.

### **3.2.2.3 Proteasa 3c de Rhinovirus.**

La secuencia que codifica para la proteasa 3c del Rhinovirus se encuentra en el plásmido pGEX-4T que expresa el gen de interés fusionado a la Glutación S-transferasa (GST), produciendo una proteína híbrida que cuenta con la GST en su extremo amino terminal. Las bacterias BL21 (DE3) Rosetta transformadas con el plásmido de interés se incubaron en medio líquido con los antibióticos correspondientes y en agitación constante (250 RPM) hasta una densidad óptica de 1 AU a 600 nm, momento en el cual se indujo la expresión a una temperatura de 20 °C durante 16 horas mediante adición de IPTG a una concentración final de 0.5 mM.

Los cultivos fueron centrifugados como ya se ha descrito y los precipitados resuspendidos en tampón de lisis (PBS 1x, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, lisozima 1 mg/ml) a razón de 10 ml de tampón por cada gramo de precipitado bacteriano. Tras la incubación, la muestra se sonicó en frío de manera continua durante 2 minutos a máxima potencia usando un cuerno ultrasónico (*ultrasonic horn*) de media pulgada. Tras la sonicación se realizó una precipitación por centrifugación del detrito celular (47 000 RCF, 1 hora), tomándose el sobrenadante que contiene la proteasa de Rhinovirus 3c. Para disminuir la densidad de la muestra, esta fue sonicada de nuevo con los ajustes ya descritos durante 30 segundos y posteriormente filtrada a través de una membrana de PVDF de 0.45 µm de Merk Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU). El lisado así obtenido se inyectó en el FPLC con una columna GST-trap previamente lavada y equilibrada según recomendación del fabricante. La proteína se eluyó con 10 mL de tampón de lisis conteniendo 20 mM de glutatión reducido. Con la proteína eluida se realizó una cromatografía de exclusión molecular (HiTrap Desalting) con el fin de realizar un intercambio de tampón a 20mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM DTT. La proteína se concentró empleando un Amicon® de 30 000 MWCO Merk Millipore (Billerica, Massachusetts, EEUU) hasta llegar a una concentración de 2 mg/ml, tras lo que fue repartida en alícuotas y congelada a -80 °C hasta su uso.

### 3.2.2.4 *Glutación Reductasa Humana*

El gen de la glutación reductasa humana fue clonado emulando el sistema usado con éxito para la clonación y expresión recombinante de la tripanotión reductasa de *L. infantum*, empleando el plásmido pRSET A para la versión con HIS y pET24a para la versión con FLAG. De igual forma, la expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo en las bacterias BL21 (DE3) Rosetta y los ajustes para su purificación mediante el sistema de cromatografía líquida Äkta *purifier* fueron iguales a los usados con la TryR, obteniéndose resultados equiparables en todos los experimentos realizados.

## 3.3 Ensayo de Actividad de la Tripanotión Reductasa

### 3.3.1 Ensayo General

El ensayo de actividad de la tripanotión reductasa está basado en el descrito por Hamilton, incorporando algunas modificaciones propias que se describen a continuación. La innovación más relevante consistió en la inclusión de NADP<sup>+</sup> en la reacción (245). Fue importante establecer las condiciones óptimas de almacenamiento de los reactivos utilizados en el ensayo con el fin de conservar la reproducibilidad de los datos, por lo que estos se almacenaron en los volúmenes adecuados según la cantidad que se esperaba emplear y a concentraciones elevadas, cercanas a su límite de solubilidad a -20°C. Estas alícuotas una vez descongeladas y utilizadas son descartadas (**Tabla 3.3**).

| REACTIVO             | CONCENTRACIÓN                    |
|----------------------|----------------------------------|
| HEPES                | 2M pH 7.5                        |
| EDTA                 | 400 mM                           |
| NADP <sup>+</sup>    | 15 mM (Preparado en HEPES 40 mM) |
| DTNB                 | 10 mM (Preparado en HEPES 40 mM) |
| NADPH                | 15 mM (Preparado en HEPES 40 mM) |
| Péptidos o Moléculas | 5 mM (Preparadas en DMSO)        |
| TS <sub>2</sub>      | 10 mM (Preparado en HEPES 40 mM) |

**Tabla 3.3** | Concentraciones de almacenamiento de las soluciones madres empleadas para realizar los ensayos de actividad. Estas son mantenidas a -20 °C y, una vez descongeladas, son descartadas.

El ensayo se realizó a unas concentraciones finales de 40 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 30 µM de NADP<sup>+</sup>, 150 µM de NADPH, 25 µM de DTNB, 1 µM de TS<sub>2</sub> y 7 nM de TryR

HF. La reacción se inició con una solución de TS<sub>2</sub>/NADPH, con la que se alcanzó un volumen final en el pocillo de reacción de 250 µL. Los datos de actividad se recolectaron cada 30 s a 412 nm empleando un espectrofotómetro VersaMAX de Molecular Devices (Sunnyvale, California, EEUU). Las pendientes de las curvas de reacción se calcularon empleando la aplicación de hojas de cálculo Excel 2010-2016 de Microsoft Corporation (Redmond, Washington, EEUU).

El ensayo general se realizó por triplicado empleando el péptido o molécula a evaluar a una concentración final de 25 µM. Como control positivo se empleó mepacrina.

Los demás ensayos de actividad de la TryR son variaciones de ensayo general y sus particularidades se describen en los apartados siguientes.

### 3.3.2 Ensayo para calcular CI<sub>50</sub>

Las moléculas que mostraron actividad inhibitoria en un primer cribado a una única concentración de 25 µM se sometieron a un segundo ensayo con el fin de hallar su concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>). La reacción fue similar a la ya descrita, con la única diferencia de en este caso se utilizaron diversas concentraciones de inhibidor (75, 25, 8.3, 2.7, 0.9, 0.31, y 0.10 µM). Como control positivo se empleó mepacrina, cuya CI<sub>50</sub> para este ensayo es de 12 µM.

Debido a la naturaleza de nuestros datos, en los cuales se puede llegar a obtener un 100% de inhibición (0% de actividad), el cálculo de CI<sub>50</sub> se realizó empleando un modelo absoluto en lugar de uno relativo (4-parametros) (246). Sin embargo, la ecuación empleada para el cálculo absoluto, descrito por la **Ecuación 1.14**, no se encontraba disponible en el GraFit 6.0 por lo que fue necesario introducir la ecuación tal y como se describe en la **Tabla 3.4**.

|  |             |
|--|-------------|
| $y = 100 / (1 + \exp(s * \ln(\text{abs}(x/I))))$ |             |
| Variables  | Parámetros  |
| <b>x</b>   | <b>I, s</b> |

**Tabla 3.4** | Definición en GraFit de la ecuación 1.3 empleada para hallar la CI<sub>50</sub>.

Debido a que se evaluaron concentraciones en un intervalo comprendido entre 75  $\mu\text{M}$  y 100 nM, aquellas moléculas que no mostraron capacidad inhibitoria en el ensayo se reportan con una  $\text{CI}_{50} > 75\mu\text{M}$ .

### 3.3.3 Ensayo para calcular $K_M$ y $V_{MAX}$ .

Para calcular la  $K_M$  se utilizaron diferentes concentraciones de  $\text{TS}_2$  en un intervalo comprendido entre 0.1x y 10x el valor esperado de  $K_M$ . Debido a las altas concentraciones de sustrato empleado, la cantidad de TryR se redujo en un orden de magnitud respecto del ensayo general ya descrito, empleándose 0.7 nM de enzima en lugar de 7 nM. El intervalo de concentraciones de  $\text{TS}_2$  empleadas en la reacción osciló entre 100  $\mu\text{M}$  y 1.56  $\mu\text{M}$ . El resto de reactivos de la reacción se emplearon a la misma concentración descrita en el ensayo general. Para el cálculo de la  $K_M$  y la  $V_{MAX}$  según los modelos de inhibición clásica se emplearon las definiciones ya incluidas en GraFit para este propósito.

### 3.3.4 Ensayo para calcular $K_I$ en la inhibición clásica.

Es importante tener en cuenta que en el ensayo de  $K_I$  se utilizan diferentes concentraciones del sustrato ( $\text{TS}_2$ ) (desde 0.1x hasta 10x el valor de  $K_M$ ) y diferentes concentraciones de péptido (desde 0.1x hasta 10x el valor sospechado de  $K_I$ ). Debido a las altas concentraciones de sustrato empleadas, la cantidad de la TryR se redujo en un orden de magnitud, empleándose 0.7 nM de enzima en lugar de 7 nM. Los intervalos de concentraciones de  $\text{TS}_2$  y de péptido empleadas en la reacción oscilaron entre 1.56  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$  respectivamente. El resto de los reactivos de la reacción se mantuvo a las mismas concentraciones que las descritas para el ensayo general.

Para calcular la  $K_I$  en la inhibición clásica se emplearon las definiciones ya incluidas en GraFit para este propósito.

### 3.3.5 Ensayo para calcular $K_{obs}$ y demás parámetros en la inhibición tiempo dependiente.

Para la obtención de la  $K_{obs}$  y demás parámetros característicos de la inhibición tiempo dependiente, los experimentos de actividad se realizaron utilizando 2 nM de TryR HF y

diferentes concentraciones de inhibidor comprendidas entre 16.6  $\mu\text{M}$  y 68 nM para cada una de las diferentes concentraciones fijas de sustrato ensayadas (entre 3  $\mu\text{M}$  y 375 nM).

El seguimiento de la actividad se realizó midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción en un lector de placas EnSpire de Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, EEUU) a 412 nm. Dada la gran relevancia de obtener una medida muy precisa de los valores de absorbancia en función del tiempo de reacción, se hizo uso del sistema de dispensación automática del equipo, lo que nos permitió realizar lecturas de manera inmediata tras el inicio, recolectándose para cada pocillo 999 lecturas. Los análisis de regresión no lineal fueron realizados utilizando el GraFit 6.0. Las expresiones de las ecuaciones utilizadas para los análisis, al no encontrarse incluidas en el paquete, fueron introducidas manualmente.

|   |  |            |
|---|--|------------|
| $\text{abs} = v_s * t + (V_i - V_s) / K_{obs} * (1 - e^{(-k_{obs} * t)})$ |  |            |
| Variables   | Parámetros   | Constantes |
| <b>t</b>  | <b>V<sub>i</sub>, V<sub>s</sub>, K<sub>obs</sub></b> | <b>e</b>   |

**Tabla 3.5** | Definición en GraFit de la **Ecuación 1.10** empleada para hallar la **K<sub>obs</sub>**.

|  |  |
|--|--|
| $k_{obs} = (K_5 * I / (k_{iapp} + I))$ |  |
| Variables                              | Parámetros                             |
| <b>I</b>                               | <b>K<sub>5</sub>, k<sub>iapp</sub></b> |

**Tabla 3.6** | Definición en GraFit de la **Ecuación 1.14** empleada para hallar la **K<sub>I<sup>APP</sup></sub>** a partir de la **K<sub>obs</sub>**.

|  |                         |                      |
|--|-------------------------|----------------------|
| $K_{iapp} = (S + K_m) / ((K_m / K_i) + (S / (a * K_i)))$ |                         |                      |
| Variables  | Parámetros              | Constantes           |
| <b>S</b>   | <b>K<sub>i</sub>, a</b> | <b>K<sub>m</sub></b> |

**Tabla 3.7** | Definición en GraFit de la **Ecuación 1.19** empleada para hallar la **K<sub>I</sub>** a partir de la **K<sub>I<sup>APP</sup></sub>** para un inhibidor no competitivo.

### 3.3.6 Inhibición de TryR en Lisados de Parásitos

La actividad de la TryR en lisados se evaluó de acuerdo al procedimiento descrito por *Van den Bogaart (247)*. Para la preparación de los lisados, los parásitos fueron centrifugados y lavados 2 veces con PBS para finalmente ser resuspendidos a razón de 200  $\mu$ l de tampón de lisis (HEPES 40 mM, Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y Triton X-100 al 2 %) por cada  $12 \times 10^6$  parásitos. La lisis se realizó durante 15 minutos a 26 °C. Tras la lisis, la reacción fue iniciada con una solución que contiene NADPH ( $C_f = 200 \mu\text{M}$ ), DTNB ( $C_f = 25 \mu\text{M}$ ), y  $\text{TS}_2$  ( $C_f = 75 \mu\text{M}$ ), en un volumen final de reacción es de 200  $\mu\text{L}$ . Los datos de actividad se recolectaron cada 30 s a 412 nm empleando un espectrofotómetro VersaMAX de Molecular Devices (Sunnyvale, California, EEUU). Las pendientes de las curvas de reacción se calcularon empleando la aplicación de hojas de cálculo Excel 2010-2016 de Microsoft Corporation (Redmond, Washington, EEUU).

### 3.4 Ensayo de Dimerización de Tripanotión Reductasa

El ensayo de dimerización consta de dos partes claramente diferenciadas: i) sensibilización de las placas con un anticuerpo de captura y ii) ensayo ELISA tipo *sandwich*.

#### 3.4.1 Preparación de las Placas

Las placas de poliestireno se sensibilizaron dispensando en cada pocillo 60  $\mu$ l de una solución de PBS (KCL 2.6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM, NaCl 137 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8 mM) con el anticuerpo anti-FLAG a una concentración final de 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Posteriormente la placa se incubó durante dos horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras la incubación, el anticuerpo fue recuperado para antigenar mas placas (máximo 5 placas en el mismo día) y la placa se lavó 5 veces con 200  $\mu$ l de TTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Después de los lavados las placas se bloquearon durante 16 horas con BSA al 5 % preparado en PBS. Posteriormente, las placas se lavaron con TTBS de la manera ya descrita. Tras el lavado las placas se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización, momento en el cual fueron descongeladas 15 minutos antes de su uso. Estas placas pueden ser almacenadas hasta 3 semanas. Los reactivos específicos empleados en la elaboración se encuentran en la **Tabla 3.8**.



| Reactivo                      | Fabricante               | Referencia |
|-------------------------------|--------------------------|------------|
| Placa Poliestireno (Maxisorp) | Thermo Fisher Scientific | F96-442404 |
| BSA                           | Sigma Aldrich            | A7030      |
| Anticuerpo Anti-FLAG          | Sigma Aldrich            | M2, F3165  |

**Tabla 3.8** | Reactivos específicos empleados en la preparación de las placas para el ensayo de dimerización.

### 3.4.2 Ensayo de Dimerización

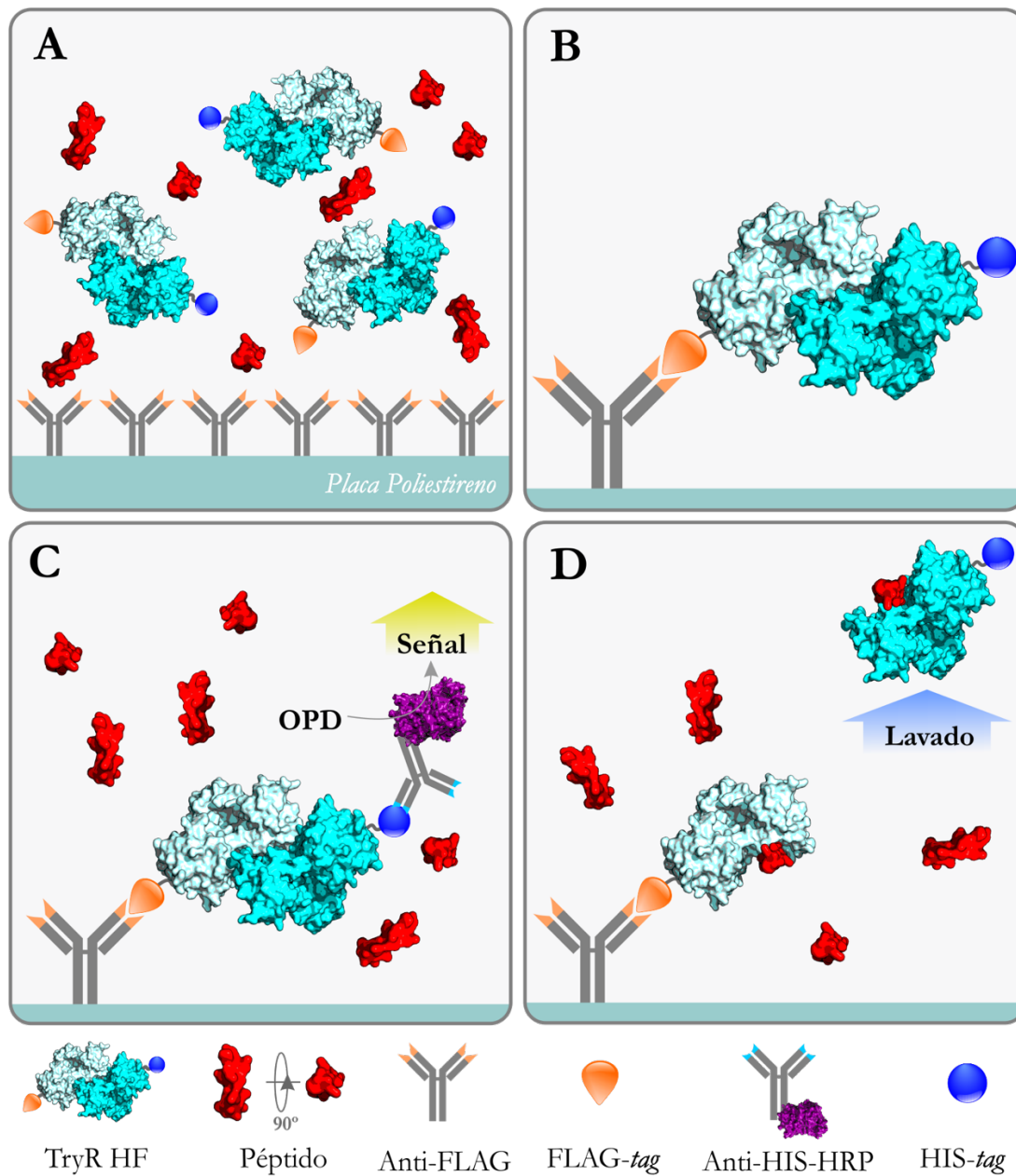
En un volumen final de 200  $\mu$ L se dispensaron 400 nM de TryR HF en tampón de dimerización (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM) junto a diferentes concentraciones (75, 37.5, 18.75 y 9.75  $\mu$ M) del péptido o molécula a evaluar. La placa se incubó con agitación constante en cámara húmeda durante 16 h a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó con TTBS (10 x 200  $\mu$ L) y se añadió el anticuerpo  $\alpha$ -HIS-HRP en TTBS con leche desnatada al 5% incubándose durante 1 h a 26 °C. Tras la incubación, la placa se lavó de nuevo como se describió anteriormente y se añadió el sustrato cromóforo OPD (100  $\mu$ L) incubándose a temperatura ambiente durante 10 min protegida de la luz. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100  $\mu$ L, 0.5 M). La lectura se realizó en un espectrofotómetro de placa VersaMAX a 490 nm.

| Reactivo          | Fabricante    | Referencia |
|-------------------|---------------|------------|
| $\alpha$ -HIS-HRP | Abcam         | ab49789    |
| OPD               | Sigma Aldrich | P4187      |

**Tabla 3.9** | Reactivos específicos empleados en el ensayo de dimerización.

Los cálculos de CI<sub>50</sub> se realizaron según la metodología descrita en el apartado 3.4.2. Debido a que el intervalo de concentraciones evaluadas osciló entre 75  $\mu$ M y 9.375  $\mu$ M, aquellas moléculas que no causaron disrupción del dímero se reportan con una CI<sub>50</sub> de dimerización > 75 $\mu$ M.

El resumen del ensayo de dimerización se esquematiza en la **Figura 3.1**. y los reactivos específicos empleados en la **Tabla 3.9**.



**Figura 3.1 | Ensayo de dimerización.** **A.** En una placa sensibilizada con  $\alpha$ -FLAG se deposita TryR HF junto con el péptido a estudiar, **B.** La TryR HF se une a la placa por medio del epítipo FLAG, **C.** El heterodímero TryR HF que se mantiene pegado a la placa se detecta gracias al epítipo HIS por medio de un  $\alpha$ -HIS conjugado con HRP y una reacción colorimétrica, **D.** En caso de que la molécula objeto de estudio desestabilice el dímero, las subunidades de TryR se separan y aquella con el epítipo HIS, al no poder unirse a la placa, se pierde durante los lavados. Esta subunidad ya no puede ser detectada por el  $\alpha$ -HIS conjugado con HRP, lo que causa una disminución de la señal colorimétrica.

### 3.5 Ensayo de Actividad de la Glutación Reductasa

La actividad de la glutatión reductasa por oxidación de NADPH se realizó empleando placas de poliestireno transparentes al ultravioleta de Corning Inc. (Corning, Nueva York, EEUU).

El ensayo se realizó en un volumen final de 100  $\mu$ l de mezcla de reacción (fosfato potásico 50 mM pH 6.9, NADPH 200  $\mu$ M, NADP<sup>+</sup> 100  $\mu$ M, GSSG 1 mM, KCL 200 mM, EDTA 1 mM y hGluR 3.5 nM). El seguimiento de la actividad se realizó utilizando el lector de placas EnSpire de Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, EEUU) a 340 nm con un intervalo de 20 segundos durante 999 lecturas.

## **3.6 Estudios en Parásitos**

### **3.6.1 Microscopia Confocal**

Para los estudios de internalización de los péptidos fluorescentes mediante microscopia confocal se realizaron infecciones de macrófagos humanos de cultivo primario con parásitos de *Leishmania major* (MHOM/IL/81/FEBNI) genéticamente modificados para expresar la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.* DsRED. Las imágenes de microscopia confocal se obtuvieron con el sistema LSM7 Live y el software de adquisición ZEN black de Carl Zeiss (Jena, Alemania). Para detectar la fluorescencia en rojo de la DsRED expresada por los amastigotes de *Leishmania* (558ex/583em) se utilizó el láser de 561 nm de 40 mW con un filtro de emisión en rojo (>590 nm). Para detectar la fluorescencia en verde se usó el láser de 405 nm de 50 mW con un filtro de emisión en verde (>508 nm).

### **3.6.2 Obtención de macrófagos de cultivo primario**

Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas de capas leucocitarias pasándolas a través de un medio de separación de leucocitos en gradiente LSM 1077 de PAA Laboratories (Traun, Austria). Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes sanos sin exposición conocida a parásitos de *Leishmania spp.* (DRK-Blutspendedienst Hessen GmbH, Alemania). Después de la separación, las células fueron lavadas y suspendidas en medio completo que consiste en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (previamente inactivado por calor), 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina y 10 mM de HEPES. Los monocitos fueron aislados aprovechando su habilidad para adherirse al plástico. Tras su asilamiento, estos fueron diferenciados a macrófagos añadiendo 10 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos, (M-CSF por sus siglas en inglés) de R&D Systems (Minneapolis, USA) durante un periodo de 5 a 7 días a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.6.3 Infección de macrófagos con parásitos de *Leishmania*.**

Los macrófagos se despegaron de las placas de cultivo haciendo uso de un rastrillo de células para posteriormente ser centrifugados (200 RCF, 8 min), lavados con medio y contados para dejarlos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por mililitro de medio. Tras el conteo, se dispusieron 300  $\mu$ l de células en micro-portaobjetos (*chamber slide*) de 8 pocillos de IBIDI (Planegg, Alemania) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para permitir su adherencia a la placa. Los amastigotes axénicos de *L. major* fueron centrifugados (2400 RCF, 10 min) y lavados con medio completo para posteriormente ser contados y diluidos a una concentración de  $1 \times 10^7$  parásitos por mililitro. Una vez los macrófagos se adhirieron al portaobjetos, el sobrenadante fue retirado y se agregaron 300  $\mu$ l de amastigotes, dejándose incubar durante 3 horas a 37°C. Tras la incubación, los micro-portaobjetos fueron lavados con tampón de lavado (PBS con 5% de medio completo) y se agregaron 300  $\mu$ l de medio completo, incubándose a 37 °C por 18 horas hasta su análisis.

### **3.6.4 Internalización de los Péptidos Fluorescentes**

Para estudiar si los compuestos marcados con fluoresceína eran capaces de atravesar las diversas membranas que separan el citoplasma de los amastigotes de *Leishmania major* del medio de cultivo, se realizó una infección de macrófagos con amastigotes DsRED durante dos horas. A continuación, los parásitos se lavaron y, al igual que se ha mencionado anteriormente, se pusieron en contacto con el péptido durante 16 horas.

### **3.7 Ensayo de Precipitación de TryR**

Para realizar el ensayo de precipitación de la TryR se emplearon 400 nM de TryR HF y 75  $\mu$ M de péptido inhibitorio en tampón de dimerización (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM) en un volumen final de 500  $\mu$ l. Los tubos fueron incubados en agitación constante en cámara húmeda a 250 RPM a 26 °C durante 16 horas. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 20 000 RCF por 30 minutos tras lo que se recuperaron 400  $\mu$ L de sobrenadante. Este sobrenadante se empleó tanto para realizar ensayos de actividad diluyendo la enzima hasta alcanzar una concentración de 7 nM como para realizar inmunoblots. En el caso de estos últimos, se procedió a mezclar el sobrenadante con tampón

de *Laemmli* 4x en una proporción 1:1, sembrando 25 µl en el gel de SDS-PAGE. La transferencia se realizó empleando el sistema semi-seco Trans-Blot® Turbo™ de BioRad Laboratories (Hercules, California, EEUU) sobre membranas de PVDF también de Bio-Rad. El anticuerpo monoclonal Anti-6X His tag® conjugado con HRP de Abcam (Cambridge, UK) empleado para la detección (**Tabla 3.9**) fue preparado en un tampón TTBS con leche descremada al 5 % en una dilución 1:200 000 y detectado mediante quimioluminiscencia empleando el sustrato Clarity® ECL y el sistema de foto documentación Chemi-Doc, ambos de Bio-Rad Laboratories.

## RESULTADOS

---

## 4.1 Análisis Filogenético de la Tripanotión Reductasa.

Con el fin de estimar las relaciones entre las diversas Tripanotión Reductasas y su hipotético ancestro común, se estableció una relación de homología entre diferentes secuencias de tripanotión reductasa y glutatión reductasa realizando un análisis filogenético de la enzima. Este análisis consta de un alineamiento múltiple y una reconstrucción filogenética posterior.

### 4.1.1 Análisis de secuencia

A partir de diferentes bases de datos se obtuvieron las secuencias correspondientes a la glutatión y tripanotión reductasas de 40 organismos pertenecientes a diversos dominios taxonómicos (Archaea, Bacteria y Eucaria).

En la siguiente tabla se agrupan los organismos y las proteínas usadas en el análisis. GI hace referencia al número único identificador de la secuencia, DB a la base de datos de donde fue recopilada y AN al número de acceso. Las bases de datos usadas fueron: GB (*Genebank*), RefSeq (*Reference sequences*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), DBJ (*Data bank Japan*) y PDB (*Protein data bank*). (**Tabla 4.1**)

| ORGANISMO                        | PROTEÍNA              | GI        | DB   | AN             |
|----------------------------------|-----------------------|-----------|------|----------------|
| <i>Acanthamoeba castellanii</i>  | Glutatión Reductasa   | 440795095 | gb   | ELR16233.1     |
| <i>Acanthamoeba castellanii</i>  | Glutatión Reductasa   | 440795095 | gb   | ELR16233.1     |
| <i>Angomonas deanei</i>          | Tripanotión reductasa | 528267762 | gb   | EPY40572.1     |
| <i>Anopheles gambiae</i>         | Glutatión Reductasa   | 347964059 | ref  | XP_003437030.1 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>      | Glutatión Reductasa   | 332645741 | gb   | AEE79262.1     |
| <i>Aspergillus nomius</i>        | Glutatión Reductasa   | 910296230 | gb   | KNG87816.1     |
| <i>Blastocystis sp</i>           | Glutatión Reductasa   | 902862373 | gb   | KNB44319.1     |
| <i>Bordetella pertussis</i>      | Glutatión Reductasa   | 937406057 | gb   | ALH77089.1     |
| <i>Bos taurus</i>                | Glutatión Reductasa   | 166795315 | ref  | NP_001107662.1 |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i> | Glutatión Reductasa   | 53717938  | ref  | YP_106924.1    |
| <i>Caenorhabditis elegans</i>    | Glutatión Reductasa   | 29603360  | embl | CAD88214.1     |
| <i>Callithrix jacchus</i>        | Glutatión Reductasa   | 124302264 | gb   | ABN05297.1     |
| <i>Candida glabrata</i>          | Glutatión Reductasa   | 961819087 | gb   | KTB21011.1     |
| <i>Canis lupus</i>               | Glutatión Reductasa   | 73979351  | ref  | XP_532813.2    |
| <i>Coccidioides immitis</i>      | Glutatión Reductasa   | 875634607 | gb   | KMU82328.1     |

|                                   |                          |           |      |                |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------|------|----------------|
| <i>Crithidia fasciculata</i>      | Tripanotión reductasa    | 6996      | embl | CAA78264.1     |
| <i>Danio rerio</i>                | Glutati3n Reductasa      | 66472640  | ref  | NP_001018390.1 |
| <i>Dictyostelium fasciculatum</i> | Glutati3n Reductasa      | 470251446 | ref  | XP_004358820.1 |
| <i>Drosophila melanogaster</i>    | Glutati3n Reductasa      | 1857433   | gb   | AAB48441.1     |
| <i>Escherichia coli</i>           | Glutati3n Reductasa      | 944400549 | gb   | ALL88415.1     |
| <i>Felis catus</i>                | Glutati3n Reductasa      | 755714545 | ref  | XP_011279768.1 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>         | Glutati3n Reductasa      | 324039608 | dbj  | BAJ78609.1     |
| <i>Homo sapiens</i>               | Glutati3n Reductasa      | 195927594 | pdb  | 3DK9           |
| <i>Leishmania amazonensis</i>     | Tripanotión Reductasa    | 148283954 | gb   | ABQ57410.1     |
| <i>Leishmania donovani</i>        | Tripanotión Reductasa    | 312821    | embl | CAA80668.1     |
| <i>Leishmania guyanensis</i>      | Tripanotión Reductasa    | 316891359 | gb   | ADU57091.1     |
| <i>Leishmania infantum</i>        | Tripanotión Reductasa    | 146076772 | ref  | XP_001462998.1 |
| <i>Leishmania panamensis</i>      | Tripanotión reductasa    | 685201219 | gb   | AIN95475.1     |
| <i>Listeria monocytogenes</i>     | Glutati3n Reductasa      | 930709645 | gb   | KPJ26819.1     |
| <i>Methanohalophilus mabii</i>    | Glutati3n Reductasa      | 502801898 | ref  | WP_013036874.1 |
| <i>Methanosarcina sp.</i>         | Glutati3n Reductasa      | 940661763 | gb   | ALK04597.1     |
| <i>Mus musculus</i>               | Glutati3n Reductasa      | 13624751  | embl | CAA53959.3     |
| <i>Naegleria gruberi</i>          | Put. Glutati3n Reductasa | 284094393 | gb   | EFC48027.1     |
| <i>Neospora caninum</i>           | Put. Glutati3n Reductasa | 325120156 | embl | CBZ55710.1     |
| <i>Neurospora crassa</i>          | Glutati3n Reductasa      | 758990308 | ref  | XP_011393526.1 |
| <i>Pan troglodytes</i>            | Glutati3n Reductasa      | 410354225 | gb   | JAA43716.1     |
| <i>Plasmodium falciparum</i>      | Glutati3n Reductasa      | 2599403   | gb   | AAB84117.1     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Glutati3n Reductasa      | 929392766 | gb   | KPE35173.1     |
| <i>Rattus norvegicus</i>          | Glutati3n Reductasa      | 309319801 | ref  | NP_446358.2    |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>  | Glutati3n Reductasa      | 2257525   | dbj  | BAA21419.1     |
| <i>Shigella sonnei</i>            | Glutati3n Reductasa      | 903605497 | embl | CTC71377.1     |
| <i>Streptococcus mutants</i>      | Glutati3n Reductasa      | 24377213  | gb   | AAN58554.1     |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Glutati3n Reductasa      | 935404559 | ref  | WP_054391382.1 |
| <i>Strigomonas culicis</i>        | Tripanotión reductasa    | 528219203 | gb   | EPY21381.1     |
| <i>Toxoplasma gondii</i>          | Glutati3n Reductasa      | 527308252 | gb   | EPT24891.1     |
| <i>Trypanosoma brucei</i>         | Tripanotión Reductasa    | 10545     | embl | CAA44870.1     |
| <i>Trypanosoma congolense</i>     | Tripanotión Reductasa    | 162311    | gb   | AAA30258.1     |
| <i>Trypanosoma cruzi</i>          | Tripanotión Reductasa    | 157879377 | pdb  | 1NDA           |
| <i>Xanthomonas arboricola</i>     | Glutati3n Reductasa      | 575393316 | dbj  | GAE59879.1     |
| <i>Xenopus laevis</i>             | Glutati3n Reductasa      | 350276184 | ref  | NP_001089322.2 |



|                        |                     |           |      |                |
|------------------------|---------------------|-----------|------|----------------|
| <i>Yersinia pestis</i> | Glutación Reductasa | 115349583 | embl | CAI.22557.1    |
| <i>Zea mays</i>        | Glutación Reductasa | 802083960 | ref  | NP_001292747.1 |

Tabla 4.1 | Organismos y proteínas empleadas en el análisis filogenético de la Tripanotión reductasa.

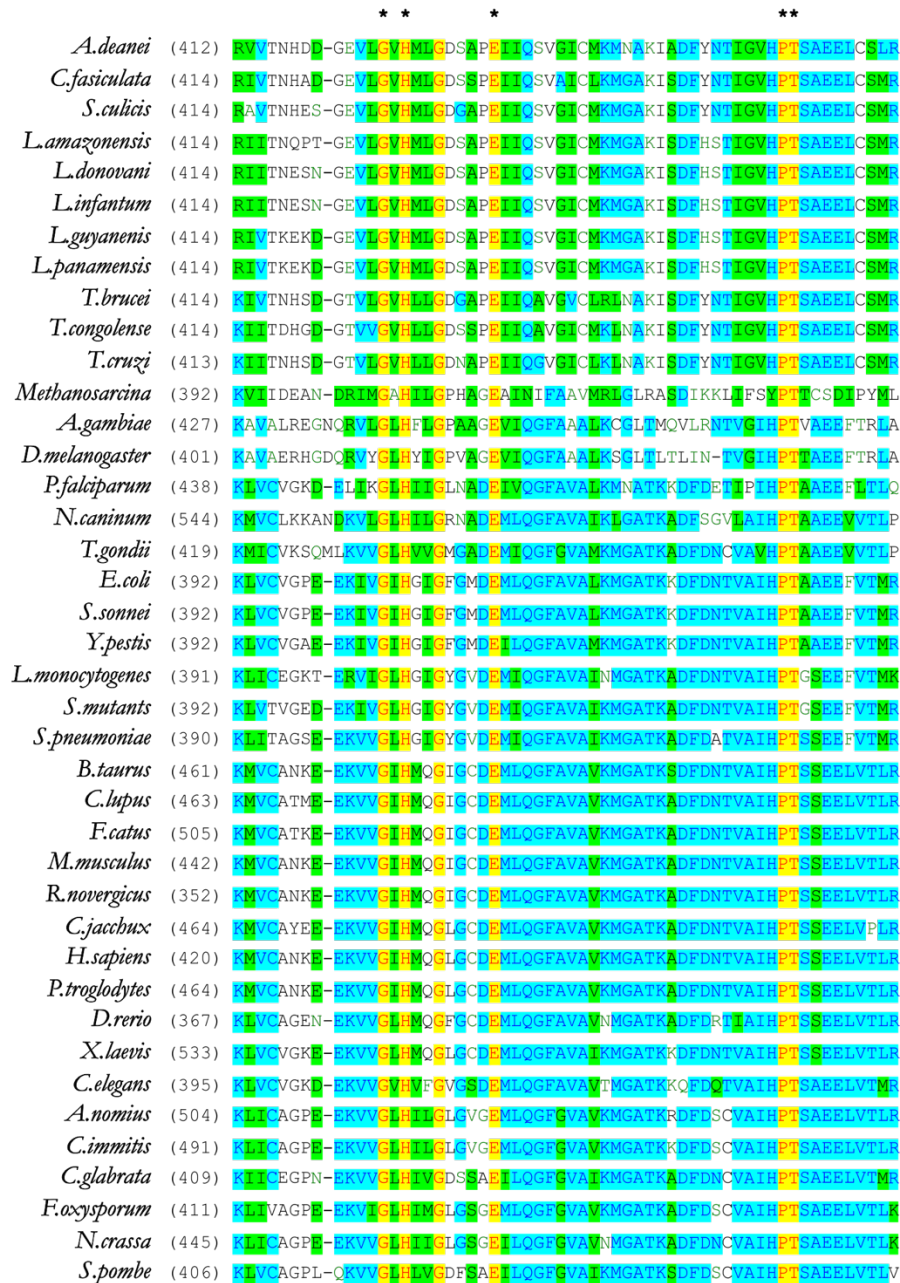


Figura 4.1 | Alineamiento local del dominio de dimerización. En paréntesis se muestra la posición dentro de la secuencia de acuerdo a cada organismo. Con asterisco se señalan los residuos conservados en todos los organismos analizados.

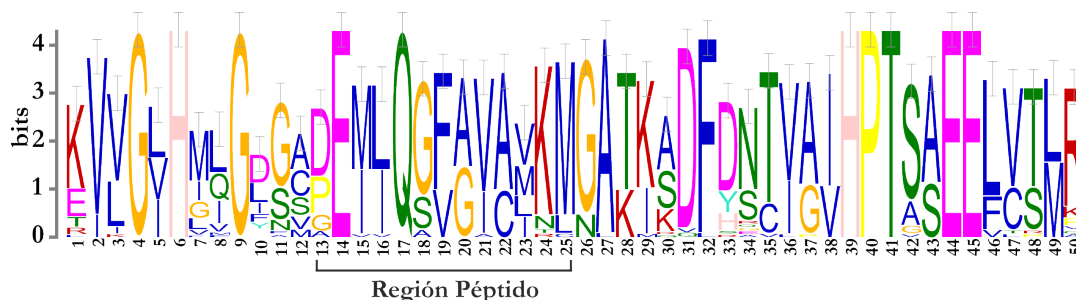
El alineamiento fue realizado empleando CLUSTAL W (248) con la matriz BLOSUM62 (249,250). Un alineamiento global (toda la proteína) muestra una identidad del 42.4% entre todas las secuencias analizadas. Como consenso general, una identidad mayor al 30% en una proteína de más de 100 aminoácidos es estadísticamente significativa en el establecimiento de una relación de homología entre diversas secuencias (251).

De esta manera se infiere una relación de homología entre las secuencias de TryR y GluR estudiadas. De la misma forma, un alineamiento local usando solo el dominio de dimerización muestra una identidad del 91.7 %, con una conservación (absoluta) de los aminoácidos G426, H248, E436, P462 y T463 (numeración basada en su posición en la secuencia de *L. infantum*).

#### 4.1.2 Análisis de dominios con MEME.

Utilizando la herramienta de análisis de dominios MEME (252), se realizó una búsqueda de los dominios que componen las proteínas estudiadas, encontrándose 5 dominios claramente diferenciados entre los que se encuentran los clásicos reportados para este tipo de óxido-reductasas: el dominio de unión al FAD, el dominio de unión al NADPH, el dominio central y el dominio de dimerización. Además, es posible identificar un quinto dominio de función no definida.

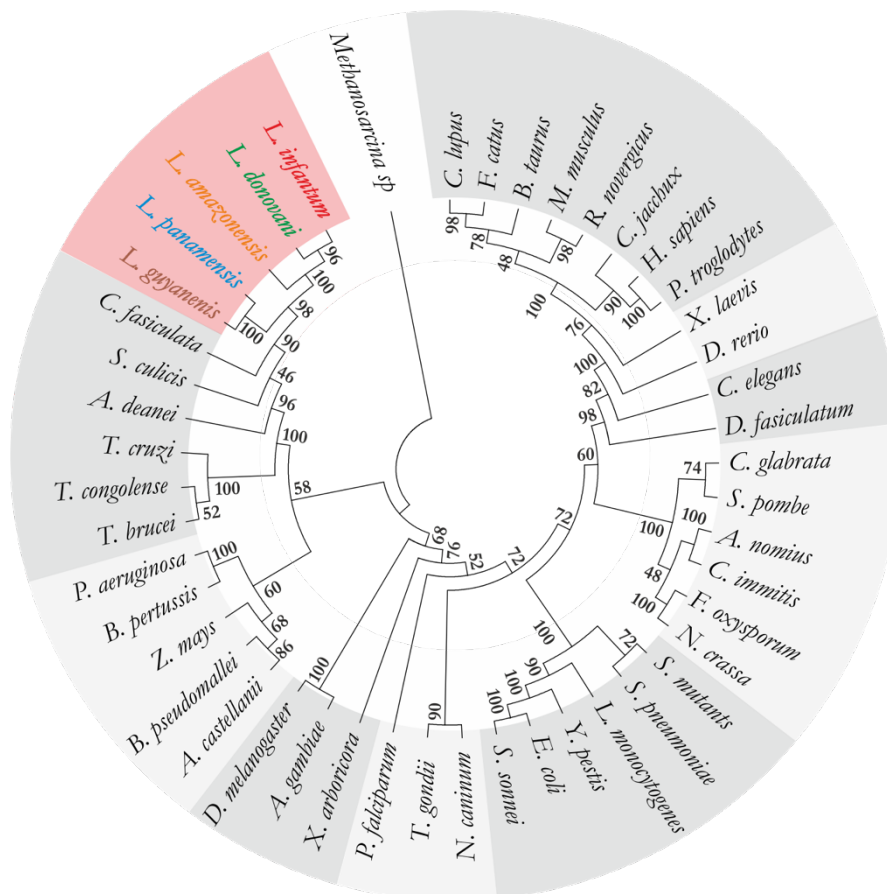
El dominio de dimerización identificado con un *E-value* de  $5.1e^{-1303}$  (un *E-value* < 0.05 se considera significativo para este tipo de análisis) es el dominio de interés en nuestro estudio ya que contiene la región de la hélice  $\alpha$  utilizada para el diseño de nuestros péptidos inhibitorios.



**Figura 4.2** | Representación gráfica de la secuencia consenso del dominio de dimerización obtenida mediante la búsqueda de motivos conservados en las diferentes oxidoreductasas estudiadas con el programa MEME. En el eje de las abscisas se señala la posición de cada aminoácido en el dominio. La región que se corresponde con la hélice  $\alpha$  de nuestros péptidos inhibitorios comprende los residuos 13 – 25. En el eje de ordenadas se representa la probabilidad de aparición de cada aminoácido. Un valor de 4 indica un 100% de probabilidad.

Este tipo de análisis es especialmente útil para identificar rápidamente aminoácidos altamente conservados en un dominio dado. Como se ve en la **Figura 4.2**, de los aminoácidos que forman parte de la región utilizada para diseñar nuestros péptidos, el ácido glutámico de la posición 14 (E2 en nuestro péptido y E436 de la proteína) se encuentra en un 100% de las secuencias analizadas y la glutamina 14 (Q5 en nuestro péptido y Q439 en la proteína) aparece en un 97.5 % de los organismos. Esto nos indica una fuerte presión evolutiva para la conservación de estos aminoácidos. También se identifica un motivo FAVA dentro de la región de interés en las posiciones 6-10 que no está presente en los tripanosomátidos, tal y como se muestra en el alineamiento local (**Figura 4.1**). Estas diferencias son particularmente interesantes un contexto futuro en el cual se pretenda el diseño de péptidos que puedan diferenciar entre diferentes oxidoreductasas.

### 4.1.3 Reconstrucción filogenética de la Tripanotión Reductasa



**Figura 4.3** | Árbol filogenético generado por máxima verosimilitud con un *bootstrapping* de 1000 iteraciones. Los números en cada uno de los clados indican el porcentaje de veces que ese clado se repitió tras el análisis de *bootstrap*, tomando como significativos aquellos superiores al 50% de las veces.

La reconstrucción filogenética hace referencia al establecimiento de una relación entre diferentes secuencias y su ancestro. Esta reconstrucción se compone de 4 procesos: recopilación de las secuencias, construcción de un alineamiento, construcción de un árbol y finalmente su prueba.

Los datos obtenidos a partir del alineamiento se emplearon para estimar con el programa MEGA 6.0 cuál de los 48 modelos de sustitución se ajustaba mejor a nuestros datos (239). De esta manera, el árbol fue construido por máxima verosimilitud y usando el modelo de sustitución de aminoácidos LG y el algoritmo de estimación de distancias JTT (253,254). Hay que tener en cuenta que el árbol generado no es una representación verdadera de las relaciones históricas entre los taxones estudiados sino una estimación de esta relación. Como ocurre con toda estimación, a continuación es necesario un análisis de consistencia que se realiza utilizando un *bootstrap* de 1000 iteraciones, teniendo en cuenta solo aquellas que se presentan más del 50% de las veces (255,256).

De esta manera se obtuvo el árbol aquí presentado (Figura 4.3), que es consistente con las estimaciones realizadas por otros autores para oxidoreductasas utilizando diferentes metodologías (257,258), con la novedad de que en nuestra estimación hemos introducido en el análisis un grupo más amplio de secuencias de tripanosomátidos parásitos de insectos (*Strigomonas culicis* y *Angomonas denaei*) que se encuentran disponibles desde 2013. También hemos incluido de la secuencia de una oxidoreductasa putativa de *Methanosarcina sp.* que fue aislada a partir de un estudio metagenómico y que está disponible desde 2015. Esta especie es de especial interés ya que pertenece al dominio taxonómico Archea por lo que fue usada como grupo externo para crear la raíz del árbol.

## **4.2 Producción y Caracterización de la Tripanotión Reductasa Recombinante de *Leishmania infantum*.**

### **4.2.1 Purificación de la TryR.**

La tripanotión reductasa recombinante de *L. infantum* se expresó en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta que mejora la expresión heteróloga de proteínas eucariotas que tengan codones raramente usados en *E.coli*. Esta cepa se transformó con el plásmido pRSET A TryR H que permite expresar nuestra proteína asociada a una “cola” de histidinas (*HIS tag*).

La purificación de la TryR se ejecuta mediante una cromatografía de afinidad (Ni-NTA) seguida por una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25) y finalizando con una cromatografía de intercambio iónico (amina cuaternaria). Estas cromatografías se realizan utilizando el sistema de FPLC Äkta Purifier. Las condiciones de expresión y de purificación mediante cromatografía de afinidad fueron puestas a punto por el Dr. David Moreno (91).

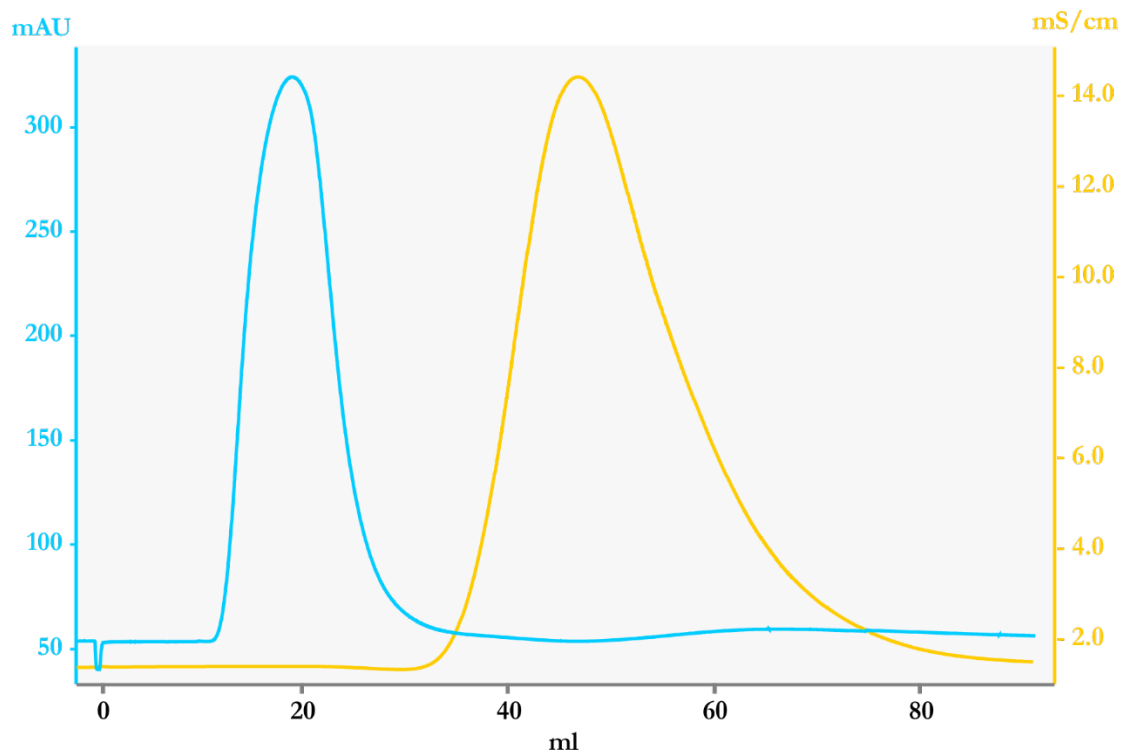
Aunque la proteína purificada según las condiciones inicialmente descritas era ya una proteína de alta calidad, ese protocolo todavía no era capaz de eliminar una pequeña proporción de proteínas contaminantes. Es por ello que añadimos dos pasos cromatográficos adicionales consistentes en una exclusión molecular y un intercambio iónico. Para la elección de la metodología a seguir hay que tener en cuenta el punto isoeléctrico de la TryR, que es de 5.9, lo cual permite una fácil purificación de la muestra a pH 7.5 usando una matriz de intercambio aniónico.

Debido a que la proteína purificada a partir de la cromatografía de afinidad se encuentra en un tampón que contiene 300 mM de NaCl, antes de efectuar la cromatografía de intercambio iónico es necesario realizar un paso previo en el que se disminuye la concentración de cloruro sódico de la muestra hasta 10 mM con el fin de permitir la unión de la TryR a la matriz de la columna. Esto se efectúa usando una cromatografía de exclusión molecular.

#### **4.2.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular.**

La desalinización se realiza mediante el uso de una columna con una matriz de Sephadex G-25 cuyo tamaño de exclusión es 5 kDa. De esta manera, nuestra proteína, con un peso molecular superior (100 kDa), pasará por la columna sin entrar en las esferas de Sephadex mientras que el Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> se ven retrasados.

En la **Figura 4.4** se observa que, tras la cromatografía de exclusión molecular, nuestra proteína (línea azul;  $A_{280}$ ) y el cloruro sódico (línea marrón; conductividad) eluyen en fracciones claramente diferenciadas. Este procedimiento, por el que reducimos 30 veces la concentración de NaCl, es mucho más rápido (horas *vs* días) que la aproximación clásica basada en diálisis.

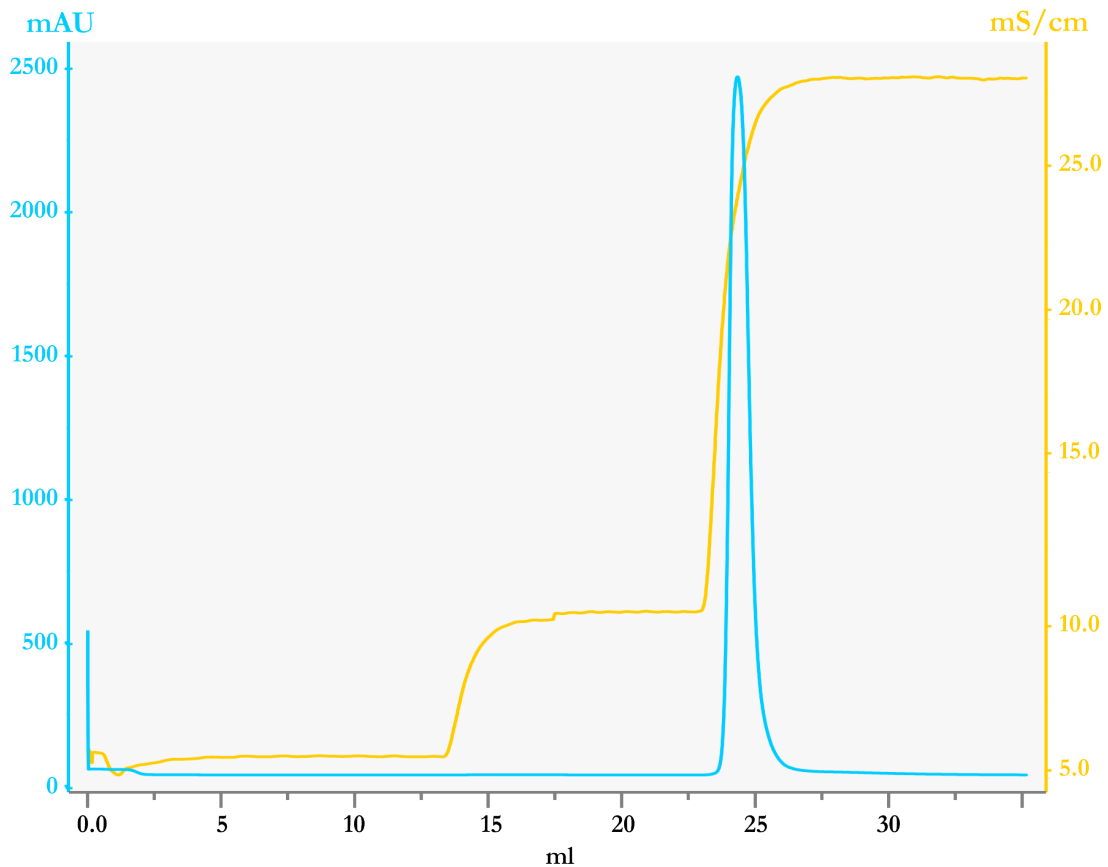


**Figura 4.4** | Desalinización de la muestra por cromatografía de exclusión molecular. La línea azul hace referencia a las miliunidades de absorbancia a 280 nm (mAU) (utilizada para hacer el seguimiento de la proteína) y la línea amarilla hace referencia a la conductividad de la muestra medida en milisiemens por cm (mS/cm). En el caso descrito, el aumento en la conductividad es debido a la elución del NaCl presente en la muestra inicial.

#### 4.2.1.2 *Cromatografía de Intercambio Aniónico.*

Tras la disminución de la concentración de NaCl de la muestra, esta se hace pasar por una columna de intercambio aniónico que contiene una matriz que cuenta con un grupo funcional compuesto por una amina cuaternaria ( $-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) que actúa como un fuerte intercambiador de aniones. De esta manera la TryR, que a pH 7.5 se encuentra cargada negativamente, se une a la matriz a una concentración de 10 mM de NaCl. Tras un lavado inicial con 10 volúmenes de tampón, la proteína se eluye aumentando la concentración de cloruro sódico en dos pasos discretos. En un primer paso la concentración de NaCl se eleva a 100 mM (lavado) y posteriormente la proteína es eluida al aumentar la concentración a 300

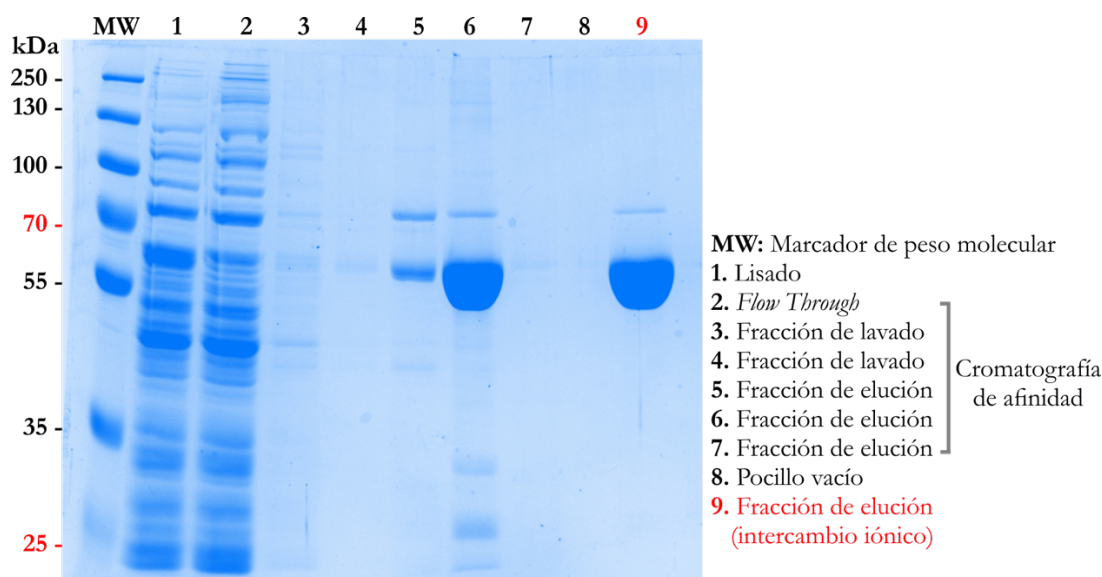
mM de NaCl. (Figura 4.5)



**Figura 4.5** | Cromatografía de intercambio aniónico. La línea azul hace referencia al seguimiento de la proteína y la línea marrón a la conductividad (proporcional a la concentración de NaCl).

En la **Figura 4.6** se muestra el resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida, teñida con azul de Coomassie de muestras de TryR tras la cromatografía de afinidad (líneas 2-7) y la cromatografía de intercambio iónico (línea 9).

Según el análisis densitométrico de las líneas 6 y 9, la cantidad relativa de nuestra proteína de interés paso de 84,7% tras la cromatografía de afinidad a un 97,6% tras la cromatografía de intercambio iónico, logrando eliminar las bandas inferiores a 50 kDa y, en parte, una banda de alto peso molecular (aprox. 71 kDa) que también se encuentra acompañando a nuestra proteína.



**Figura 4.6** | SDS-PAGE del proceso de purificación de TryR. Las mejoras en el proceso de purificación son notables al comparar las eluciones de la cromatografía de afinidad (línea 6) y de intercambio iónico (línea 9). En ambas líneas se usaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína.

#### 4.2.2 Producción de TryR para Cristalización.

Con el fin de realizar experimentos exploratorios de cristalización de la enzima para dilucidar su interacción con los péptidos inhibitorios, generamos también una TryR sin *tags*.

Los *tags* pueden ser secuencias peptídicas pequeñas (*HIS-tag*, *FLAG-tag*, *T7-tag*) o fragmentos de proteínas (MBP, GST) que facilitan la purificación, seguimiento y detección de las proteínas recombinantes. Las secuencias codificantes para estos *tags* se encuentran integradas en los vectores de expresión comerciales, con lo que los genes clonados, una vez traducidos, incorporaran estas secuencias de aminoácidos. Aunque no suelen interferir con el rol biológico de las proteínas sometidas a estudio e incluso en algunos casos pueden incrementar la solubilidad de la proteína de interés, en los estudios de biología estructural es preferible prescindir de los *tags* para evitar problemas en la formación de los cristales (259).

La TryR se encuentra clonada en el plásmido comercial pRSET A (pRSET A TryR H) y presenta en su extremo amino terminal un *tag* HIS que es usado para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad y para la detección de la misma usando anticuerpos  $\alpha$ -HIS.

Existen diferentes proteasas disponibles que pueden escindir los *tags*, como es el caso de la enteropeptidasa, la trombina y el factor *Xa*. Estas enzimas, sin embargo, según el sustrato pueden tener un comportamiento promiscuo. La proteasa TEV (del virus mosaico del



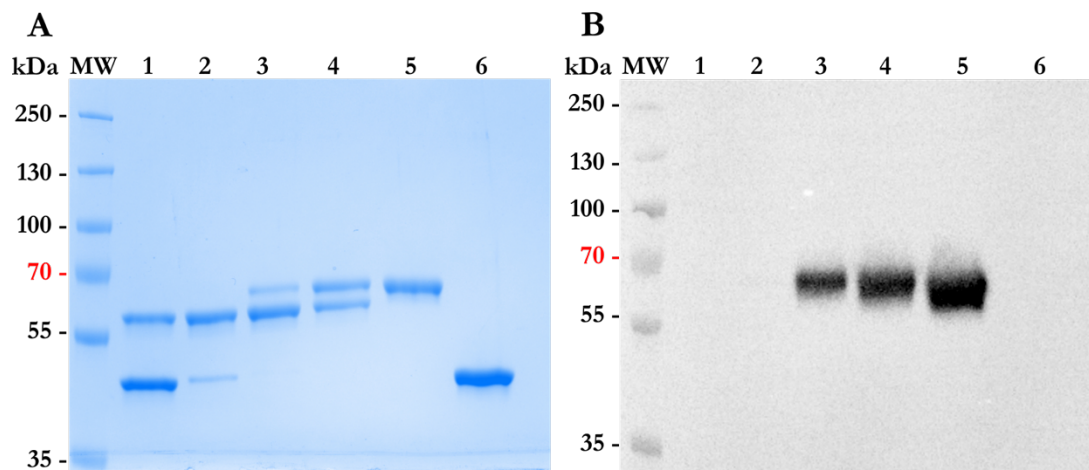
tabaco) y la proteasa del rinovirus 3c, son alternativas que no presentan el problema de especificidad antes mencionado y que además pueden funcionar a altas concentraciones de sal (1M de NaCl) y bajas temperaturas (4°C). Sin embargo, son difíciles de producir en el laboratorio de manera recombinante debido a su baja solubilidad (260). Este problema puede solucionarse mediante la fusión de estas proteínas a la Glutación S Transferasa (GST). Tras expresar ambas proteasas virales, decidimos utilizar la proteasa del rinovirus 3c fusionada a GST dado que nos permitía alcanzar una producción más alta de enzima.

Tras una ronda de clonación, la secuencia codificante para el reconocimiento y corte por parte de la proteasa del rinovirus 3c (LEVLFGQ ↓ P) se insertó en el plásmido pRSET A TryR H curso abajo de la secuencia codificante de HIS y justo antes del codón de inicio de la TryR.

#### 4.2.2.1 *Escisión del tag HIS de la TryR*

Debido a que todas las proteínas presentan diferentes configuraciones y no es posible predecir la accesibilidad de la secuencia de reconocimiento a la proteasa, las condiciones de digestión, en lo referente a la proporción sustrato/proteasa (Tripanotión reductasa /Proteasa del rinovirus 3c) deben de ser establecidas empíricamente.

En la **Figura 4.7** se muestran los resultados de la digestión de diferentes proporciones sustrato/proteasa. Inicialmente se partió de 1 µg de sustrato junto a 1 µg de proteasa (1:1), disminuyendo progresivamente las proporciones de proteasa por un factor de 10 hasta llegar hasta 1 µg de TryR y 1 ng de proteasa (1:1000). La TryR antes de la escisión del *tag* y con la secuencia de reconocimiento de corte tiene un peso molecular de 58 kDa, transformándose en una proteína de 53 kDa tras el corte. Por su parte, la proteasa fusionada a GST tiene un tamaño de 46 kDa. Como se observa en la **Figura 4.7 A**, en las proporciones 1:1 y 1:10 (líneas 1 y 2) toda la TryR ha perdido la cola de histidinas observándose solo la especie de 53 kDa (además de la proteasa a 46 kDa). Los resultados obtenidos tras el western blot utilizando anticuerpos α-HIS muestran la ausencia del HIS-*tag* en la proteína presente en las líneas 1 y 2, lo que demuestra que se ha alcanzado una digestión completa (**Figura 4.7 B**).

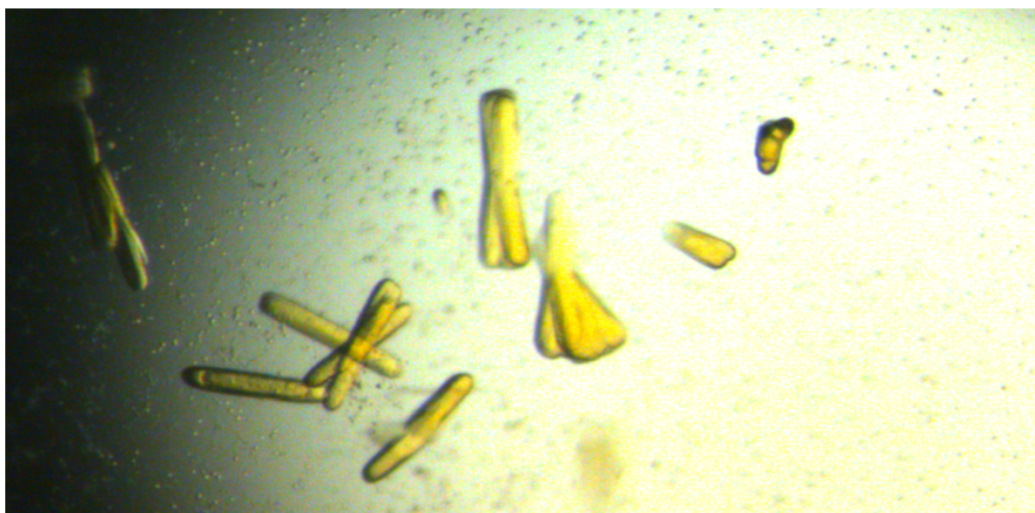


**Figura 4.7** | Digestión de la TryR con la Proteasa del Rhinovirus 3C. **A)** SDS-PAGE teñido con Coomassie, **B)** Western-Blot Anti-HIS. MW. Marcador de peso molecular. Relaciones (masa/masa) entre sustrato y proteasa: Línea 1= 1:1; Línea 2= 1:10; Línea 3= 1:100; Línea 4= 1:1000; Línea 5= sólo sustrato (1 $\mu$ g); Línea 6= sólo Proteasa (1 $\mu$ g).

Tras el corte de la enzima con la proteasa es necesario realizar una nueva cromatografía para eliminar tanto la proteasa como las colas de HIS escindidas. Para esto se realiza un proceso de cromatografía de afinidad mixto en el cual se usa una columna con glutatión (unión de la GST-proteasa) acoplada a otra con Ni-NTA (unión de la cola HIS escindida). El producto de la digestión se hace recircular en un sistema cerrado, de manera que la proteasa y los fragmentos que contienen las colas de HIS quedan retenidos en las columnas de glutatión y de Ni-NTA respectivamente, obteniéndose la TryR escindida pura y sin necesidad de un paso extra de elución. Este proceso adicional de cromatografía elimina por completo la banda de 71 kDa que todavía contaminaba nuestra muestra tras la cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose finalmente una proteína con un grado de pureza de >99%, según nuestros análisis de densitometría. Ensayos de actividad enzimática demostraron la misma actividad específica independientemente de la presencia o ausencia del *tag* HIS en la proteína.

#### 4.2.2.2 *Cristales de TryR*

Los ensayos de cristalización fueron realizados por el equipo del Prof. Juan Hermoso en el Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC). Tras realizar un muestreo masivo de condiciones de cristalización se obtuvieron cristales de buen tamaño y a los 7 días en presencia de 2M de sulfato de amonio, 0.1 M de Tris pH 8.5, y 5% de PEG 400 (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8** | Cristal de TryR sin HIS-tag obtenido tras 7 días en el tampón de cristalización.

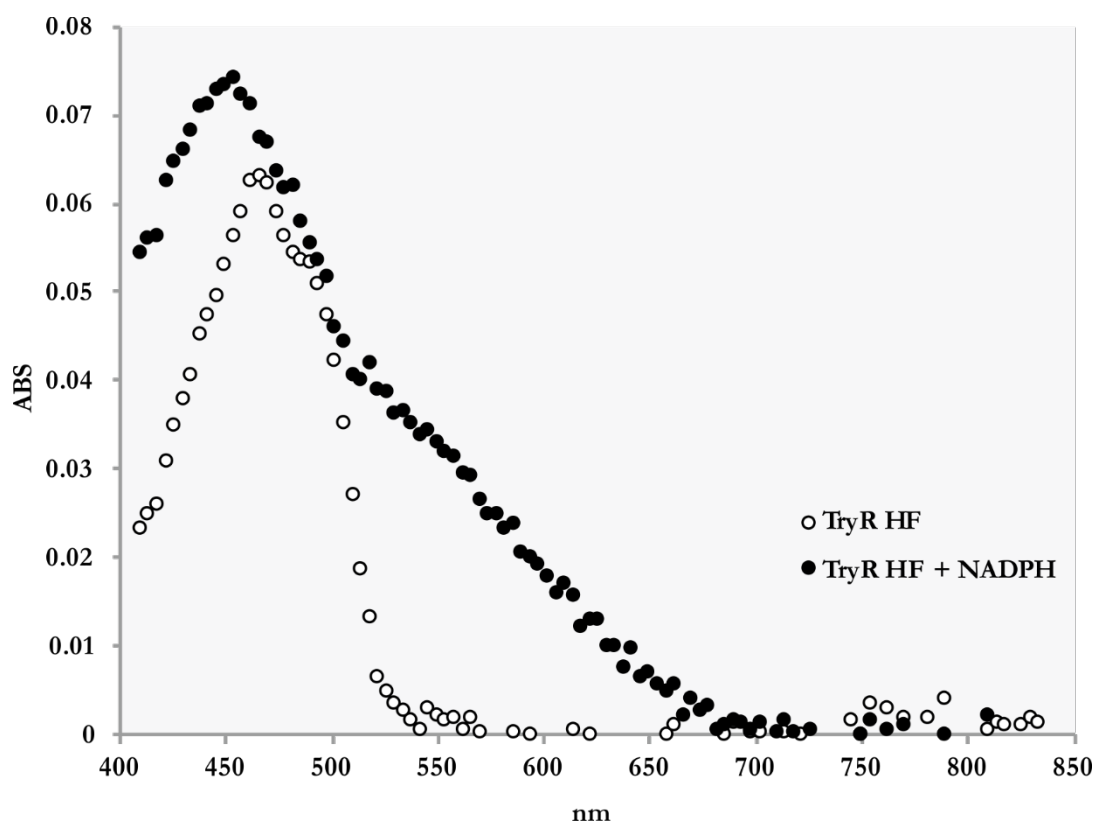
### 4.2.3 Caracterización de la TryR

#### 4.2.3.1 Estado de oxidación de la TryR

En el apartado de introducción se ha comentado que, durante su ciclo funcional, la TryR alterna entre los estados  $E_0$  y  $EH_2$ . Diferentes tripanotión reductasas, como la de *T. congolense*, *T. cruzi* y *C. fasciculata*, así como la glutatión reductasa humana, presentan un máximo de absorción entre 450 y 465 nm en la especie  $E_0$ , observándose un desplazamiento de la curva hacia el rojo en las especies  $EH_2$  con un nuevo máximo entre 530 y 550 nm (93). Además de las formas  $E_0$  y  $EH_2$ , existe una tercera forma denominada  $EH_4$ . En esta forma ambas cisteínas del sitio activo, al igual que la flavina, se encuentran reducidas (92). Con respecto a sus propiedades físicas, esta forma sufre una decoloración (a 450 nm) de casi un 80% comparada con la  $E_0$  (261), lo que explicaría el color amarillo pálido de los cristales obtenidos de esta forma (92). Cabe anotar que la forma  $EH_4$  no es un intermediario durante la catálisis y que aunque algunos autores sugieren que es una forma de la enzima que no está presente in vivo (261) otros plantean que podría tener un rol en el metabolismo del glutatión y el tripanotión (92,95).

Después de la purificación de la TryR HF hicimos un estudio de sus estados de oxidación para saber cuál era la especie mayoritaria en nuestra preparación. El desplazamiento hacia la derecha del espectro de absorción como consecuencia de la incubación de la enzima con un exceso de NADPH es indicativo una transición desde la forma  $E_0$  a la  $EH_2$  (Figura 4.9).

Este resultado, por tanto, demuestra la presencia mayoritaria de enzima en la forma  $E_0$  en nuestra TryR purificada.



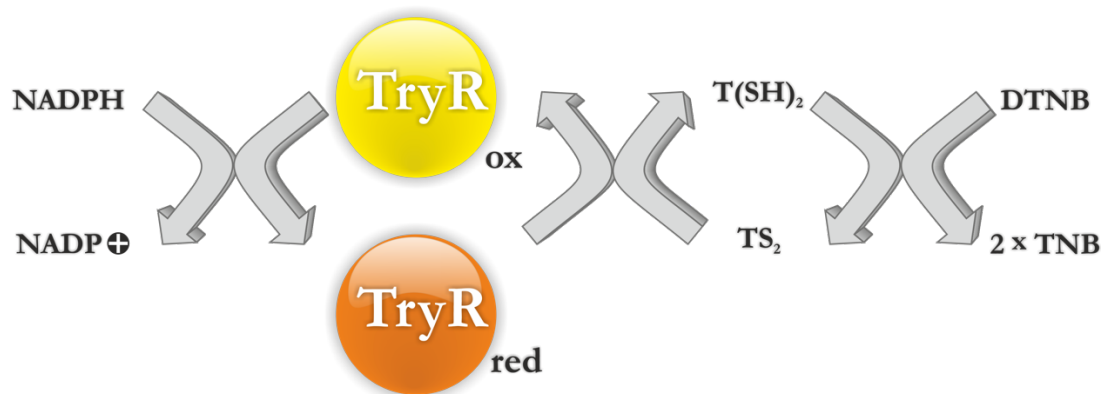
**Figura 4.9** | Reducción de la TryR purificada  $E_0$  (círculos blancos) y desplazamiento hacia el rojo cuando es tratada con un exceso molar NADPH para obtener la forma reducida  $EH_2$  (círculos negros).

El estado de oxidación de la enzima tiene gran importancia en el contexto de la cristalización debido a que la mayor parte de las estructuras de TryR presentes en el *Protein Data Bank* (PDB), se encuentran en estado  $E_0$ .

#### 4.2.3.2 Ensayo de actividad de la TryR

La mayoría de los protocolos utilizados para la determinación de la actividad de la tripanotión reductasa y para el establecimiento de los parámetros cinéticos de la enzima están basados en el seguimiento de la oxidación de NADPH a 340 nm. Esto se realiza tras añadir tripanotión oxidado ( $TS_2$ ) a una solución tamponada que contiene TryR y NADPH. Este experimento es análogo al realizado para el seguimiento de la actividad en la enzima homóloga en humanos, la glutatión reductasa (GluR).

*Hamilton* y colaboradores implementaron una metodología que acopla la producción de  $T(SH)_2$  por la enzima a la reducción del reactivo de *Ellman* o ácido Ditionitrobenzoico (DTNB, por sus siglas en inglés) regenerando así el tripanotión oxidado. Esta reducción del DTNB produce dos moléculas de ácido 2-nitro-5-metabercaptobenzoico o TNB (**Figura 4.10**). Así, por cada molécula de NADPH consumida se generan dos moléculas de TNB. Esta diferencia estequiométrica, junto a la diferencia que existe entre la absorptividad molar del NADPH ( $6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y el TNB ( $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), multiplican por cuatro la sensibilidad del ensayo. Ello permite usar concentraciones muy bajas de  $TS_2$  que, además, se mantienen constantes en el tiempo de la reacción (**245**). Esta metodología ha sido validada por diferentes investigadores permitiendo realizar el cribado de más de 130 000 compuestos y la identificación de varios cabezas de serie (**262**).

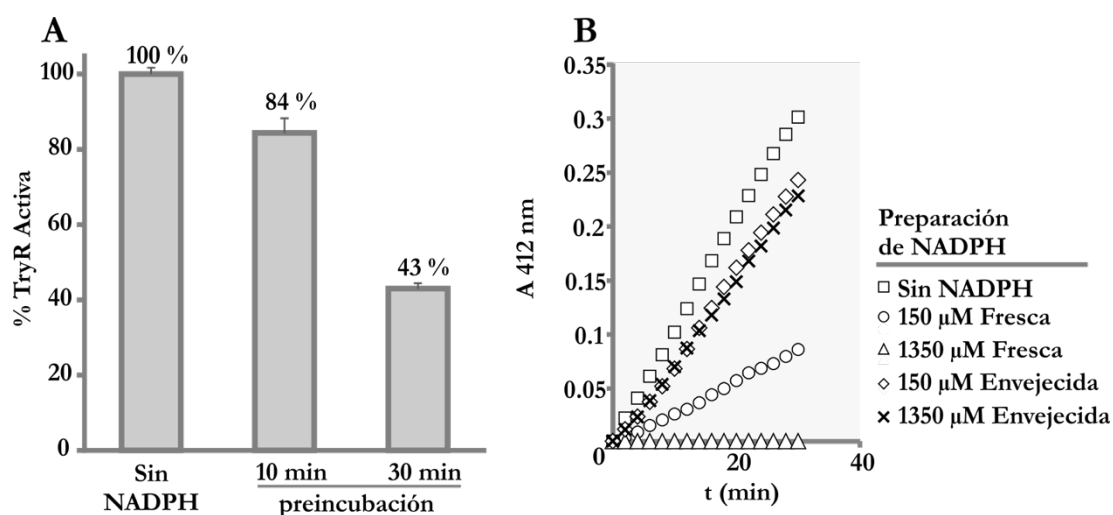


**Figura 4.10** | La TryR emplea el poder reductor del NADPH para reducir el  $TS_2$  a  $T(SH)_2$  y este es oxidado de nuevo por el DTNB, generándose TNB.

#### 4.2.3.3 El uso de $NADP^+$ en la reacción protege a la TryR.

Al implementar el ensayo de *Hamilton* nos topamos con el problema de que este era altamente variable o incluso, a veces, no funcionaba. Un problema común inherente a la determinación de la actividad catalítica de la TryR, e independiente de la estrategia usada para su seguimiento, es la inactivación de la enzima al ser preincubada con NADPH. Esto sucede tanto para TryR como para GluR (**263**). Aunque el mecanismo de inactivación no está del todo esclarecido, parece estar producido por una sobre-reducción de la enzima a su forma  $EH_4$  (**245**). En el caso de TryR, y usando el ensayo basado en el seguimiento de la oxidación de NADPH, se ha descrito que tras 1 hora de preincubación con  $150 \mu\text{M}$  de NADPH hay una inactivación del 40-60% de la enzima (**69,263**). Sin embargo, *Hamilton* reporta que gracias

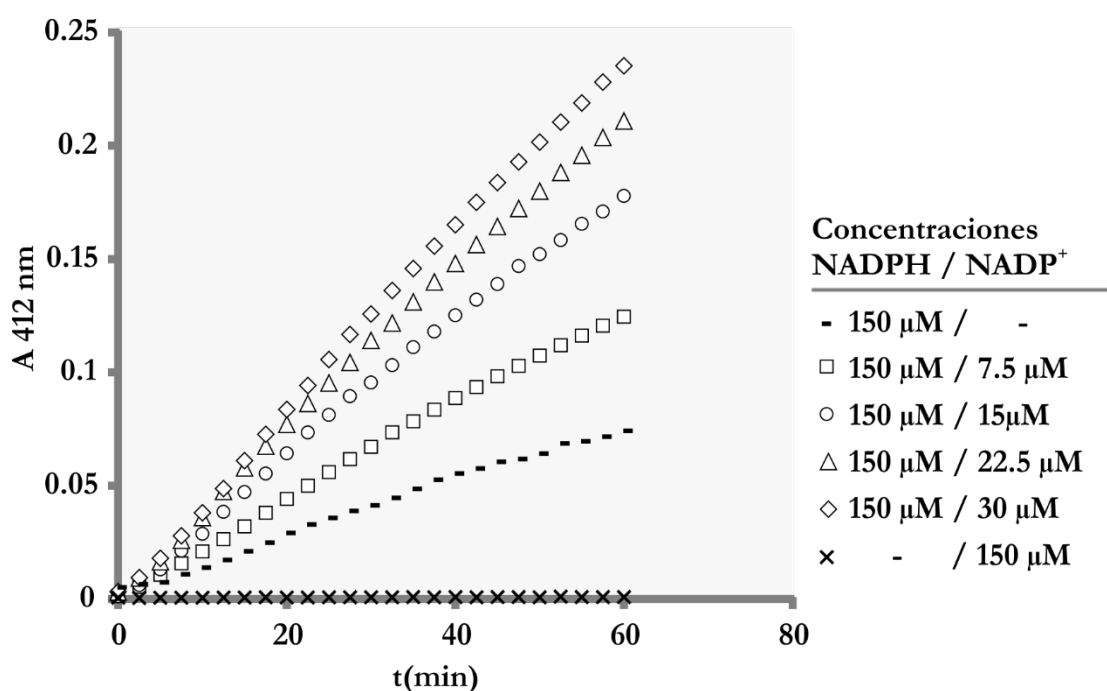
al DTNB presente en la solución la inactivación de la enzima tras 1 hora de preincubación es solo del 10-15% (245). Según nuestras observaciones (**Figura 4.11 A**), tras 10 minutos de preincubación con 150  $\mu\text{M}$  de NADPH y en presencia de DTNB la inactivación supera el 15%; a los 30 minutos la inactivación ronda el 60% y después de 1 hora la enzima se encuentra completamente inactivada.



**Figura 4.11** | Efecto del NADPH sobre TryR. **A)** Preincubación de 7 nM de TryR con NADPH (150  $\mu\text{M}$ ) en presencia de DTNB (25  $\mu\text{M}$ ). Tras 30 minutos de preincubación la actividad de la enzima se ve reducida a menos del 50%. **B)** Comparación de la actividad de TryR tras la preincubación durante 30 min con diferentes preparaciones de NADPH.

Además, también observamos una disminución del efecto inactivador del NADPH como consecuencia de la realización de varios ciclos de congelación/descongelación. Como se observa en la **Figura 4.11 B**, la inactivación causada por una alícuota de 150  $\mu\text{M}$  de NADPH que ha sufrido varios ciclos de congelación/descongelación (envejecida) con respecto a la causada por una recién preparada (fresca) disminuye. Además, un aumento de 9 veces en la concentración de NADPH (1350  $\mu\text{M}$ ) durante la preincubación con la alícuota fresca inactiva por completo la enzima, mientras que la misma alícuota envejecida no tiene efecto sobre la TryR. Como es obvio por la tendencia del NADPH a oxidarse, cabe esperar que la principal diferencia entre ambos tipos de alícuotas sea la presencia de  $\text{NADP}^+$ . Esto se pudo comprobar al observarse una disminución de la absorbancia de las soluciones a 340 nm. El  $\text{NADP}^+$  parece tener un efecto protector sobre la TryR, lo cual podría estar relacionado con la necesidad de mantener una determinada ratio entre NADPH/ $\text{NADP}^+$  que garantice un potencial reductor adecuado en el interior de la célula.

Con objeto de determinar las concentraciones adecuadas de  $\text{NADP}^+$  en nuestro ensayo, procedimos a preincubar durante 30 min la TryR en presencia de una concentración fija de  $150 \mu\text{M}$  de NADPH y concentraciones variables de  $\text{NADP}^+$ , evaluando posteriormente la actividad de la enzima. En la **Figura 4.12** se observa el efecto de la preincubación de la TryR con diferentes proporciones de NADPH/ $\text{NADP}^+$ . Tras 30 minutos de preincubación de la enzima en presencia de  $150 \mu\text{M}$  de NADPH y  $7.5 \mu\text{M}$  de  $\text{NADP}^+$  (cuadros blancos), el efecto de inactivación del NADPH (líneas negras) se ve disminuido a la mitad. De igual forma, al usar  $30 \mu\text{M}$  de  $\text{NADP}^+$  (rombos blancos) la actividad de la TryR es cinco veces superior a la de la enzima preincubada solamente con el NADPH. De esta forma demostramos que pequeñas cantidades de  $\text{NADP}^+$  tienen un impacto favorable en la protección de la TryR frente al NADPH. Dado que la oxidación espontánea de NADPH a  $\text{NADP}^+$  es un proceso difícil de controlar entre diferentes condiciones experimentales, nuestros resultados explican la gran variabilidad existente entre diferentes publicaciones sobre el efecto del NADPH en la TryR. En nuestro caso, la adición de  $30 \mu\text{M}$  de  $\text{NADP}^+$  a la mezcla de reacción solucionó los problemas de variabilidad del ensayo.



**Figura 4.12** | Protección de la TryR por  $\text{NADP}^+$ . En la leyenda se indican las diferentes proporciones de NADPH/ $\text{NADP}^+$  ensayadas.

Debido a que el uso del  $\text{NADP}^+$  es una solución obvia para el problema de inactivación de la enzima por el NADPH y, sin embargo, que nosotros conozcamos, ningún investigador la

ha implementado, decidimos realizar una caracterización bioquímica de la TryR para determinar si podría haber una variación entre los datos reportados y los nuestros experimentales al añadir NADP<sup>+</sup> a la reacción.

#### **4.2.3.4    *Desarrollo y validación del ensayo de actividad TryR***

Dado que la TryR es una enzima con dos sustratos (sustrato y coenzima) y que, por tanto, las concentraciones de ambos afectan a la velocidad de reacción, fue necesario establecer las concentraciones de TS<sub>2</sub> y NADPH que saturan a la enzima en las condiciones de nuestro ensayo. En función de los parámetros cinéticos que se desee evaluar, uno de ellos deberá mantenerse siempre en condiciones saturantes.

De igual manera, de cara a validar nuestro ensayo de actividad enzimática, procedimos a determinar los valores de **K<sub>M</sub>** tanto para el TS<sub>2</sub> como para el NADPH y contrastar estos valores con los reportados previamente en la literatura.

Todas estas etapas del desarrollo y validación de nuestro ensayo de actividad enzimática se describen en el **Anexo II** de esta memoria.



## 4.3 Optimización del ensayo de dimerización.

### 4.3.1 Antecedentes

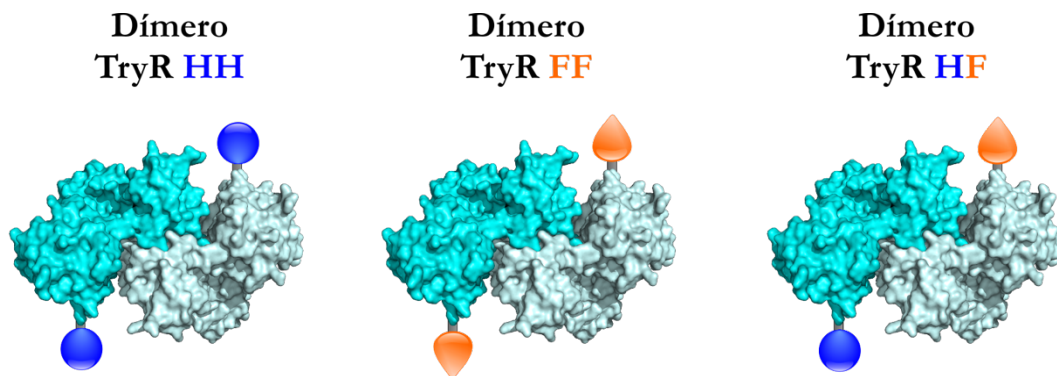
El ensayo de dimerización desarrollado por el Dr. David Moreno (91) consistió en una modificación de la metodología que *Shuis-Cremer et al.* propusieron para evaluar la inhibición de la dimerización de las subunidades de la transcriptasa inversa del VIH-1 (p66 y p51) (228). Este ensayo fue adaptado a la TryR de *L. infantum*, lográndose identificar una primera molécula con potencial inhibitorio que constituyó el punto de partida del trabajo presentado en esta memoria.

El ensayo, basado en un ELISA tipo sándwich, permitía evaluar el porcentaje de moléculas en forma dimérica tras un determinado tratamiento. Brevemente, se capturaba la TryR por un anticuerpo  $\alpha$ -FLAG previamente unido a una placa y, tras el tratamiento deseado, se detectaba el dímero remanente mediante la utilización de un anticuerpo primario  $\alpha$ -HIS (policlonal) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Este procedimiento permitía un fácil seguimiento mediante una reacción colorimétrica con un sustrato cromógeno.

Gracias a los excelentes resultados obtenidos con este ensayo y a su utilidad demostrada en el descubrimiento de un péptido que afectaba el proceso de dimerización de TryR de *L. infantum*, decidimos profundizar en su desarrollo para potenciarlo y ampliar sus aplicaciones, no solo al estudio de TryR sino a otras enzimas diméricas de interés.

Uno de los inconvenientes del ensayo era el uso de dos especies de TryR. La TryR HH corresponde al dímero cuyas dos subunidades cuentan el con *tag* HIS y TryR FF a aquellas cuyas dos subunidades tienen el *tag* FLAG (Figura 4.13). Estas dos especies de TryR se coincubaban durante 12 horas junto al tratamiento antes de su unión a la placa. Durante estas 12 horas de incubación se esperaba que el proceso dinámico de asociación y disociación entre monómeros generara una tercera especie denominada TryR HF, la cual no es más que un dímero que cuenta con una subunidad con HIS y la otra con FLAG.

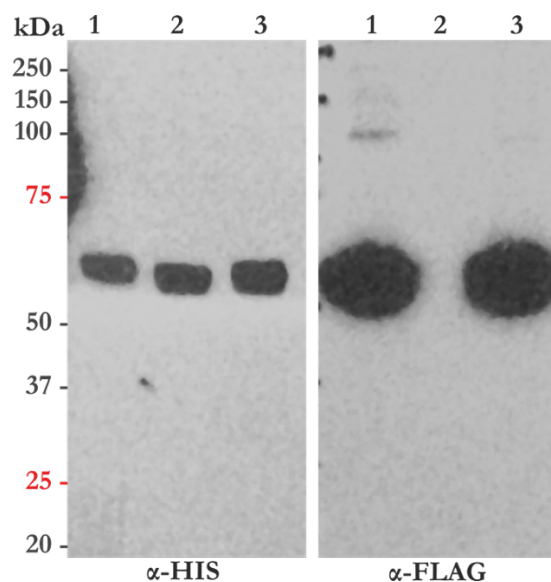
Durante este proceso, la obtención de la TryR HF era una variable que no se podía controlar y que, a su vez, podía verse afectada por la actividad de las moléculas inhibitorias sobre las formas HH y FF. Por otra parte, tras el proceso de incubación se generaban en la solución las 3 especies de enzima dimérica posible: la TryR HH que podría dar falsos positivos en una placa pobremente bloqueada, la TryR FF que competiría por los sitios de unión al  $\alpha$ -FLAG y finalmente la TryR HF, nuestra especie objetivo.



**Figura 4.13** | Las subunidades de TryR se encuentran representadas en dos tonalidades de cian, las esferas azules representan el *tag* HIS y los conos naranjas el *tag* FLAG.

### 4.3.2 Obtención de TryR HF *in-vivo*

Como una evolución racional del ensayo de dimerización, decidimos implementar un sistema para expresar de manera conjunta en una misma bacteria (*E. coli*, BL21 (DE3) Rosetta) la TryR HH y la TryR FF.



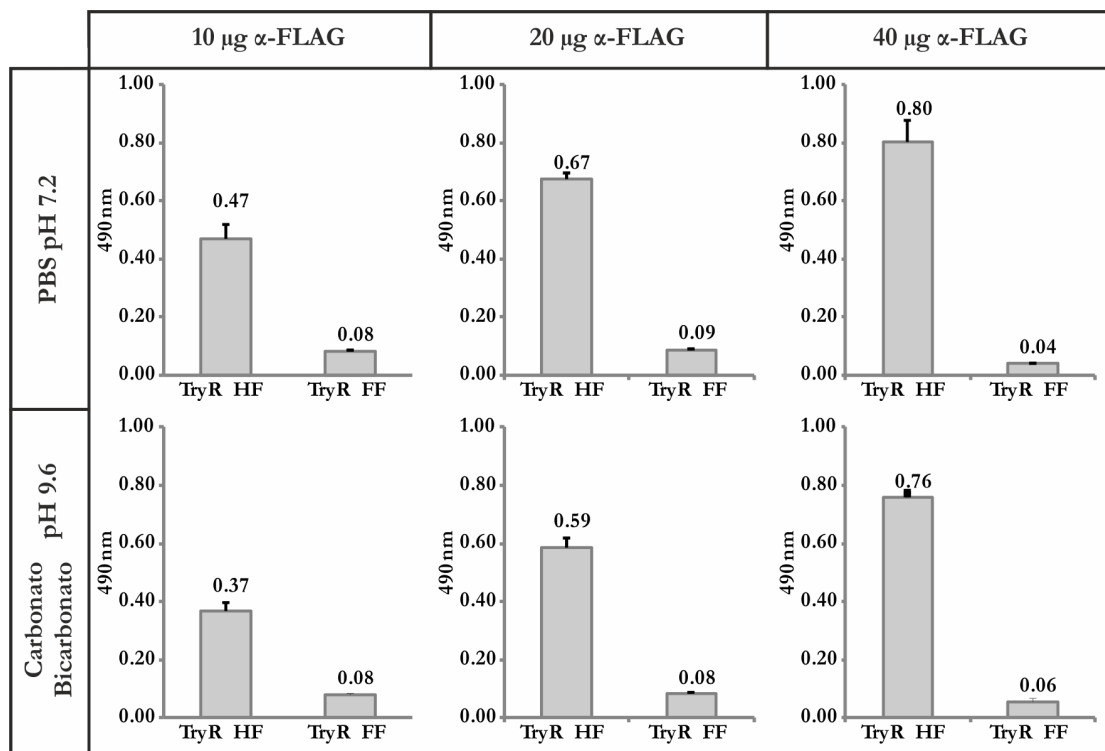
**Figura 4.14** | *Western-blot* para detectar diferentes especies de TryR usando  $\alpha$ -HIS y  $\alpha$ -FLAG. Los carriles 1 y 3 muestran dos preparaciones obtenidas con distintos tiempos de inducción de TryR HF (1 $\mu$ g) usando el sistema de expresión conjunta. El carril 2 se usa como control y corresponde a una preparación de TryR HH.

De esta manera, de forma natural, dentro de la bacteria se genera la TryR HF y por tanto se evita la preincubación inicial en el ensayo original, simplificándose así todo el proceso. Las distintas variantes de TryR generadas en *E. coli* se someten a un proceso de cromatografía en una matriz de Ni-NTA, tras el cual purificamos solo TryR HF y TryR HH y eliminamos todas las especies de TryR FF que pueden competir por los sitios de unión a FLAG en la

placa. Sembrando la misma cantidad de proteína recombinante pura (1  $\mu\text{g}$ ) obtenida en diferentes purificaciones comprobamos que la cantidad de TryR HF generada era aproximadamente constante en distintas purificaciones. (Figura 4.14).

### 4.3.3 Tapizado de las placas de poli-estireno con $\alpha$ -FLAG

Además de la optimización realizada en lo referente a la producción de la enzima con los diferentes *tags*, también se realizó una optimización del proceso de detección de la proteína cambiando de un modelo de placa comercial a un modelo de fabricación casera que nos permitió controlar todas las variables del ensayo (tipo de placa, concentración de anticuerpo y tipo de bloqueo), alcanzando una mayor reproducibilidad en los resultados.

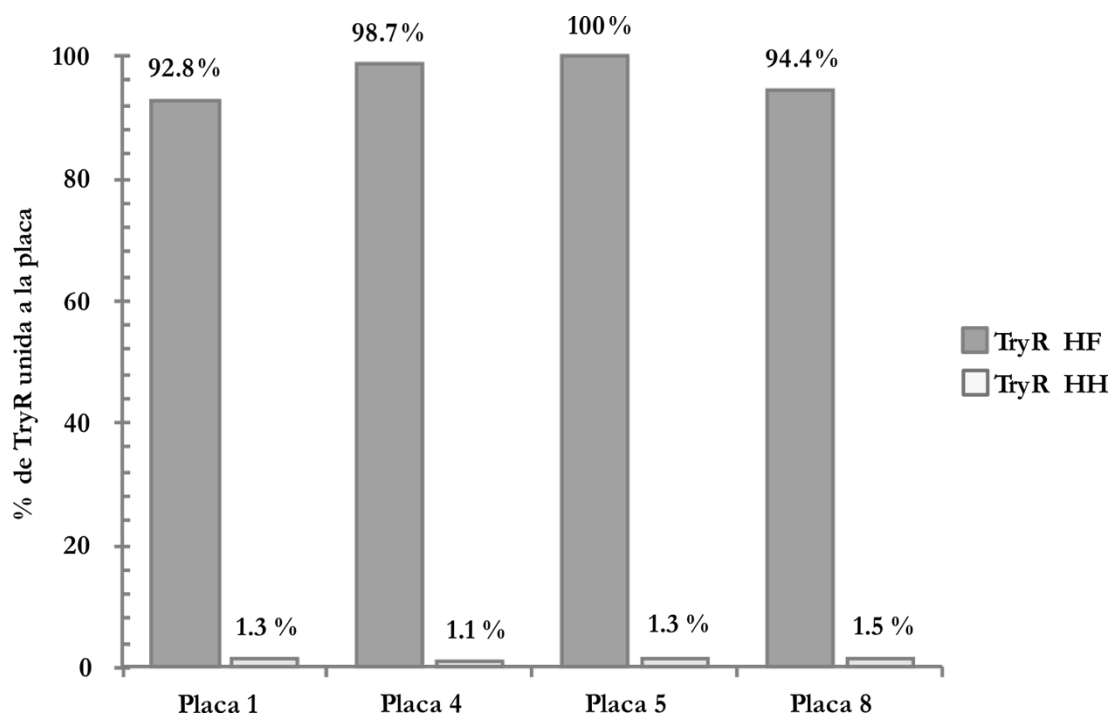


**Figura 4.15** | Optimización del sistema de tapizado de las placas de poliestireno con  $\alpha$ -FLAG. Diferencias de la señal de ELISA con diferentes tampones (carbonato/bicarbonato y PBS) y cantidades de  $\alpha$ -FLAG para el tapizado de la placa.

En un primer momento optimizamos la cantidad de anticuerpo utilizado para tapizar las placas. El tapizado se realiza mediante una adsorción pasiva del anticuerpo a placas de poli-estireno. Dado que las condiciones de unión de los anticuerpos a las placas pueden diferir según el anticuerpo utilizado, se evaluaron diferentes sistemas de tampón, concentración de

anticuerpo y pH para determinar con qué condiciones se obtiene una mejor relación señal/ruido en el ELISA (264) (Figura 4.15). Durante todo el proceso de optimización del ensayo de dimerización se usó como control la TryR HH que no debería unirse a placa y que, por tanto, nos permitía evaluar el ruido del ensayo. Como se observa en la Figura 4.15, la mejor relación señal/ruido se obtuvo al usar PBS pH 7.2 como tampón de adsorción y 40 µg de anticuerpo α-FLAG.

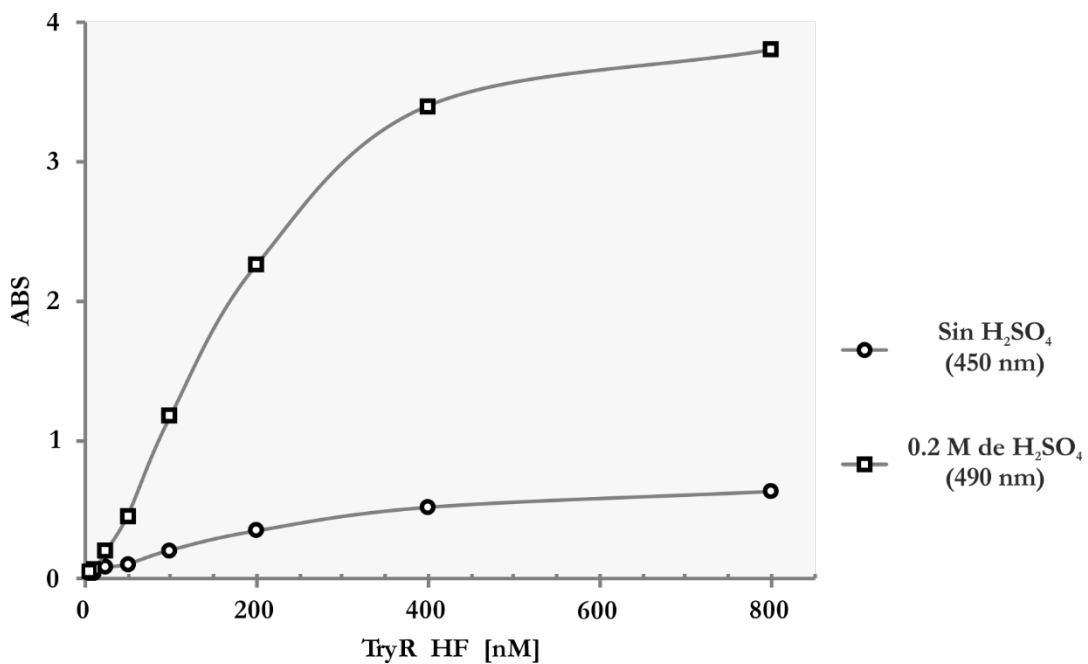
Debido a que se usa una misma solución de anticuerpo para tapizar diferentes placas de manera consecutiva, decidimos evaluar la variabilidad existente entre las diferentes placas realizadas y si su capacidad de unir a la TryR HF se veía progresivamente disminuida. Tras elegir 3 pocillos al azar entre las distintas placas y cuantificar el dímero unido, encontramos que la solución de anticuerpo podía ser usada para antigenar hasta 8 placas sin que tuviera un efecto negativo en la unión de la TryR HF (92% de dímero unido en la placa 1 y 94% en la placa 8). Así mismo, las lecturas de absorbancia correspondientes a los pocillos en los cuales se empleó la TryR HH (ruido) no se vieron aumentadas, manteniéndose todas por debajo del 1,5% de la señal. Los valores fueron normalizados con respecto al valor de absorbancia más alto de dímero detectado (100%) que se corresponde al de la placa 5 (Figura 4.16).



**Figura 4.16** | Variabilidad de la unión de la TryR HF a diferentes placas. De 8 placas preparadas, se seleccionaron las placas 1, 4, 5 y 8. De estas placas se seleccionaron pocillos a azar y se evaluaron las diferencias de unión de la TryR HF usando como control negativo la TryR HH.

#### 4.3.4 Concentración de TryR óptima para el ensayo de dimerización.

De la misma manera, se optimizó también la cantidad de TryR (TryR HF + TryR FF) que se deposita en cada pocillo de la placa haciendo un barrido de concentraciones desde 6 nM hasta 800 nM, siempre con miras a mejorar la relación señal/ruido. De esta forma, determinamos que la mejor concentración inicial de proteína recombinante es de 400 nM (Figura 4.17), ya que al aumentar la concentración de TryR desde 400 nM hasta 800 nM no hay un aumento sustancial en la absorbancia que justifique el gasto del doble de proteína. Como sustrato de la reacción colorimétrica se utiliza orto-fenil-diamina (OPD). La intensidad de color obtenida tras esta reacción se determina inicialmente a los 10 minutos de reacción (absorbancia a 450 nm), procediendo a continuación a detener la reacción mediante la adición de 1 volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 M (absorbancia a 490 nm). Tal y como se observa en la Figura 4.17, la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permite aumentar 7 veces la señal.



**Figura 4.17 | Concentraciones saturantes de TryR.** Saturación de la placa sensibilizada con  $\alpha$ -FLAG empleando diferentes concentraciones de TryR. La señal de ELISA aumenta al añadir H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> después la reacción.

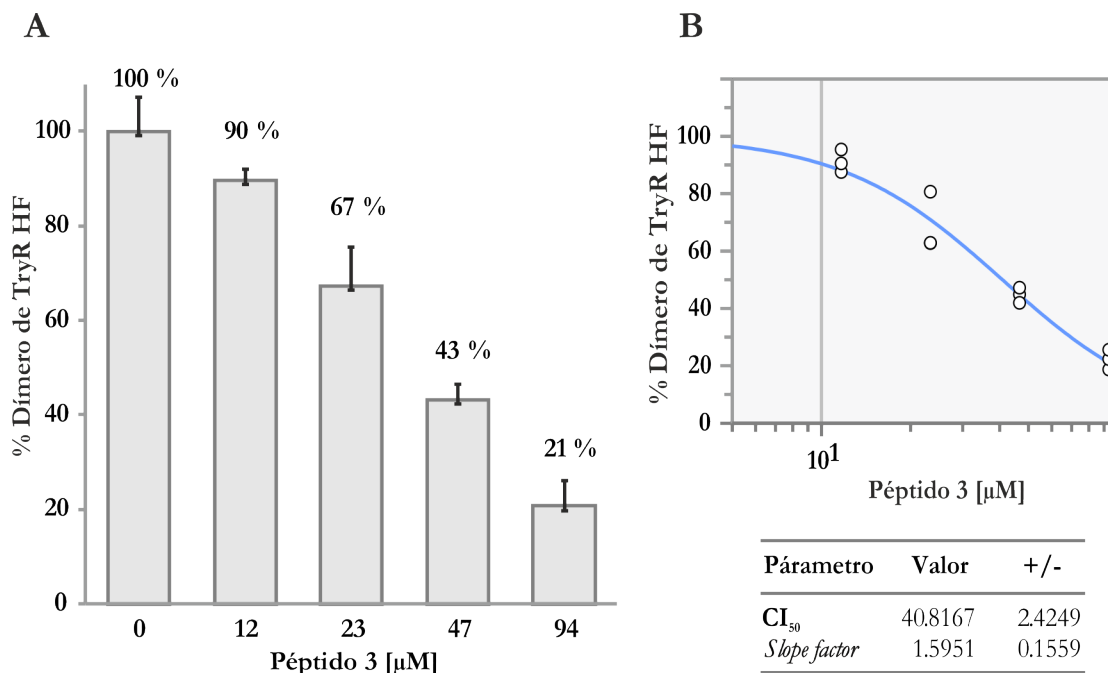
Además de optimizar la producción de los dímeros de TryR, la concentración de anticuerpo  $\alpha$ -FLAG adsorbido a placa y la cantidad de proteína depositada en la misma, también se mejoró el método de detección usando anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -HIS conjugados

directamente con HRP, que evitan el uso de anticuerpos secundarios. Además, el uso de anticuerpos monoclonales evitó la variabilidad entre los diferentes lotes del anticuerpo policlonal utilizado originalmente.

### 4.3.5 Validación del ensayo de dimerización usando el Péptido 3

Tras establecer las nuevas condiciones para la realización del ensayo de dimerización con la TryR HF producida *in vivo*, se realizó un experimento en presencia del Péptido 3, un péptido derivado de la secuencia de la interfaz de dimerización que mostró una relevante actividad en los ensayos de dimerización realizados por el Dr. David Moreno.

Para esto, se incubó la TryR con diferentes concentraciones de Péptido 3 durante 16 horas y se evaluó el porcentaje de dímero remanente. La  $CI_{50}$  para el ensayo de dimerización del Péptido 3 usando nuestro ensayo queda establecida en  $40.8 \mu\text{M}$  (**Figura 4.18**). De esta manera validamos nuestra estrategia de dimerización con miras a evaluar nuevos péptidos con potencial inhibidor de la TryR.

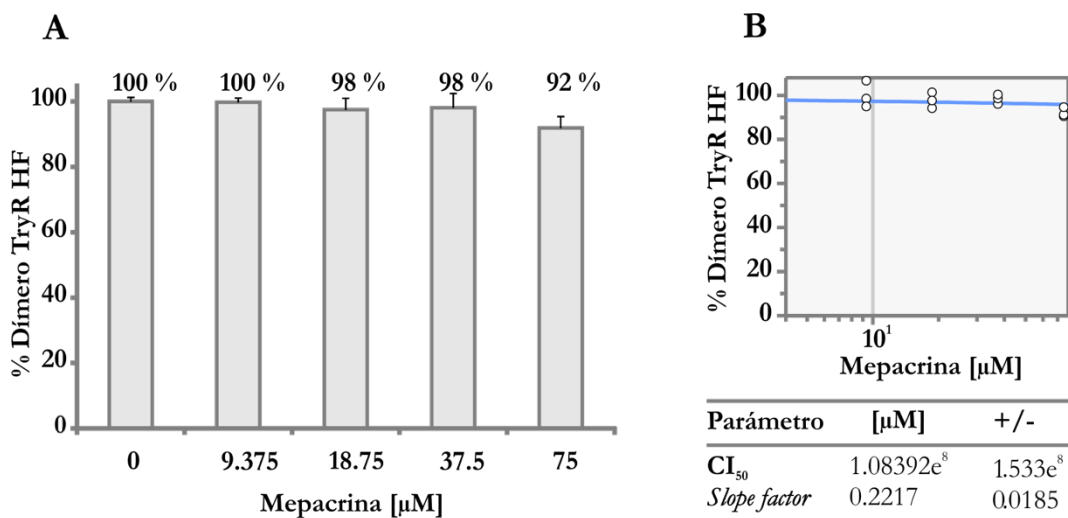


**Figura 4.18** | Disminución del dímero de TryR por el Péptido 3. Usando diferentes concentraciones de Péptido 3 (12  $\mu\text{M}$  - 94  $\mu\text{M}$ ) se estimó la  $CI_{50}$  para el ensayo de dimerización.

Al igual que en el ensayo de actividad, se decidió usar la mepacrina como control del ensayo de dimerización teniendo en cuenta que se trata de un inhibidor competitivo reversible que

ocupa el sitio activo de la enzima y que, por lo tanto, no debería comprometer el proceso de dimerización de la TryR. Como esperábamos, la mepacrina no muestra efecto alguno en la dimerización de la enzima tras 16 horas de incubación (**Figura 4.19**).

De esta forma quedó establecido un ensayo de dimerización mejorado (**Figura en materiales y métodos**) en el que la TryR incubada con una molécula con capacidad de perturbar su proceso de dimerización puede ser detectada de manera sencilla por colorimetría. Este ensayo de dimerización es altamente modular y reproducible y nos ha permitido su implementación no solo en el estudio del proceso de dimerización de la TryR sino también en el de otras proteínas.



**Figura 4.19** | Ausencia de efecto de la Mepacrina (9,375  $\mu\text{M}$  - 75  $\mu\text{M}$ ) sobre la dimerización de TryR.

## 4.4 Optimización del Péptido 3

### 4.4.1 Antecedentes

En las interacciones proteína-proteína se ha demostrado que las interfaces de unión son amplias superficies (600 - 1300 Å<sup>2</sup>) en las que pueden llegar a interaccionar hasta 30 residuos de cada uno de los monómeros implicados **(160,265)**. Esta realidad dificulta el diseño racional de moléculas miméticas. En 1995 *Clackson et al* **(160)** describieron por primera vez cómo en la interacción entre la hormona de crecimiento humana y su receptor, en la que se ven implicados 33 residuos, destaca la participación de dos residuos de triptófano que contribuyen de manera mayoritaria a la energía libre de unión. Estos residuos fueron denominados puntos calientes o *hot spots*. Un punto caliente está definido como un residuo cuya sustitución por una alanina conduce a una disminución significativa en la energía libre de unión ( $\Delta\Delta G_{\text{unión}} > 1.5 \text{ kcal/mol}$ ) **(160)**. La existencia de *hot spots* permitió hipotetizar que es posible un diseño racional de moléculas miméticas con miras a desestabilizar las interacciones proteína-proteína con interés farmacológico si se centra el interés sobre estos sitios concretos.

### 4.4.2 Péptidos inhibitorios de la Tripanotión Reductasa.

El trabajo desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. David Moreno estuvo basado en la identificación de *hot spots* de dimerización de la TryR de *Leishmania infantum* mediante herramientas bioinformáticas y su posterior validación por experimentos de mutagénesis puntual dirigida. Estos experimentos llevaron a la conclusión de la importancia del glutámico 436 (E436) en la estabilidad del dímero de la TryR al demostrar que un cambio de este aminoácido por una alanina conducía a una pérdida de la actividad de la enzima, disminuyendo su capacidad de unir FAD con respecto a la enzima silvestre y también su eficiencia catalítica en más de 350 veces **(91)**.

El glutámico 436 se localiza en una hélice  $\alpha$  que forma parte de la interfaz de dimerización de la TryR. Por ello se decidió explorar la aproximación más sencilla, consistente en el uso de la secuencia de aminoácidos que compone esta hélice para generar un péptido inhibitorio. Para ello se diseñaron 4 péptidos **(Tabla 4.2)**: el primero contenía los residuos exactos que componen la hélice desde el aminoácido 435 al 447; el segundo contenía la misma secuencia pero con un cambio en la cisteína 444 por una serina (C444S) con el fin de evitar la formación



de disulfuros intermoleculares que disminuyeran la efectividad del péptido y posibles problemas de oxidación del grupo tiol; una tercera versión del Péptido 2 presentaba el extremo amino acetilado y el extremo carboxilo en forma amida con el fin de evitar el carácter *zwitterion*; finalmente, se intentó realizar una aproximación a la secuencia mínima efectiva diseñando un cuarto péptido con el menor número de residuos que mantuviera la helicidad del mismo.

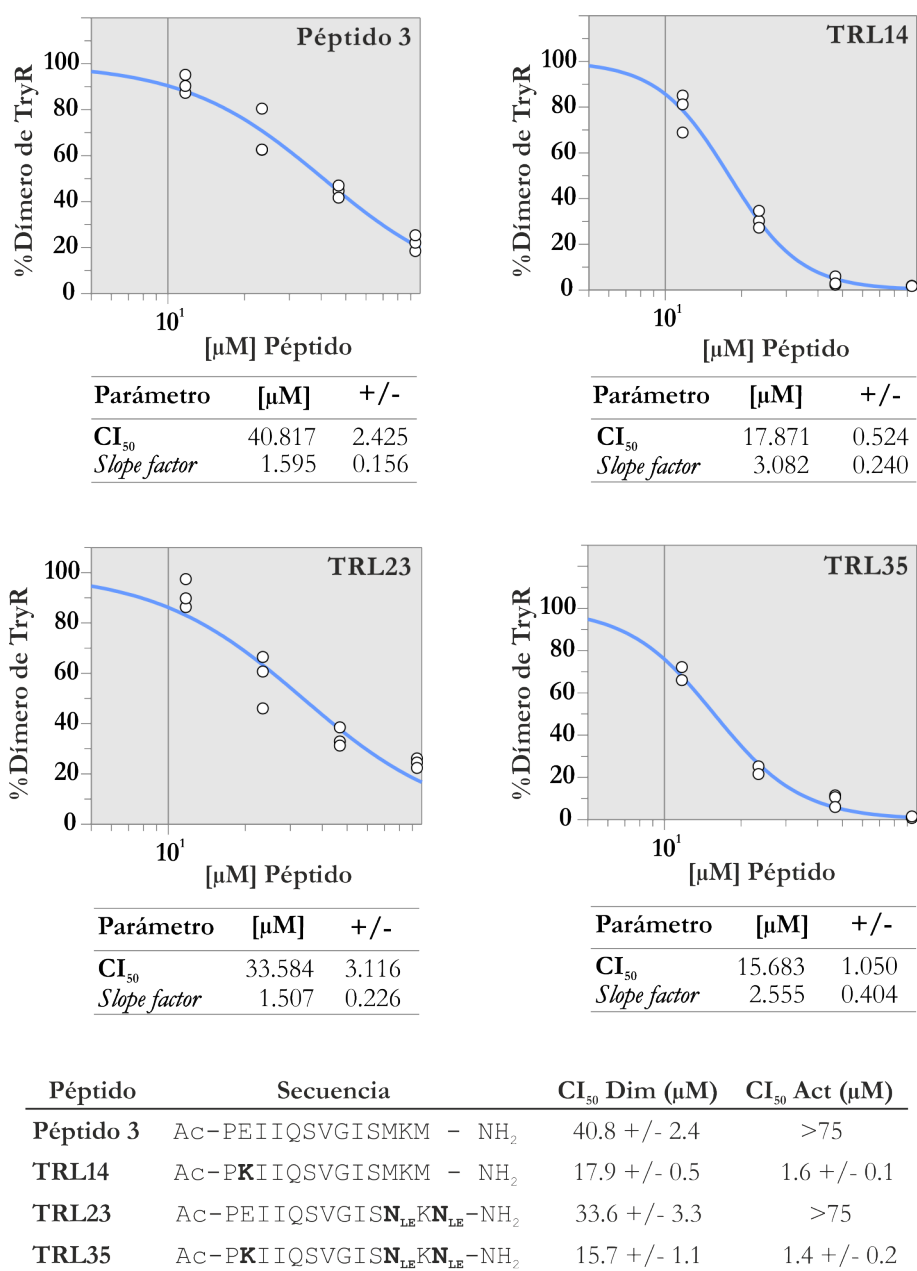
|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Péptido 1</b> | H <sub>2</sub> N- <b>PE</b> IIQSVGICMKM-COOH |
| <b>Péptido 2</b> | H <sub>2</sub> N- <b>PE</b> IIQSVGISMKM-COOH |
| <b>Péptido 3</b> | Ac- <b>PE</b> IIQSVGISMKM-Amd                |
| <b>Péptido 4</b> | Ac- <b>PE</b> IIQSVGIS-Amd                   |

**Tabla 4.2** | Péptidos usados en el trabajo del Dr. David Moreno. En negrita se resalta el glutámico 436, residuo identificado como clave en la interfaz de dimerización **(91)**.

De estos 4 péptidos primigenios, el Péptido 3 demostró tener un efecto en la actividad y la dimerización de la TryR, lo cual constituyó la prueba de concepto de que secuencias derivadas de este péptido podrían servir como inhibidores de la actividad de la enzima. Este resultado constituye el punto de partida de la presente tesis doctoral en la que se busca la optimización de este péptido prototipo con el fin de inhibir la actividad de la TryR de *Leishmania infantum* mediante el bloqueo del proceso de dimerización de la enzima.

#### 4.4.3 TRL 14: El cambio del glutámico en la posición 2 del péptido por una lisina mejora las propiedades del Péptido 3.

Debido a que las formas mutantes de GluR que son defectuosas en el proceso de dimerización muestran una menor afinidad por el grupo FAD **(266)**, la medición de la relación entre las absorbancias a 450 nm (FAD) y 280 nm (proteína) puede ser usada para analizar el estado de dimerización de GluR y TryR. Después de identificar la importancia del residuo E436, en una segunda ronda de mutagénesis realizada en el trabajo del Dr. David Moreno se sustituyó este residuo por una lisina (E436K) con el fin de ver los posibles efectos de la sustitución de un residuo ácido por uno básico. Aunque este cambio no tuvo un efecto tan drástico en la actividad de la TryR como el observado en la versión E436A, sí causó una disminución en la relación  $A_{450}/A_{280}$  hasta menos del 50% de la observada en el caso del cambio por alanina.



**Figura 4.20** | Disminución de las especies díméricas de TryR por diferentes péptidos. El cambio de un ácido glutámico en la posición 2 del péptido 3 por una lisina (TRL 14) disminuye los valores de  $\text{CI}_{50}$  en los ensayos de dimerización y actividad.

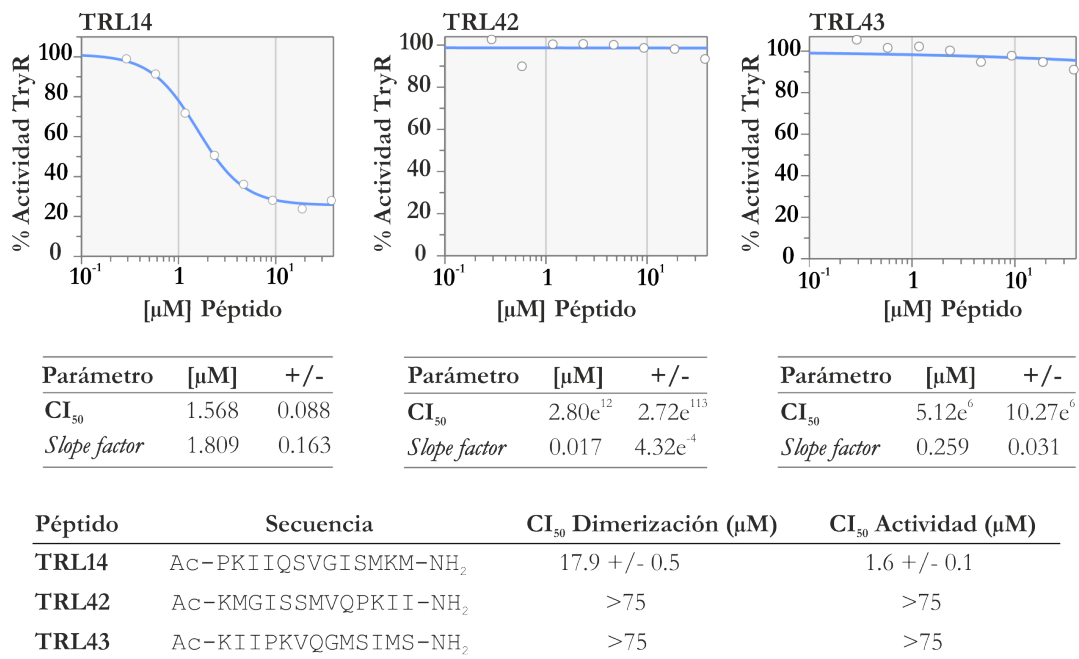
Teniendo en cuenta estos resultados, nos propusimos, junto con al grupo de nucleósidos del Instituto de Química Médica (IQM) del CSIC, iniciar un estudio más detallado del efecto de diferentes sustituciones de aminoácido en el Péptido 3 sobre la actividad y la dimerización de la TryR. El trabajo comenzó evaluando el efecto de una sustitución del glutámico en la posición 2 por una lisina, generando así el péptido TRL14. Junto a TRL 14 también se

sintetizó TRL 23, que es una variante del Péptido 3 que tiene un cambio en las metioninas 11 y 13 por el aminoácido estructuralmente similar norleucina ( $N_{LE}$ ). Este cambio se realiza con el fin de evitar potenciales problemas de oxidación en los átomos de azufre y aumentar así la estabilidad de los péptidos (267).

En la **Figura 4.20**, se observa cómo en 3 ensayos distintos de cuantificación de dímero usando diferentes concentraciones de péptido (entre 75  $\mu\text{M}$  y 2.7  $\mu\text{M}$ ), la sustitución del ácido glutámico en la posición 2 por una lisina (TRL14) reduce el valor de  $CI_{50}$  en más de un 50% (40  $\mu\text{M}$  vs 17  $\mu\text{M}$ ). De la misma forma, el cambio en el Péptido 3 de las metioninas 11 y 13 por norleucinas (TRL23) reduce en aproximadamente un 25% dicho valor de  $CI_{50}$  (40  $\mu\text{M}$  vs 33  $\mu\text{M}$ ). De igual manera, el reemplazo de las metioninas por norleucinas en el TRL14 (TRL35) causa una nueva disminución en los valores de  $CI_{50}$  (17  $\mu\text{M}$  vs 15  $\mu\text{M}$ ).

En el caso del ensayo de actividad enzimática, los resultados obtenidos también muestran una reducción en los valores de  $CI_{50}$  para todos los péptidos testados (TRL14, TRL23 y TRL35) con respecto al Péptido 3 (**Figura 4.20**).

Por todo lo anterior, TRL35 se convirtió en el péptido prototipo de este estudio y en él se han basado los diferentes cambios realizados con el fin de aumentar su potencial inhibitorio. Debido a que el ensayo de actividad emplea 50 veces menos cantidad de TryR HT recombinante que el ensayo de dimerización y a que, además, los resultados pueden ser obtenidos en mucho menos tiempo (2 horas vs 2 días), el cribado de los nuevos péptidos generados se realizó inicialmente mediante el ensayo de inhibición de la actividad enzimática. Con el fin de evaluar si la inhibición observada de la TryR por el TRL14 y TRL35 es específica, se utilizó el programa GenScript ([http://www.genscript.com/peptide\\_screening\\_tools.html](http://www.genscript.com/peptide_screening_tools.html)) para generar de manera aleatoria dos péptidos con diferentes permutaciones (*scrambled peptides*) de los aminoácidos encontrados en TRL14.

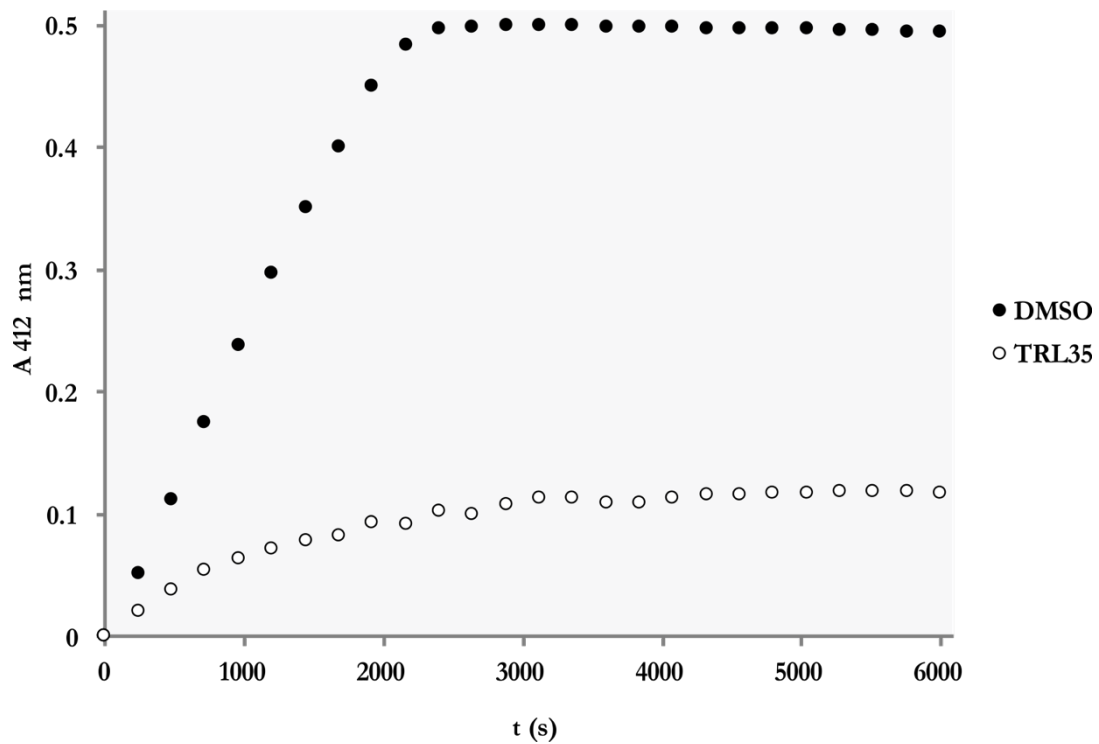


**Figura 4.21 | Actividad de TRL14 y los péptidos *scrambled* TRL42 y TRL43 en el ensayo de dimerización.** La permutación de los residuos de TRL14 elimina la capacidad inhibitoria de los nuevos péptidos, tanto en actividad como en dimerización.

Estos péptidos (TRL42 y TRL43) resultaron inactivos tanto en actividad como en dimerización (**Figura 4.21**), demostrando que la actividad inhibitoria de TRL14 es específica de secuencia.

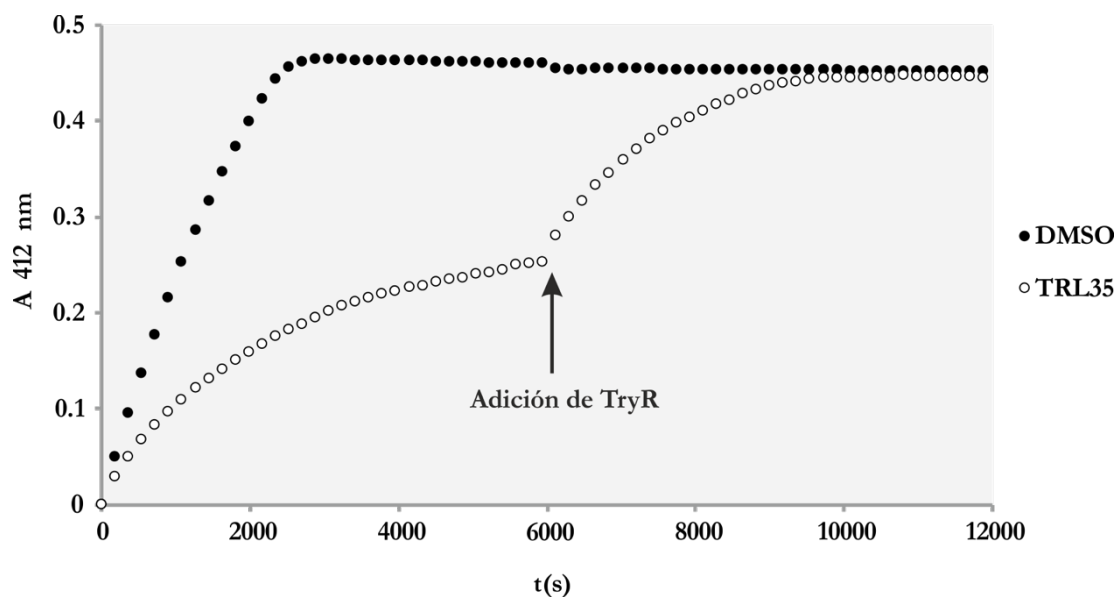
#### 4.4.4 Estudio de TRL35 como inhibidor de la actividad enzimática de TryR.

Como ya se mencionó, el ensayo de determinación de la actividad enzimática fue diseñado para mantener constante la concentración de  $\text{TS}_2$  mientras exista DTNB en el medio. La densidad óptica deja de aumentar una vez consumida esta especie química. Como consecuencia del mantenimiento de una concentración constante de  $\text{TS}_2$ , la pendiente de la curva que representa el aumento de absorbancia a lo largo del tiempo debe mantenerse constante hasta el final del experimento, tal y como se observa en la gráfica que representa el transcurso de la reacción en presencia de DMSO (**Figura 4.22**).



**Figura 4.22** | Actividad de la enzima en presencia de 1,75% de DMSO (círculos negros) o 25  $\mu\text{M}$  de TRL35 (círculos blancos)

El tratamiento de TryR (7 nM) con 25  $\mu\text{M}$  de TRL35 causa una disminución en la actividad de la enzima, tal y como se evidencia por la disminución progresiva de la pendiente de la curva que finalmente queda estabilizada en un valor cercano a 0 (**Figura 4.22**). Este comportamiento no es debido a la desaparición de ninguno de los reactivos, ya que tan solo la adición de nueva TryR, más no de NADPH,  $\text{TS}_2$  o DTNB, permitió restaurar la producción de TNB (**Figura 4.23**). Estas observaciones son consistentes con una inactivación tiempo-dependiente de la enzima y no con una disminución del sustrato u otro artefacto experimental.

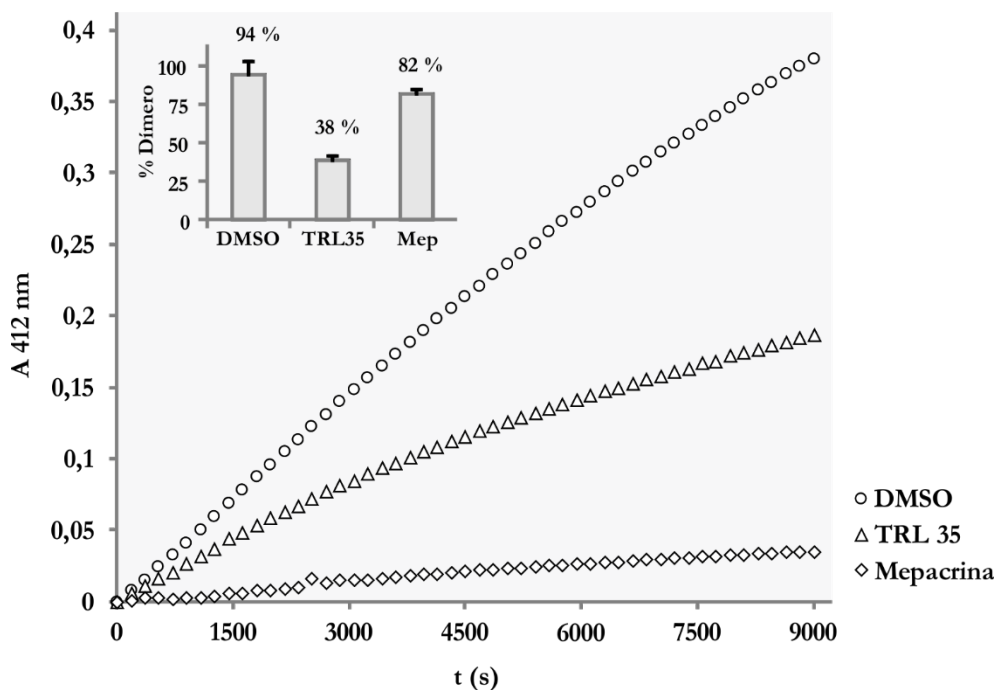


**Figura 4.23** | Rescate de la actividad de TryR. La actividad de la TryR en presencia de 25  $\mu\text{M}$  de TRL35 se restaura tras la adición de nueva TryR a los 6000 s.

#### 4.4.5 La inhibición de la actividad oxido-reductasa de TryR por TRL35 va asociada a un proceso de desdimerización.

A pesar de que, por separado, se pudo demostrar el efecto de TRL35 tanto en la perturbación de la dimerización como en la inhibición de la actividad enzimática, nuestro próximo objetivo fue demostrar de manera inequívoca que la reducción de la actividad enzimática es debida a la perturbación de los dímeros de TryR.

Para este fin, el ensayo de actividad fue acoplado al ensayo de dimerización. Después de unir la TryR a una placa sensibilizada con  $\alpha$ -FLAG, se realizó un ensayo de actividad durante 150 min en presencia de TRL35. Tras recoger los datos de actividad, se lavaron los pocillos y se realizó un ensayo de dimerización estándar sobre la TryR remanente. Después de analizar los resultados de ambos ensayos, encontramos que en los pocillos tratados con TRL35, en los cuales se había observado un  $\sim 50\%$  de reducción de la actividad enzimática, la cantidad de dímero también se reducía en un  $\sim 50\%$  (diagrama de barras insertado) (**Figura 4.24**). Estos resultados sustentan que el mecanismo de inhibición de TRL35 está basado en una perturbación del dímero de TryR mediante un proceso que es cinéticamente lento, pero que se ve acelerado durante la actividad enzimática.

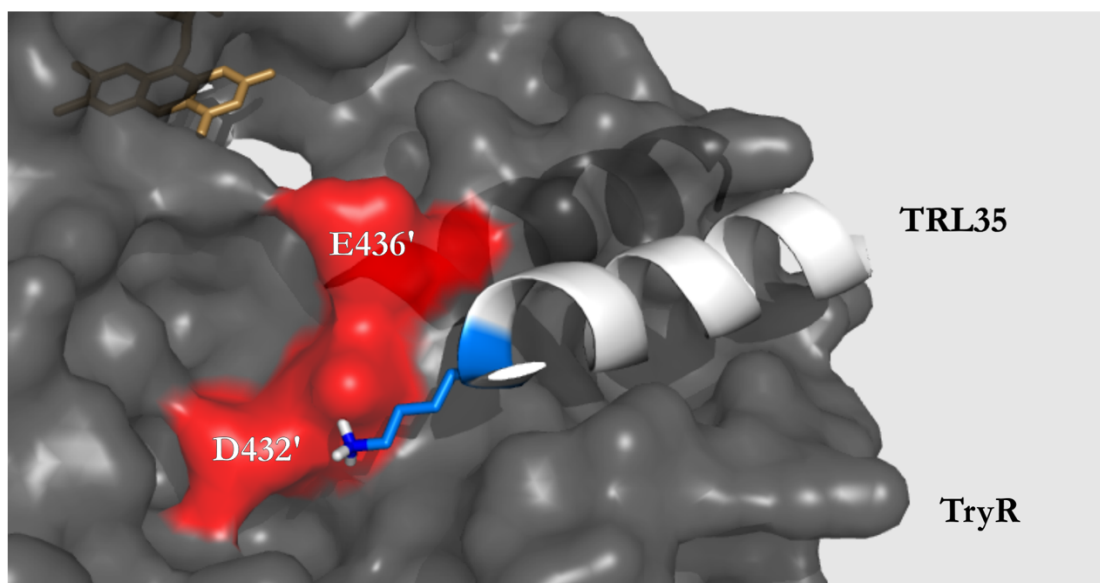


**Figura 4.24 | Ensayo de dimerización tras el ensayo de actividad.** Se llevaron a cabo tres reacciones tras unir la TryR a placas  $\alpha$ -FLAG. Las reacciones se realizaron en presencia de DMSO (○), 50  $\mu$ M de TRL35 (△) y 50  $\mu$ M de mepacrina (◇). En el recuadro se observa la cuantificación del dímero tras la reacción enzimática.

#### 4.4.6 Simulaciones de dinámica molecular de TRL35 con TryR

Para dilucidar el proceso de unión y evaluar la importancia relativa de los diferentes residuos del péptido, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de un monómero de TryR en complejo con TRL35 en un disolvente acuoso explícito. El péptido fue modelado utilizando como molde la hélice que comprende los residuos 435-447 correspondiente al otro monómero, reemplazando el glutámico en la posición 2 por una lisina. Tanto la evolución de la desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) de las posiciones de los átomos pesados ( $C_{\alpha}$ , C, N y O) con respecto a la estructura inicial a lo largo de 20 ns como la inspección visual de la trayectoria seguida sugirieron que el sistema se había estabilizado tras 1 ns. Los análisis de la simulación revelaron que la cadena lateral de la lisina 2 en el TRL35 establecía un enlace de hidrógeno con el carboxilato del glutámico 436' durante más del 80% del tiempo de simulación. Además, este residuo básico también interacciona de manera ocasional con el aspártico 432'. Estas interacciones simuladas de TRL14 (K2) y TRL35 (K2) con los monómeros de TryR proporcionan una explicación para la alta afinidad de estos péptidos comparada con la de los Péptidos 3 (E2) y TRL23 (E2). La

citada lisina en posición 2 se ancla al surco de unión entre las subunidades perturbando la constitución dimérica de la TryR e inhibiendo su actividad (**Figura 4.25**).



**Figura 4.25 | Interacción propuesta entre TRL35 y la TryR.** Se ilustran las bases de la interacción electrostática del péptido TRL35 con la TryR. En blanco TRL35, en azul la lisina (K2) y en rojo la zona de la enzima con la cual se establece la interacción electrostática entre la lisina y la TryR. Además, en gris oscuro se muestra la hélice que compone la interfaz de dimerización y su interacción con el péptido que mimetiza esta hélice.

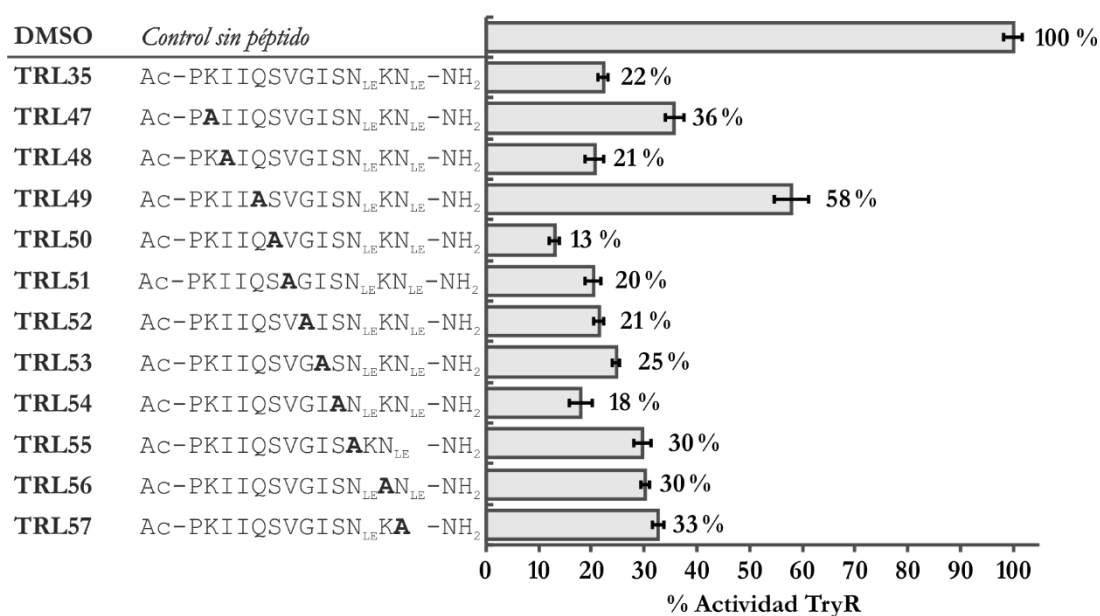
#### 4.4.7 Escaneo de Alaninas: Identificación de nuevos *hot spots* en la interacción del péptido con TryR.

El escaneo de alaninas o *Alanine Scanning* es una metodología usada con el fin de determinar la contribución de un residuo específico a la estabilidad o función de una proteína. Tal y como lo describieron *Cunningham et. al.* en 1989, la alanina, a diferencia de lo que ocurre con la glicina o la prolina, se utiliza como reemplazo de los diferentes residuos debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono  $\beta$  sin alterar la conformación de la cadena principal polipeptídica (**268**). Esta metodología se puede emplear para determinar si la cadena lateral de un residuo específico tiene un papel preponderante en la actividad de un péptido con potencial inhibitorio (**269**).

En todos los péptidos diseñados para este ensayo se mantuvo la prolina en la posición 1 con objeto de limitar la libertad conformacional en el extremo amino-terminal. Los efectos de los péptidos TRL48-TRL57 en el ensayo de actividad fueron comparados con los del péptido prototipo TRL35. Solo se tuvieron en cuenta las velocidades iniciales de reacción, las cuales



se utilizaron para calcular los porcentajes relativos de inhibición comparando el efecto de cada péptido sobre la actividad de la enzima frente a un control sin tratamiento (DMSO). Por ejemplo, el péptido prototipo (TRL35) disminuye la velocidad inicial de la reacción en un 78%, lo que quiere decir que la velocidad inicial de la reacción toma un valor equivalente al 22% de la observada en presencia de DMSO. Cualquier incremento en este último valor indica que el residuo correspondiente cumple una función relevante en la labor inhibitoria del péptido.



**Figura 4.26 | Escaneo de Alanina sobre la secuencia de TRL35.** Secuencia de los péptidos y porcentaje de actividad de la TryR tras 20 minutos de actividad. Todos los péptidos se evaluaron a una concentración de 25  $\mu$ M. Los residuos sustituidos en TRL 47 (K2) y TRL49 (Q5) son los más relevantes en la interacción de TRL35 con la TryR.

Como se puede ver en la **Figura 4.26**, el reemplazo por alanina tiene el efecto más adverso en la posición 5 (TRL49), con una velocidad inicial del 58% respecto a la del control, muy superior al 22% observado en presencia de TRL35. Ello sugiere que la cadena lateral de la glutamina en la posición 5 contribuye de manera sustancial a la unión del péptido a la TryR. Es destacable que esta glutamina se corresponde con la Q439 identificada como un posible *hot-spot* en el cribado bioinformático reportado por el Dr. David Moreno (91).

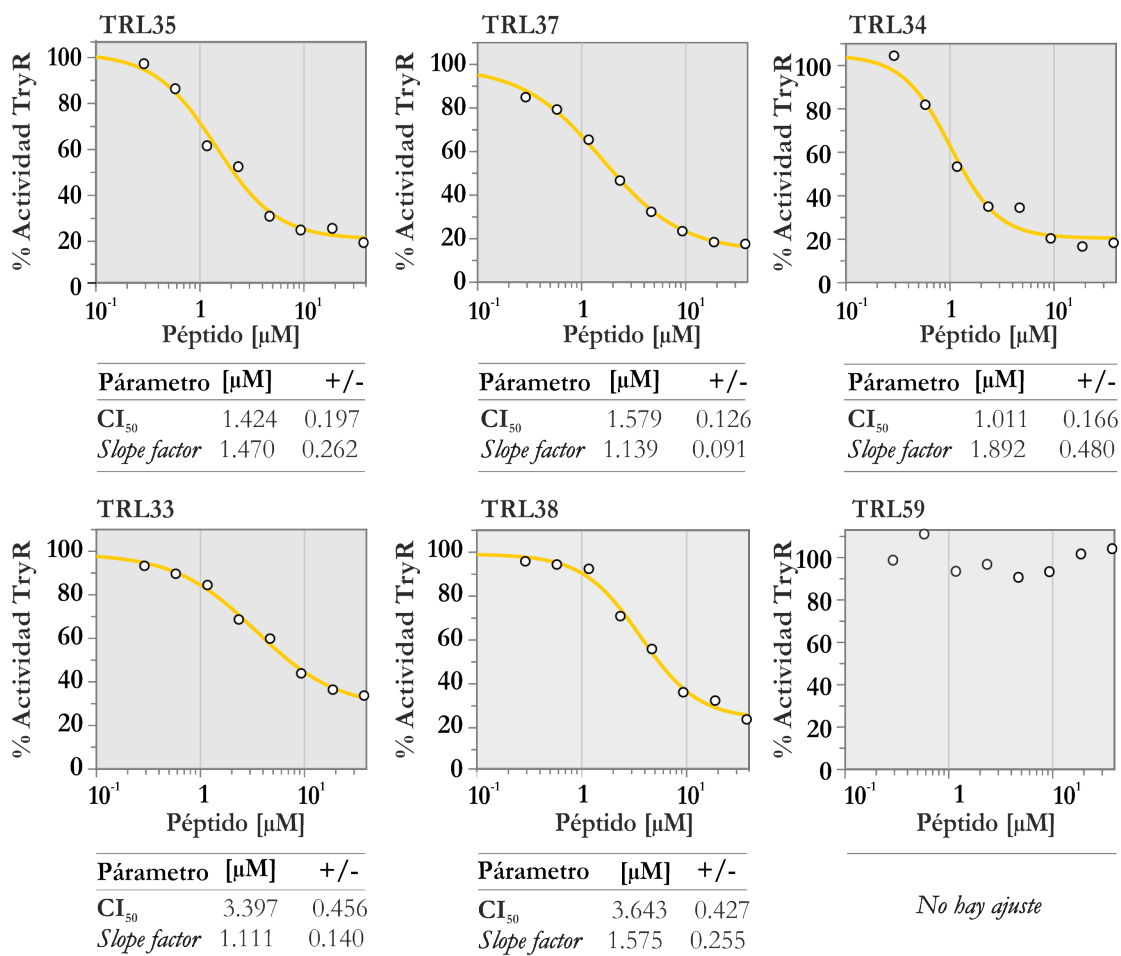
Este residuo, sin embargo, no pudo ser validado como *hot-spot* al demostrarse que su cambio por alanina no afectaba a la actividad de la enzima, a su forma nativa, o a su capacidad de unir FAD (91).

Como era de esperar, la sustitución de la lisina en la posición 2 por una alanina (TRL47) reduce la capacidad inhibitoria del péptido, confirmando la relevancia de este residuo. Tan solo se observó un incremento relevante de la actividad inhibitoria en el caso de la sustitución de la serina en posición 6 (TRL50). Aunque con un efecto menor, también la sustitución de la serina en posición 10 por una alanina causó un ligero aumento de la potencia inhibitoria. El resto de sustituciones realizadas no tuvo ningún efecto significativo sobre la potencia del péptido.

#### **4.4.8 Exploración de la longitud mínima con capacidad inhibitoria mediante derivados de TRL35**

Además del escaneo de alaninas, otra de las estrategias que puede conducir a optimizar el uso de un péptido como inhibidor enzimático es el estudio de la secuencia mínima con capacidad inhibitoria. Si se conocen cuáles son los aminoácidos esenciales en el funcionamiento del péptido es posible seleccionar el extremo que se puede acortar. En nuestro caso, al saber de la importancia de la lisina 2 y teniendo en cuenta que la prolina en la posición 1 crea una restricción conformacional al principio del péptido, acortamos el TRL35 por el extremo carboxilo terminal.

De esta forma se diseñaron los péptidos TRL37, 34, 33, 38 y 59, que corresponden a versiones acortadas en un residuo cada vez. Estos péptidos se utilizaron en un ensayo de actividad de TryR para comparar sus valores de  $CI_{50}$  con los de TRL35. Los resultados obtenidos mostraron que 9 aminoácidos son suficientes para mantener los valores de  $CI_{50}$  por debajo de 4  $\mu$ M. La capacidad inhibitoria del péptido se pierde por completo cuando su longitud se limita a 8 aminoácidos, indicando la relevancia de la isoleucina en posición 9. Así mismo, podemos concluir que los 4 residuos terminales contribuyen escasamente a la unión del péptido a la TryR (**Figura 4.27**).



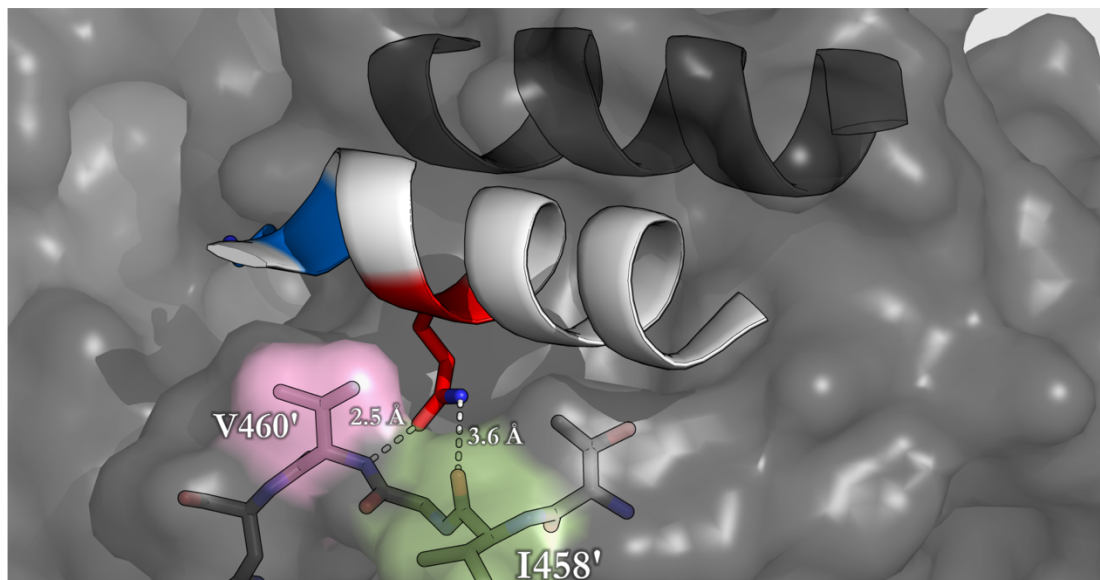
| Péptido | Secuencia  | CI <sub>50</sub> [μM] | +/-   |
|---------|--|-----------------------|-------|
| TRL35   | Ac-PKIIQSVGISN <sub>1E</sub> KN <sub>1E</sub> -NH <sub>2</sub> | 1.424                 | 0.197 |
| TRL37   | Ac-PKIIQSVGISN <sub>1E</sub> K-NH <sub>2</sub>                 | 1.579                 | 0.126 |
| TRL34   | Ac-PKIIQSVGISN <sub>1E</sub> -NH <sub>2</sub>                  | 1.011                 | 0.166 |
| TRL33   | Ac-PKIIQSVGIS-NH <sub>2</sub>                                  | 3.307                 | 0.456 |
| TRL38   | Ac-PKIIQSVGI-NH <sub>2</sub>                                   | 3.643                 | 0.427 |
| TRL59   | Ac-PKIIQSVG-NH <sub>2</sub>                                    | >75                   | -     |

Figura 4.27 | Actividad de TRL 35 y péptidos cortos en el ensayo de dimerización. El acortamiento de la secuencia es posible hasta la Isoleucina 9 (TRL38). Más allá el péptido pierde su potencial inhibitorio (TRL59).

#### 4.4.9 Interacción de la Glutamina 5 de TRL35 con TryR

Una simulación de dinámica molecular de TRL35 unido a un monómero de TryR en ausencia de restricciones mostró una interacción estable, por medio de un enlace de hidrógeno, entre la cadena lateral de la glutamina en la posición 5 del péptido y el esqueleto polipeptídico del

monómero de TryR. A lo largo de la simulación la alanina 465', junto a la isoleucina 458' y la valina 460', generan un bolsillo bien definido en la superficie de la subunidad de TryR ( $\sim 450 \text{ \AA}^2$ ) en el que la glutamina 5 del péptido se encuentra enterrada (**Figura 4.28**).



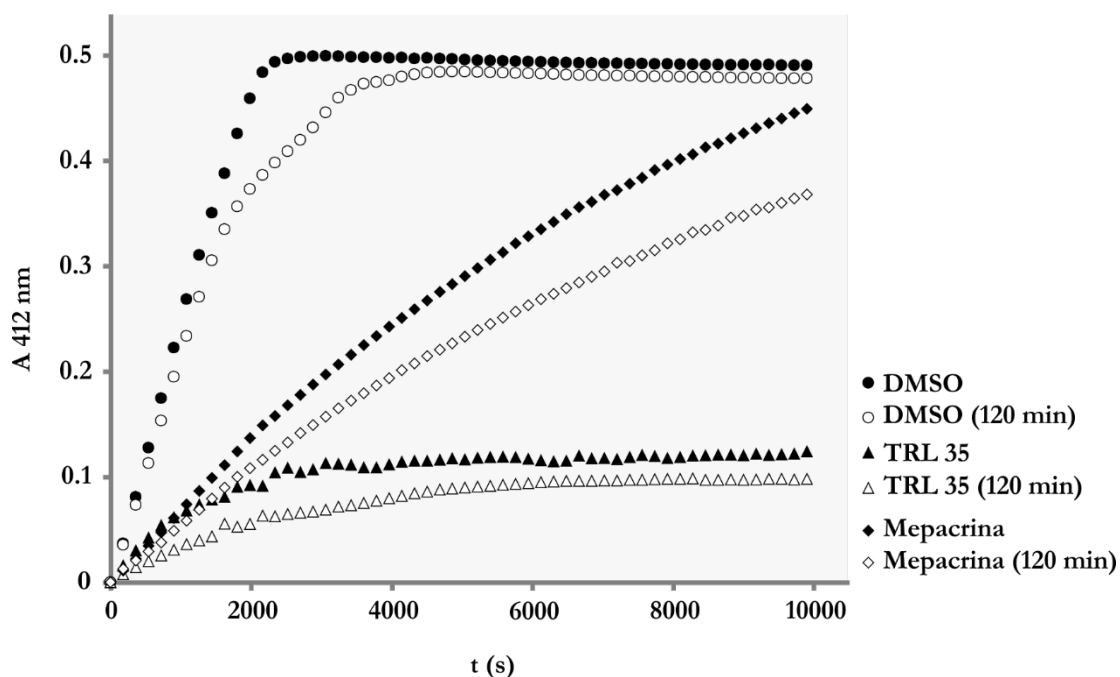
**Figura 4.28 | Interacción de la glutamina 5 de TRL35 con un monómero de TryR.** La subunidad de TryR está representada como una superficie gris y en negro se muestra la hélice que forma parte de su interfaz de dimerización y su interacción con TRL35 (hélice blanca). En azul y en rojo, respectivamente, se muestran la K2 y la Q5 de TRL35. Las líneas discontinuas corresponden a los enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral de Q5 y el nitrógeno del esqueleto polipeptídico de la valina 465' (rosa) y el oxígeno, también del esqueleto, de la isoleucina 458' (verde).

Debido a esto, este residuo actúa de manera eficiente como un ancla que ayuda en la unión del TRL35 a la superficie del monómero de TryR aun cuando una mutación puntual de este residuo en la enzima, como demostró el Dr. David Moreno, no tiene un efecto notable en la estabilidad del dímero o en su actividad oxidoreductasa. Dicho de otra manera, la contribución relativa de este residuo a la interacción TRL35: TryR<sub>m</sub> es mucho mayor que la que presenta en la interacción TryR<sub>m</sub>:TryR<sub>m</sub>. Por tanto, un residuo que inicialmente fue identificado como un posible *hot-spot* de dimerización, pero que al final no resultó relevante en la estabilidad del dímero, se convierte en un residuo esencial en la unión del péptido al monómero.

#### 4.4.10 El proceso de catálisis potencia la inhibición de TryR por TRL35

El análisis de las curvas que representan el transcurso de la reacción en presencia de TRL35 a lo largo del tiempo evidencia una pérdida paulatina de actividad de la enzima. Esta

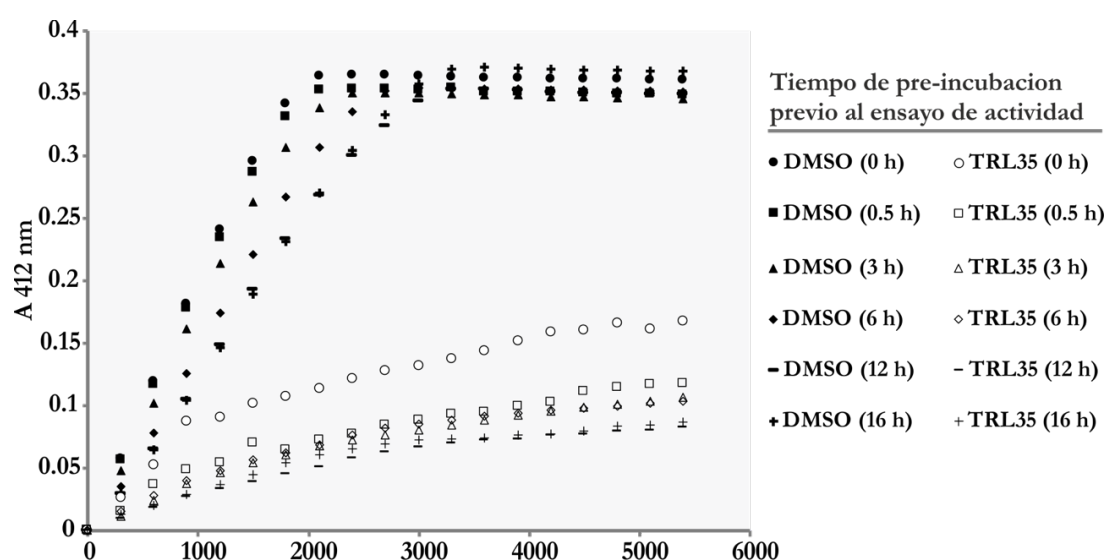
disminución progresiva de la actividad puede ser atribuible a la necesidad de tiempos relativamente largos de interacción de la enzima con su inhibidor y/o a la necesidad de que se produzca la catálisis para que TRL35 desarrolle por completo su potencial inhibitorio. Los resultados mostrados en la **Figura 4.29** muestran que la enzima queda prácticamente inactivada tras 100 min (6000 s) de reacción. La pregunta relevante en este momento fue si la inactivación era causada simplemente por la coincubación de enzima e inhibidor durante esos 100 minutos o, por el contrario, la inactivación se produce como consecuencia de la reacción enzimática y no solo por la mera coincubación. Para distinguir entre ambas posibilidades evaluamos si la preincubación del péptido con la enzima durante 120 min antes de iniciar la reacción causaba una inactivación de la enzima equivalente a la observada tras 100 minutos de reacción. Nuestros resultados mostraron que, a pesar de observar una pequeña reducción en la velocidad de la reacción, en ningún caso la enzima se inactivó por completo como consecuencia de la mera coincubación (**Figura 4.29**). De hecho, el tiempo de reacción necesario para que la pendiente de la curva se aproximara al valor 0 fue prácticamente idéntico en la muestra preincubada y en aquella en la que la enzima se puso en contacto con el inhibidor al inicio de la reacción (compárense los triángulos sólidos y los vacíos).



**Figura 4.29 | Efecto de la preincubación de la TryR con inhibidor.** Actividad enzimática en presencia de 1.75% de DMSO, 25  $\mu$ M de mepacrina y 25  $\mu$ M de TRL35 con y sin incubación.

La preincubación de la enzima en presencia de 1.75% DMSO o 25  $\mu$ M de mepacrina (inhibidor competitivo de la TryR) también causó una reducción en las velocidades de reacción, lo que nos induce a suponer que el hecho de mantener a la enzima diluida en la mezcla de reacción permite que se alcance un nuevo equilibrio entre sus formas monomérica y dimérica, causando así una reducción en esta última que es a su vez determinante de una menor velocidad de reacción.

Los resultados que se muestran en la **Figura 4.30** demuestran que la enzima mantiene su actividad incluso cuando la preincubación se realiza por tiempos mucho más largos (hasta 16 horas).



**Figura 4.30** | Actividad de TryR (7 nM) tras distintos tiempos de incubación con 25  $\mu$ M de TRL 35

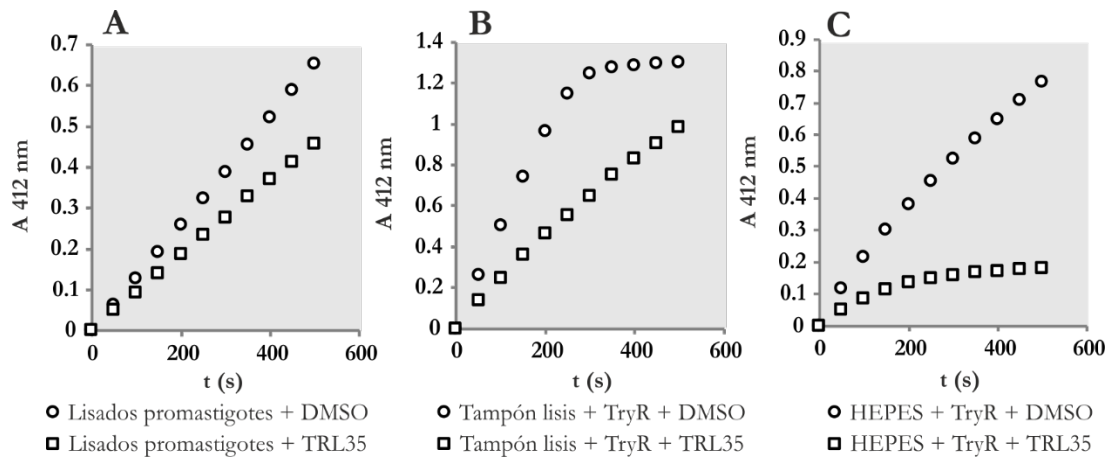
De los datos presentados podemos concluir que la actividad inhibitoria de los péptidos solo alcanza su máximo potencial cuando la enzima se encuentra ejerciendo su actividad oxidoreductora. Este comportamiento se conoce como inactivación enzimática basada en el mecanismo (*mechanism-based inactivation*) (229). Nuestro hallazgo permite ofrecer una explicación racional para la discrepancia entre los valores de  $CI_{50}$  observados en los ensayos de actividad y dimerización.

## 4.5 Efecto del TRL35 sobre la TryR endógena del parásito.

### 4.5.1 Inhibición de la TryR silvestre en lisados de promastigotes de *L. infantum*

Una vez establecida la capacidad de nuestro prototipo TRL35 para inhibir la TryR de *L. infantum* expresada y purificada a partir de bacterias, consideramos relevante comprobar también su capacidad para inhibir la TryR silvestre presente un extracto de promastigotes de *L. infantum*.

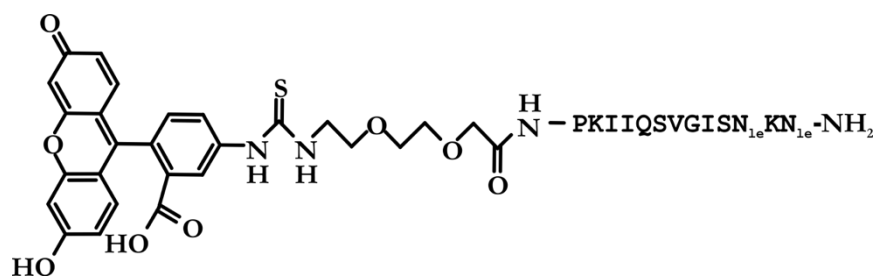
Para ello se puso a punto el ensayo desarrollado por *van den Bogaart et al.* que adapta la reacción acoplada a DTNB ya descrita para su uso en aquellas situaciones en las que la TryR proviene de extractos celulares (247). Como se aprecia en la **Figura 4.31 A**, si bien TRL35 a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ) es capaz de reducir la actividad TryR presente en el extracto de promastigotes, esta inhibición no es tan pronunciada como la observada en un ensayo de actividad estándar sobre TryR recombinante (**Figura 4.31 C**). La comparación de los dos ensayos revela dos posibles causas de este peor comportamiento del péptido: i) la presencia de múltiples macromoléculas en el extracto celular que, mediante interacciones inespecíficas, puedan disminuir la concentración efectiva de péptido disponible y ii) las diferentes composiciones de los tampones de ensayo. El posible efecto de la diferente composición de los tampones se evaluó comparando la capacidad inhibitoria de TRL35 sobre TryR recombinante en ambas condiciones de ensayo (**Figuras 4.31 B y C**). Como se puede apreciar, el tampón utilizado para la lisis de los parásitos tiene un efecto adverso en la capacidad del péptido de inhibir la enzima, efecto que presumiblemente puede ser atribuido a la presencia del detergente Tritón X-100. A pesar de que este debe ser el motivo fundamental del diferente comportamiento de TRL35 en ambos ensayos, no es completamente descartable el efecto de la unión inespecífica del péptido a las numerosas macromoléculas presentes en el extracto celular. En cualquier caso, este conjunto de experimentos avala la capacidad de TRL35 para inhibir la TryR presente en los parásitos.



**Figura 4.31 | Inhibición de la TryR silvestre presente en lisados de parásitos por 25  $\mu$ M de TRL35. A.** Inhibición de la TryR silvestre en lisados. **B.** Inhibición de la TryR recombinante en tampón de lisis, **C.** Inhibición de la TryR recombinante en tampón de actividad (HEPES 40 mM)

#### 4.5.2 Entrada del Péptido en amastigotes de *L. major* (*in-cellulo*)

La capacidad del péptido 35 para penetrar en las células se evaluó mediante la unión de 5-isocianato de fluoresceína (FITC), una molécula fluorescente ( $\lambda_{490_{ex}}$ ,  $\lambda_{525_{em}}$ ) que permite el seguimiento *in cellulo* del péptido mediante microscopia confocal. Esta versión modificada de TRL35 fue sintetizada por *Peptide Protein Research* y el FITC se agregó en el extremo amino-terminal usando un espaciador de poli-etilenglicol (PEG). Este péptido fue denominado TRL58 (**Figura 4.32**).



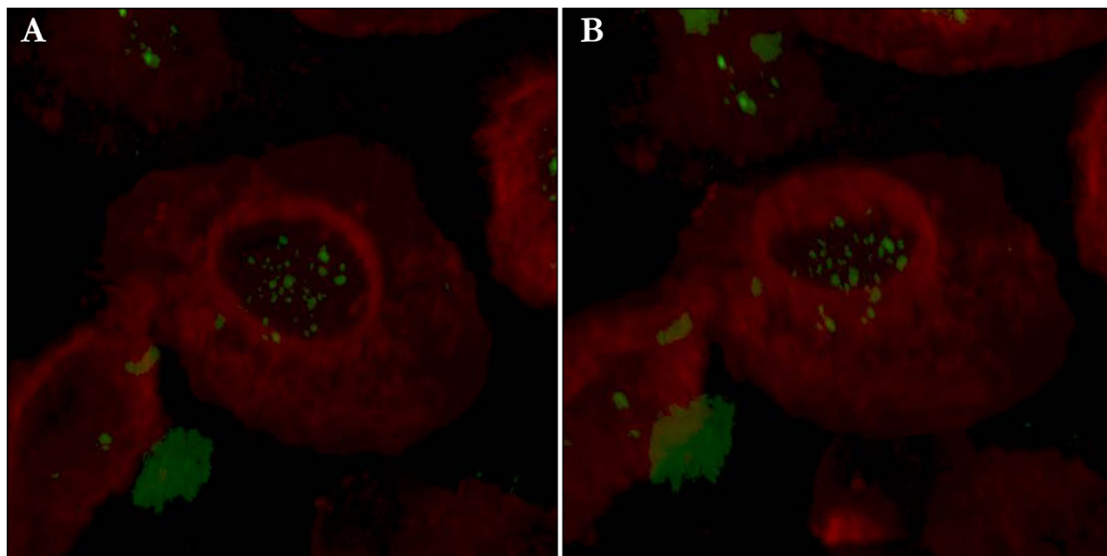
**Figura 4.32 | Estructura del TRL58.** Este péptido es un derivado del TRL35 y presenta una molécula de FITC y un espaciador PEG en el extremo amino-terminal.

Los experimentos de microscopia confocal fueron realizados durante una estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. *Ger van Zandbergen* del Instituto *Paul Ehrlich* (Alemania).



Tras realizar diversos ensayos a concentraciones de 75  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , se determinó que este péptido, a altas concentraciones, tiene tendencia a formar precipitados fluorescentes que iluminan todo el campo tras la excitación de la muestra e impiden por lo tanto la obtención de una imagen clara. Se decidió entonces que la concentración de 5  $\mu\text{M}$  es la más idónea para realizar estos experimentos, ya que concentraciones menores generan una fluorescencia muy tenue.

En la **Figura 4.33**, se observa una imagen en dos planos confocales distintos de macrófagos tratados con 5  $\mu\text{M}$  de TRL58 durante 16 horas. Tras el tratamiento, las células se lavan para eliminar el exceso de péptido y se tiñen con CellMask™ DeepRed (ThermoFisher Scientific), que tiñe de manera rápida y homogénea las membranas plasmáticas, permitiendo determinar la localización intracelular o extracelular de la fluorescencia. En la **Figura 4.33 A** se observa en verde el péptido TRL58. Al cambiar el plano confocal (**Figura 4.33 B**) se puede comprobar que estas estructuras verdes se localizan dentro de la célula. En la parte inferior izquierda de las imágenes puede apreciarse un precipitado extracelular de TRL58.

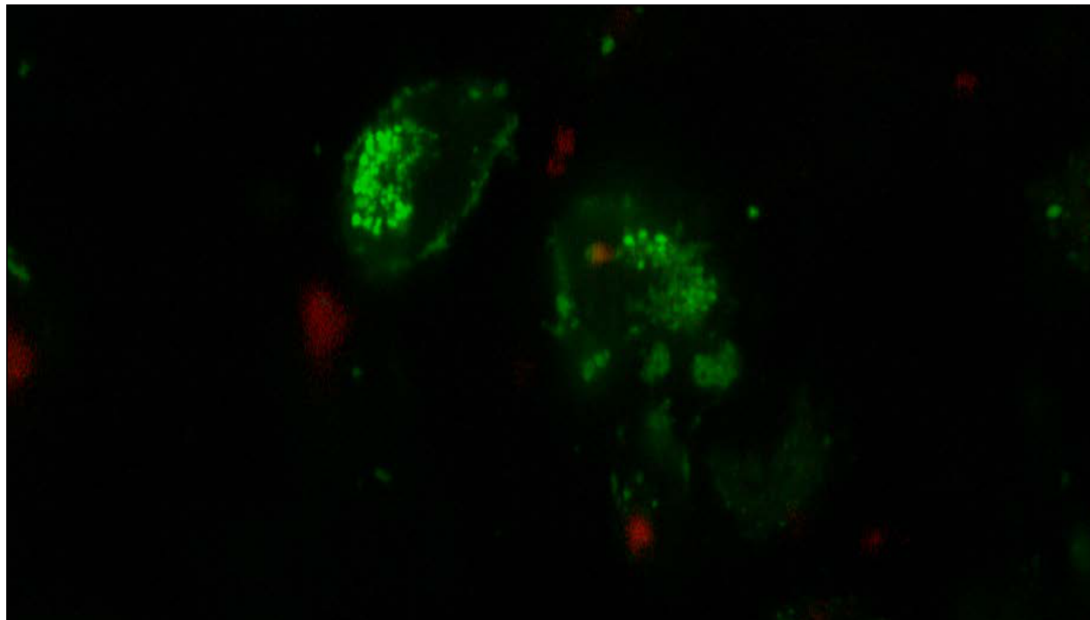


**Figura 4.33** | Macrófagos marcados con *CellMask DeepRed* (rojo) e incubados con TRL58 (verde) a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  durante 16 h. Se muestran dos planos confocales del mismo campo. En **B** se aprecia que TRL58 se encuentra dentro del macrófago.

Las imágenes muestran claramente que TRL58 no está distribuido de manera homogénea en el citoplasma celular, sino que se encuentra en compartimentos discretos con apariencia vacuolar. Ello podría deberse a una fagocitación de los agregados peptídicos mencionados con anterioridad. Estos macrófagos también fueron usados para realizar experimentos de colocalización de los parásitos con el péptido. En este experimento, los macrófagos se

incubaron durante dos horas con amastigotes axénicos que expresan la proteína DsRed. Tras la incubación, los amastigotes no internalizados fueron eliminados mediante lavados. Posteriormente, los macrófagos se trataron con 5  $\mu$ M de TRL58 durante 16 horas.

Como se observa en la **Figura 4.34**, que se corresponde a un campo representativo de los observados, dentro de la célula se aprecia de nuevo la emisión de fluorescencia verde (TRL58) compartimentalizada en vacuolas. En el macrófago de la derecha se observa la emisión de fluorescencia roja que indica la posición de los amastigotes intracelulares. Aunque observamos varias células infectadas que, a su vez, internalizaron TRL58, no logramos ver nunca colocación del péptido y los parásitos, lo que indica que el péptido no llega hasta la ubicación intracelular en la que se encuentra el parásito a pesar de que sí se encuentra dentro del macrófago.



**Figura 4.34** | Microscopía confocal de macrófagos infectados con amastigotes DsRed (rojo) y tratados con 5  $\mu$ M de TRL58 durante 16 horas.

Estos resultados resaltan la dificultad que presenta la utilización de péptidos con la intención de inhibir proteínas pertenecientes a parásitos intracelulares y pone de manifiesto la necesidad de desarrollar péptidos unidos a secuencias transportadoras que faciliten la entrada de estos hasta los compartimentos donde son requeridos. Una solución alternativa es el desarrollo de moléculas pequeñas basadas en la estructura del péptido prototipo que puedan atravesar de manera más sencilla las diferentes membranas.

## 4.6 Estabilización estructural de los péptidos lineales TRL23 (E2) y TRL35 (K2)

### 4.6.1 Antecedentes

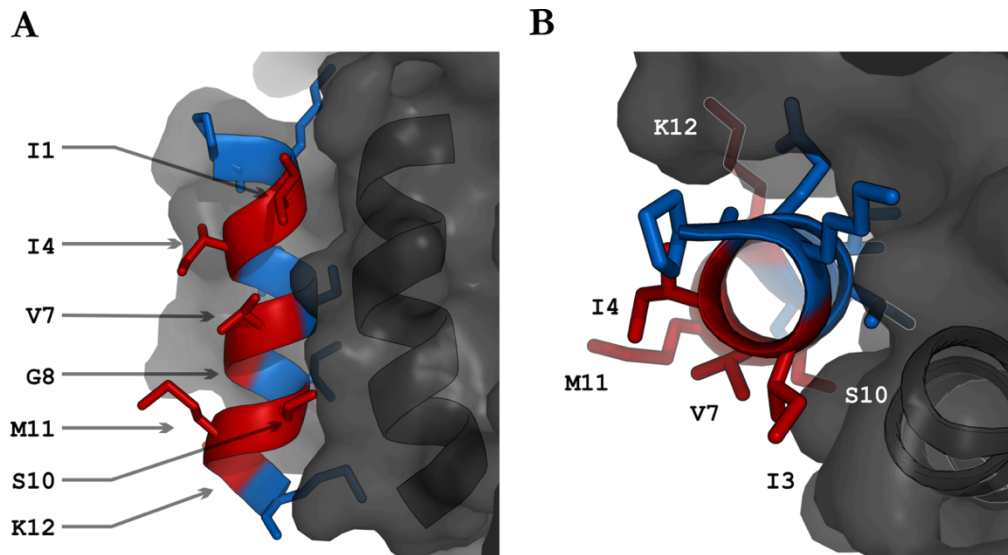
Aunque el péptido primigenio (Péptido 3) fue diseñado a partir de la hélice  $\alpha$  comprendida entre el residuo P435 y M447 de la TryR de *L. infantum*, se sabe que una secuencia peptídica aislada de su entorno proteico podría no mantener su estructura, adoptando conformaciones diferentes a la deseada. Ello hace al péptido más susceptible a proteasas, disminuye su permeabilidad a través de las membranas plasmáticas y, más importante aún, interfiere en su capacidad de interactuar de forma específica con la diana (270). Tras realizar una predicción de helicidad usando el algoritmo AGADIR (<http://agadir.crg.es/>), se estimó que el valor de helicidad global para los péptidos lineales es de 0.69%, lo que podría considerarse sub-óptimo para su interacción con TryR (271).

Con el fin de forzar una conformación helicoidal en los péptidos y que, además, aumentara su estabilidad, se realizaron una serie de restricciones conformacionales mediante ciclación. Existen diversos tipos de interacciones covalentes utilizadas para realizar estas restricciones, entre las que se cuentan los enlaces metal-ligando, los enlaces disulfuro, los enlaces de hidrazonas, los 1,2,3 triazoles, los enlaces lactama y los puentes hidrocarbonados, también llamados grapas. De todas ellas, decidimos explorar el uso de grapas y de puentes lactama debido a su exitosa contribución a la estabilización de hélices  $\alpha$ .

El objetivo se centró en estabilizar la estructura helicoidal de péptidos lineales derivados de TRL23 (E2) y de TRL35 (K2), uniéndolos de manera covalente las cadenas laterales de dos residuos situados en la cara de la hélice que se espera que no interactúen con la proteína. Los residuos disponibles en nuestros péptidos para realizar esta unión se muestran en la **Figura 4.35**.

El diseño de las mejores posiciones covalentes para un cierre hidrocarbonado se basó en las predicciones teóricas del grado de helicidad de los péptidos cíclicos y en resultados de dinámica molecular de los complejos formados entre los péptidos cíclicos y un monómero de TryR (TryR<sub>m</sub>). Estas tareas fueron realizadas por el Dr. Pedro Alejandro Sánchez Murcia en el laboratorio del Prof. Federico Gago. Por otra parte, la síntesis de los péptidos más promisorios, los estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la prueba de resistencia a proteasas se llevaron a cabo en el Grupo de Nucleósidos del IQM dirigido por la Dra. Sonsoles Velázquez y la Prof. M<sup>a</sup> José Camarasa. Finalmente, las pruebas

de inhibición de la actividad y perturbación de las especies diméricas fueron realizadas en nuestro laboratorio.



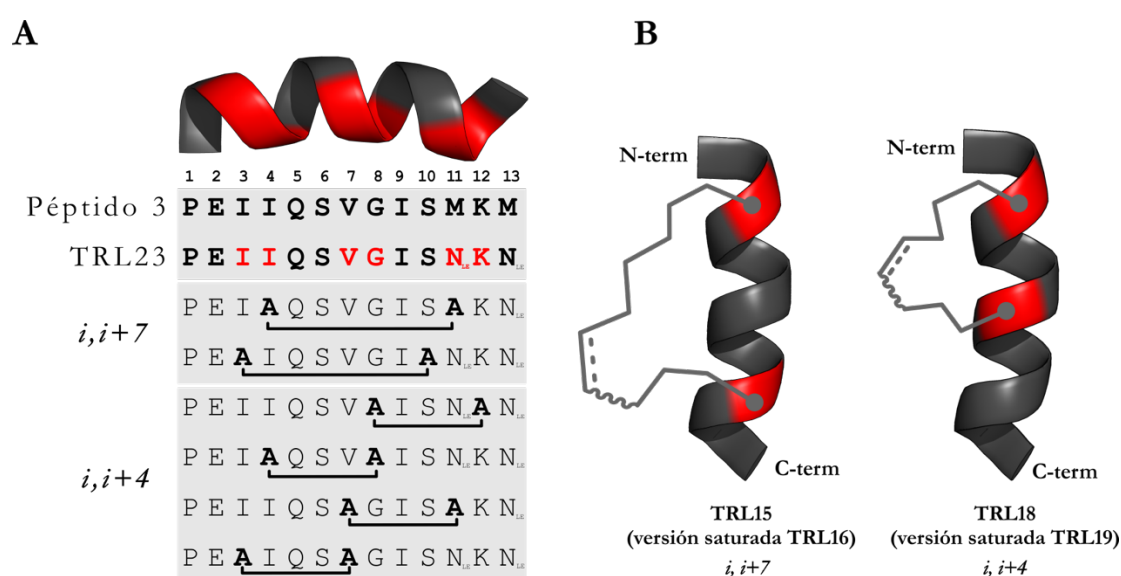
**Figura 4.35 | Interacción de péptido con un monómero de TryR.** En azul se muestra la cara del péptido que interactúa con la enzima y en rojo los residuos de la cara opuesta. **A.** Residuos disponibles para realizar los enlaces covalentes que aporten restricción conformacional. **B.** Plano sagital de **A** comenzando por el extremo amino terminal del péptido. En gris oscuro se muestra la hélice equivalente a nuestros péptidos que forma parte del monómero de TryR. Ambas hélices se disponen de forma paralela en la estructura nativa de la proteína.

#### 4.6.2 Puentes Hidrocarbonados (“grapados”)

Los péptidos cíclicos con puentes hidrocarbonados, o grapados, han sido usados con éxito en diversas áreas de química biológica y química médica ya que, en comparación con los péptidos lineales, muestran no solo una mayor helicidad y afinidad de unión a la diana terapéutica sino también una mayor permeabilidad a través de las membranas celulares. Brevemente, los péptidos grapados se sintetizan introduciendo aminoácidos no naturales portadores de grupos alqueno en sus cadenas laterales de longitud variable que, tras ser sometidos a una reacción de metátesis, generan el puente hidrocarbonado. La longitud de los grupos alqueno introducidos depende de si se quiere realizar un cierre tras un paso de vuelta ( $i, i+4$ ) o dos pasos de vuelta ( $i, i+7$ ).

##### 4.6.2.1 *Diseño in silico de los péptidos hidrocarbonados.*

Como ya se demostró anteriormente, el Péptido 3 y su análogo con norleucinas resistente a la oxidación (TRL23) tienen el mismo potencial inhibitorio (**Figura 4.20**), por lo que se realizó un estudio *in silico* de las mejores posiciones de ciclación para este último. La ubicación de la grapa influye de manera crítica el grado de estructuración y la actividad biológica de un péptido dado, por lo que se hizo un estudio de dinámica molecular utilizando el campo de fuerzas AMBER y el algoritmo DSSP para determinar el grado de helicidad por residuo de cada péptido. Con ello pretendimos seleccionar las mejores posiciones para los cierres covalentes en  $i, i+4$  e  $i, i+7$  que conducirían a un grado más alto de estabilización de la estructura helicoidal de TRL23 (**Figura 4.36 A**).



**Figura 4.36 | Péptidos con cierres covalentes hidrocarbonados.** **A.** En rojo se muestran las posiciones ciclables en la cara opuesta a la que interactúa con el monómero de TryR y su ubicación con respecto al péptido prototipo TRL23. **B.** TRL15 con grapa insaturada  $i, i+7$  en posiciones 4 y 11 abarcando dos pasos de vuelta y TRL18 con grapa insaturada  $i, i+4$  en posiciones 4 y 8 abarcando un paso de vuelta.

La simulación de todos los péptidos grapados mostró un incremento en el grado de helicidad predicha para cada uno de los residuos con respecto a TRL23, encontrándose diferencias significativas dependiendo de la posición y de la longitud de las grapas hidrocarbonadas (**271**).

En general, el sistema  $i, i+7$  es más estabilizador que el  $i, i+4$  en términos absolutos de helicidad. Entre las posibles grapas  $i, i+7$  el cierre entre las posiciones 4 y 11 muestra el valor más alto de helicidad en el extremo N terminal, alcanzando unos valores absolutos cercanos

al 50%. Por otra parte, el cierre entre las posiciones 4 y 8 de las grapas  $i, i+4$  muestra el grado más alto de estabilización helicoidal hacia el extremo carboxilo terminal (271).

Tras estos resultados se decidió entonces sintetizar el cierre hidrocarbonado en todas las posiciones descritas: i)  $i, i+7$  en las posiciones 4 y 11, generando así TRL15 en la versión insaturada de la grapa y TRL16 en su versión saturada y ii)  $i, i+4$  en las posiciones 4 y 8, generando así TRL18 en la versión insaturada y TRL19 en su versión saturada (Figura 4.36 B).

#### 4.6.2.2 Efecto de los puentes hidrocarbonados en los péptidos derivados de TRL23 (E2) sobre la dimerización de TryR.

Evaluamos los efectos de los diversos péptidos grapados en sus versiones saturadas e insaturadas utilizando nuestro ensayo de actividad y de dimerización utilizando como referencia el péptido prototipo TRL23. En contra de lo pronosticado, estos estudios revelaron que la presencia de las grapas disminuye drásticamente la actividad de estos péptidos en el ensayo de dimerización (Tabla 4.3).

En el caso de los ensayos de actividad, solo aquellos con cierre en las posiciones  $i, i + 4$ , tanto en el caso de las grapas saturadas como en las insaturadas, tienen un leve efecto inhibitorio sobre la TryR pero solo a las concentraciones más altas evaluadas (75  $\mu\text{M}$ ), lo que dificulta el cálculo de una  $\text{CI}_{50}$  fiable. Por lo tanto, todos los derivados grapados de TRL23 muestran menor capacidad inhibitoria que el péptido prototipo lineal.

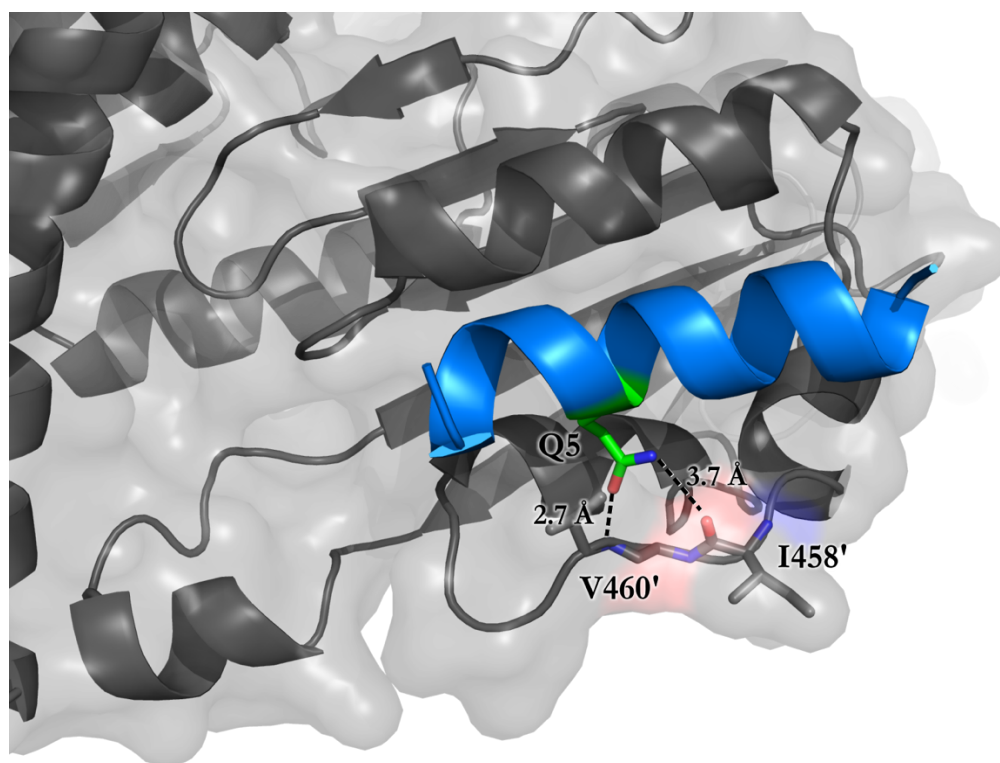
| Péptido | Secuencia  | Tipo de cierre                    | $\text{CI}_{50}$ Dimerización [ $\mu\text{M}$ ] |
|---------|--|-----------------------------------|---|
| TRL23   | PEIIQSVGISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>                   | Lineal                            | 33.6 $\pm$ 3.3                                  |
| TRL15   | PEI <b>A</b> QSVGIS <b>A</b> KN <sub>LE</sub>                | Hidrocarbonado<br>$i, i+7$ (4,11) | >75   |
| TRL16   | PEI <b>A</b> QSVGIS <b>A</b> KN <sub>LE</sub>                | Hidrocarbonado<br>$i, i+7$ (4,11) | >75   |
| TRL18   | PEI <b>A</b> QSV <b>A</b> ISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | Hidrocarbonado<br>$i, i+4$ (4, 8) | >75   |
| TRL19   | PEI <b>A</b> QSV <b>A</b> ISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | Hidrocarbonado<br>$i, i+4$ (4, 8) | >75   |

**Tabla 4.3** | Actividades del péptido prototipo TRL23 y los péptidos conformacionalmente restringidos sobre la dimerización de TryR. En las secuencias, las letras en negrita hacen referencia a los sitios de unión de las grapas y la línea en zigzag, a la ciclación.

Es importante tener en consideración que como TRL23 (E2) es menos potente que TRL35 (K2), tanto en actividad como en dimerización (**Figura 4.20**), era de esperar que los péptidos grapados derivados de TRL35 tuvieran un comportamiento mejor en lo que respecta a la inhibición de la actividad y disminución de las especies diméricas de TryR.

#### 4.6.2.3 Estudios de RMN y Dinámica Molecular.

Con miras a elucidar si las grasas podrían tener un efecto en la conformación de los péptidos, se estudió la estructura de estos en solución por espectroscopia de NMR en 1D y 2D, llegándose a la conclusión de que el péptido TRL18 tienen una helicidad del 71 % y, además, presenta una correcta estructuración de los residuos que interaccionarían con la subunidad de TryR (271).



**Figura 4.37 | Interacción del TRL23 con una subunidad de TryR.** Las líneas discontinuas representan las distancias entre la cadena lateral de la glutamina 5 (verde) del péptido (azul) y la isoleucina 458 y la valina 460 de la subunidad de TryR (gris).

Al calcular las trayectorias de dinámica molecular de la interacción de los péptidos con el monómero de TryR se observó que la grapa hidrocarbonada de TRL18 perturba las

interacciones observadas entre la Q5 de TRL23 y tanto la V460' como la I458' (**Figura 4.37**).

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos de escaneo de alaninas (**Figura 4.26**), que ponen de manifiesto la importancia de la interacción de la glutamina 5 (Q5) con la interfaz de dimerización de los monómeros de TryR, la perturbación mostrada en las trayectorias de dinámica molecular para este residuo aporta una explicación racional para la pérdida de potencia de este péptido en los ensayos de dimerización. Esta perturbación es común a todos los péptidos hidrocarbonados derivados de TRL23 estudiados, lo que explicaría el pobre comportamiento de todos ellos como inhibidores de dimerización. Además, los estudios de dinámica molecular revelaron que la introducción de los puentes hidrocarbonados en TRL15 y TRL18 da como resultado una disminución del 30% en la energía de unión del péptido al monómero con respecto al péptido prototipo lineal.

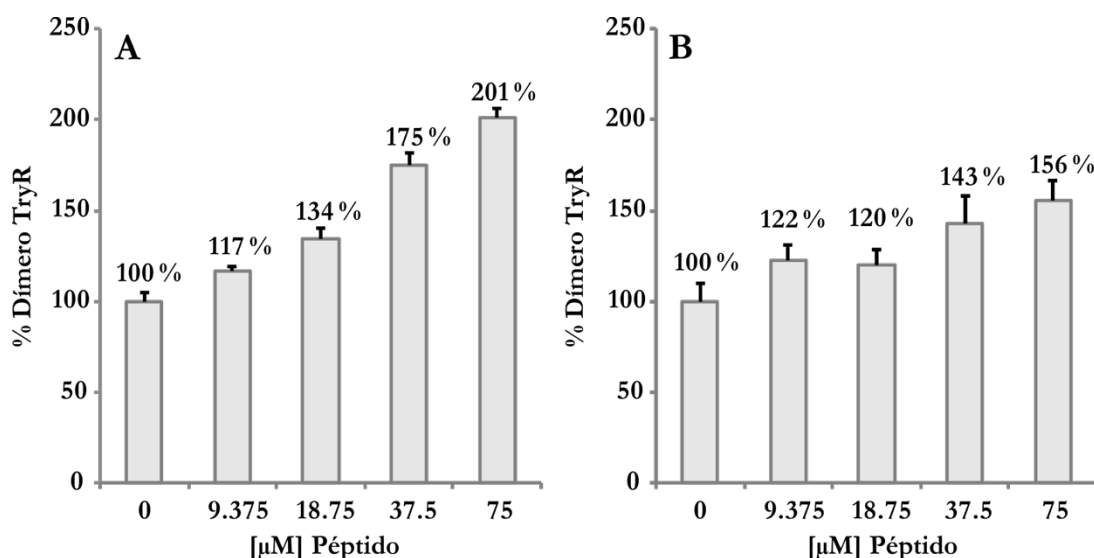
Una inspección visual de las trayectorias de dinámica molecular de los péptidos hidrocarbonados reveló también que, una vez unidos a los monómeros, los péptidos grapados no mantienen la helicidad ni en el extremo amino ni en el extremo carboxilo terminal.

#### ***4.6.2.4 Efecto de los puentes hidrocarbonados en los péptidos derivados de TRL35 (K2) sobre la dimerización de TryR.***

Como habíamos mencionado anteriormente, TRL35 tiene más potencia que TRL23 en lo que respecta a la inhibición y a la desestabilización del dímero de TryR. Este hecho, unido al mal comportamiento de los derivados del TRL23 (E2) en los ensayos de actividad, de dimerización y en los estudios de RMN y dinámica molecular, nos indujo a sintetizar una nueva serie de péptidos grapados derivados de TRL35 (K2) en configuración  $i, i + 4$  y ciclados en las posiciones 3-7 (TRL83) y 4-8 (TRL138).

Comparados con TRL15 y TRL18 (E2), tanto TRL83 como TRL138 (K2) presentan actividades mejoradas en el ensayo enzimático, pudiéndose calcular unas  $CI_{50}$  de 7.2  $\mu$ M y 7.4  $\mu$ M respectivamente. Por el contrario, y de forma inicialmente sorprendente, como se puede observar en la **Figura 4.38**, ambos se comportan como estabilizadores del dímero de TryR tras 16 horas de incubación.





**Figura 4.38** | Estabilización del dímero de TryR por parte de los péptidos grapados derivados de TRL35 **A.** TRL84, *i, i+4* posiciones 3 -7 y **B.** TRL138, *i, i+4* posiciones 4 -8.

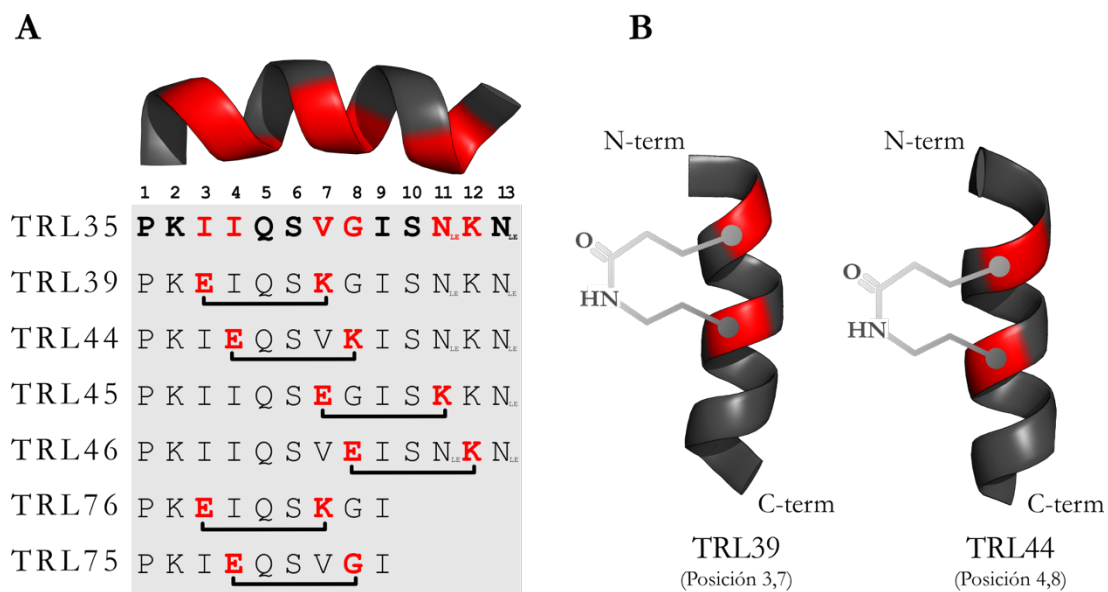
Además de la evaluación de los péptidos grapados, también evaluamos la potencia inhibitoria de sus precursores lineales antes de la ciclación de los grupos alqueno (TRL109 en posición 3-7 y TRL137 en posición 4-8). Ambos péptidos presentan un deterioro en su potencia inhibitoria en el ensayo de actividad frente a su contraparte grapada. En el ensayo de dimerización, aunque no de manera tan pronunciada como en el caso de TRL83 y TRL138, TRL109 y TRL137 también tienen un efecto estabilizador del dímero de TryR (**Tabla 4.4**).

| Péptido       | Secuencia   | CI <sub>50</sub> Actividad [μM] | CI <sub>50</sub> Dimerización [μM] |
|---------------|---|---------------------------------|------------------------------------|
| <b>TRL35</b>  | PKIIQSVGISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>                            | 1.4 ± 0.2                       | 15.7 ± 1.1                         |
| <b>TRL109</b> | PK <b>A</b> IQ <b>S</b> AGISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>          | 35.4 ± 3.1                      | Estabilizador                      |
| <b>TRL137</b> | PKI <b>A</b> Q <b>S</b> V <b>A</b> ISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | 14.2 ± 1.7                      | Estabilizador                      |
| <b>TRL83</b>  | PK <b>A</b> IQ <b>S</b> <b>A</b> GISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>  | 7.2 ± 0.4                       | Estabilizador                      |
| <b>TRL138</b> | PKI <b>A</b> Q <b>S</b> V <b>A</b> ISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | 7.4 ± 0.7                       | Estabilizador                      |
| <b>TRL106</b> | PK <b>A</b> I <b>A</b> S <b>A</b> GISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | >75                             | >75                                |

**Tabla 4.4** | Actividad inhibitoria enzimática y disruptiva de dimerización de los precursores lineales y péptidos grapados derivados de TRL35. En negrita se muestran las posiciones en las que aminoácidos no naturales con cadenas laterales de grupos alqueno sustituyen a los aminoácidos naturales. La línea en zigzag hace referencia a la existencia de la ciclación.

Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la dinámica molecular, que ponen de manifiesto la importancia de la Q5 en la interacción entre el péptido y la subunidad de TryR, se diseñó y sintetizó un péptido grapado  $i, i + 4$  en posiciones 3-7, análogo al TRL83, que cuenta con una sustitución de la glutamina 5 por una alanina (TRL106). Como era de esperar, este cambio es deletéreo tanto en la potencia inhibitoria del péptido en el ensayo de actividad como en su capacidad de desestabilizar el dímero de TryR (Tabla 4.4).

#### 4.6.3 Puentes Lactama



**Figura 4.39** | Péptidos con cierre covalente lactama. **A.** Posiciones ciclables (rojo) en la cara opuesta a la que interactúa con el monómero de TryR y su ubicación con respecto al péptido prototipo TRL35. **B.** Péptidos TRL39 y TRL44 conformacionalmente restringidos con el puente lactama en posiciones 3-7 y 4-8 respectivamente.

Aunque la estabilización de TRL23 y TRL35 mediante grapas no fue muy prometedora en lo referente a la capacidad del péptido para inhibir la actividad y disminuir las especies de dímero de TryR, la restricción estructural sí mostró un efecto positivo en la preservación de la estructura helicoidal de los péptidos. Por lo anterior, aplicando el *know-how* adquirido en los apartados anteriores exploramos una estrategia similar utilizando en este caso puentes lactama. Para ello se preparó una batería de péptidos conformacionalmente restringidos de tipo lactama  $i, i + 4$  basados en TRL35 (K2). Brevemente, los cierres covalentes tipo lactama se realizan mediante la creación de puentes amida entre las cadenas laterales de los residuos de ácido glutámico o ácido aspártico y lisina. De igual forma que con los péptidos grapados,

se realizaron los cierres tipo  $i, i+4$  en la cara del péptido que no interacciona con el monómero, haciendo un reemplazo previo en las posiciones de interés por ácido glutámico y lisina (**Figura 4.39 A**).

Se sintetizaron 4 péptidos (TRL39, TRL44, TRL45 y TRL46) que abarcan todas las posiciones posibles de ciclación con configuración  $i, i + 4$ . De la misma manera, se sintetizaron dos variantes de ciclación del nonámero (*9-mer*) TRL38 (TRL75 y TRL76) que se corresponde a la secuencia mínima de péptido que conserva potencial inhibitorio en actividad y dimerización.

#### 4.6.3.1 Efecto de los puentes lactama en los péptidos derivados de TRL35 (K2) sobre la Actividad y Dimerización de TryR

De los 4 *13-meros* con cierres  $i, i+4$  tipo lactama que fueron sintetizados, TRL39 (cierre 3, 7), TRL44 (cierre 4, 8) y TRL46 (cierre 8, 12) muestran una mejora en su capacidad para perturbar las especies diméricas de TryR en comparación con su contraparte lineal. En el caso de los ensayos de actividad, sin embargo, no muestran una mejora sustancial. Con respecto a TRL45 (cierre 7, 11), se observa una pérdida tanto de su potencia inhibitoria en actividad como en dimerización (**Tabla 4.5**).

Por otra parte, los péptidos cortos estructuralmente restringidos derivados de TRL38 y que fueron ciclados en las posiciones 3, 7 (TRL76) y 4, 8 (TRL75) dieron resultados negativos tanto en actividad como en disrupción de la dimerización.

| Péptido      | Secuencia   | CI <sub>50</sub> Actividad [μM] | CI <sub>50</sub> Dimerización [μM] |
|--------------|---|---------------------------------|------------------------------------|
| <b>TRL35</b> | PKIIQSVGISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>                            | 1.4 ± 0.2                       | 15.7 ± 1.1                         |
| <b>TRL39</b> | PK <b>E</b> IQ <b>S</b> KGISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>          | 1.2 ± 0.1                       | 12.5 ± 2.4                         |
| <b>TRL44</b> | PKI <b>E</b> Q <b>S</b> V <b>K</b> ISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | 7.9 ± 1.4                       | 4.6 ± 0.2                          |
| <b>TRL45</b> | PKIIQ <b>S</b> <b>E</b> G <b>I</b> S <b>K</b> KN <sub>LE</sub>        | >75                             | >75                                |
| <b>TRL46</b> | PKIIQSV <b>E</b> ISN <sub>LE</sub> <b>K</b> N <sub>LE</sub>           | 26.7 ± 5.9                      | 13.0 ± 0.3                         |
| <b>TRL38</b> | PKIIQSVGI   | 3.6 ± 0.4                       | 23.4 ± 0.6                         |
| <b>TRL76</b> | PK <b>E</b> IQ <b>S</b> KGI   | >75                             | >75                                |
| <b>TRL75</b> | PKI <b>E</b> Q <b>S</b> V <b>K</b> I                                  | >75                             | >75                                |

**Tabla 4.5** | Actividad como inhibidores y disruptores de dimerización de los péptidos con cierre lactama derivados de TRL35 y TRL38. En negrita se muestran las posiciones cambiadas por ácido glutámico y lisina para generar el cierre, que está representado por la línea en zigzag.

#### 4.6.3.2 Efecto del puente lactama en un péptido derivado de TRL23 (E2) sobre la Actividad y Dimerización de TryR

Observando los resultados prometedores obtenidos con el cierre tipo lactama en los péptidos derivados de TRL35 (K2), decidimos realizar una prueba con un péptido derivado de TRL23 (E2) y un cierre tipo lactama  $i, i+4$  entre las posiciones 4 y 8, que fueron las posiciones de ciclación menos deletéreas en el ensayo de dimerización. El resultado fue el péptido TRL104. De igual manera que sus contrapartes con puentes hidrocarbonados, TRL104 presenta una leve capacidad de inhibir la actividad enzimática de TryR que se manifiesta solo a las concentraciones más altas (75  $\mu\text{M}$ ). En cuanto a dimerización, TRL104 mostró un valor de  $\text{CI}_{50}$  de 24.8  $\mu\text{M}$  ligeramente mejor que su contraparte lineal TRL23 (33.6  $\mu\text{M}$ ) (**Tabla 4.6**).

| Péptido       | Secuencia  | Tipo de cierre             | $\text{CI}_{50}$<br>Dimerización [ $\mu\text{M}$ ] |
|---------------|--|----------------------------|--|
| <b>TRL23</b>  | PEIIQSVGISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub>                   | Lineal                     | 33.6 $\pm$ 3.3                                     |
| <b>TRL104</b> | PEI <b>E</b> QSV <b>K</b> ISN <sub>LE</sub> KN <sub>LE</sub> | Lactama<br>$i, i+4$ (4, 8) | 24.8 $\pm$ 0.4                                     |

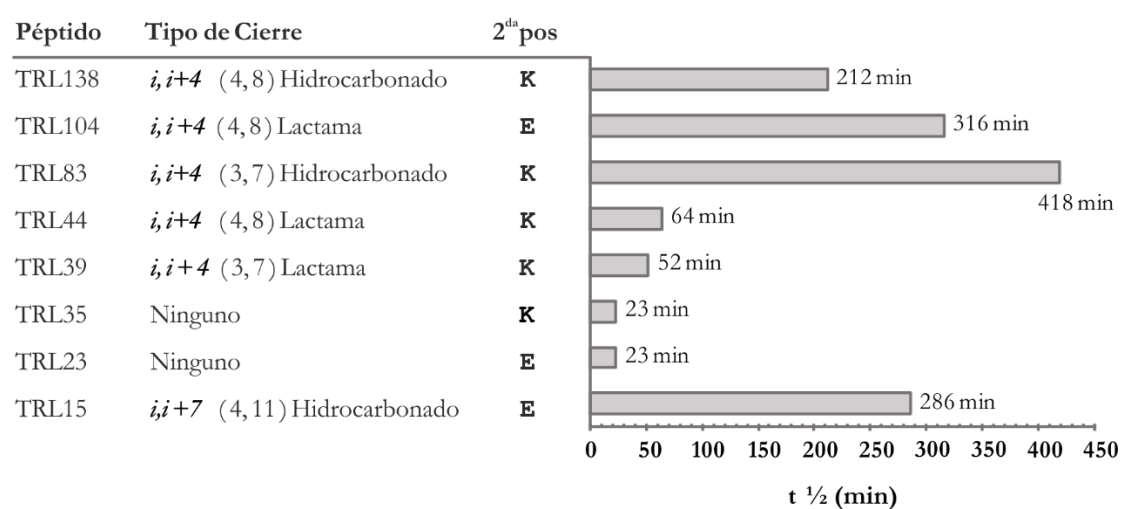
**Tabla 4.6** | Actividad del péptido TRL104 en el ensayo de dimerización. En negrita se muestran las posiciones cambiadas por los aminoácidos no naturales con cadenas laterales de grupos alqueno. El cierre se representa mediante la línea en zigzag.

#### 4.6.4 Estabilidad proteolítica de los péptidos cíclicos

La degradación por proteasas es una de las vías para la inactivación de péptidos en el contexto biológico. Debido a que las proteasas se unen preferente a sus sustratos cuando estos se encuentran en una conformación lineal, es de esperar que la conservación de la forma de hélice proporcione a los péptidos una resistencia a la proteólisis. Además, la presencia de los puentes tanto hidrocarbonados como de lactama tendría un efecto estérico que afectaría al acceso de la proteasa a los enlaces peptídicos. Para determinar si existe un incremento en la resistencia frente a proteasas de las variantes de TRL23 y TRL35 con conformación restringida, los péptidos se sometieron a una digestión en presencia de proteinasa K (serín-proteasa de amplio espectro), haciendo un seguimiento de la hidrólisis del péptido mediante HPLC (**241**).

El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de los péptidos lineales TRL23 y TRL35 en presencia de la proteinasa K es de 23 minutos, mientras que sus variantes hidrocarbonadas TRL15 y TRL138

presentan una  $t_{1/2}$  de 286 y 212 minutos, respectivamente. En el caso de los péptidos con puentes lactama, tanto en los derivados de TRL23 (E2) como de TRL35 (K2) se observó un aumento de la  $t_{1/2}$ , alcanzándose valores que oscilan entre 52 y 316 min. El péptido más resistente a la degradación proteolítica fue TRL83, que es un derivado hidrocarbonado de TRL35 con un cierre insaturado entre las posiciones 3 y 7 (**Figura 4.40**). En todos los casos evaluados, la inclusión bien de una grapa o bien de un puente lactama significó un aumento de la  $t_{1/2}$  de más del doble frente a proteinasa K comparado con los péptidos lineales, lo que nos indica una mejoría de estos péptidos en lo referente a su estabilidad metabólica y, por tanto, sus propiedades farmacocinéticas.



**Figura 4.40** | Semivida ( $t_{1/2}$ ) de los péptidos lineales y de sus contrapartes estructuralmente restringidas, ya sea por grapas hidrocarbonadas o por puentes lactama. En todos los casos la presencia de la restricción estructural incidió en la resistencia de los péptidos a la degradación por la Proteínasa K.

Aunque la tecnología de restricción conformacional de los péptidos con enlaces hidrocarbonados es una herramienta efectiva que busca mejorar la afinidad de los péptidos con hélices  $\alpha$  por sus dianas, la naturaleza hidrófoba de las grapas puede ser la responsable del comportamiento diferencial entre la aproximación de cierres hidrocarbonados y los puentes lactama. Además, hay reportes en los cuales se demuestra que la ciclación modifica las interacciones intramoleculares entre las cadenas laterales y reduce la flexibilidad de los péptidos grapados, previniendo la adopción de la conformación necesaria para una unión eficiente a la diana. De esta forma, nuestros estudios teóricos y experimentales complementan estas observaciones al demostrar que el grapado de los péptidos genera un

incremento en los valores de helicidad que no se traduce en un aumento de la afinidad del péptido por la proteína de interés.

Además, es importante resaltar que incluso cuando se utilizan las mismas posiciones de ciclación, la naturaleza del enlace (grapa hidrocarbonada vs puente lactama) tiene un impacto muy relevante sobre la potencia de los péptidos como disruptores de la dimerización de TryR.

## 4.7 Definición de un farmacóforo basado en TRL38.

Por definición, un farmacóforo es el conjunto de características electrónicas y estéricas que son necesarias en una molécula para asegurar una interacción supramolecular óptima con una diana biológica específica, desencadenando (o bloqueando) en consecuencia la respuesta biológica evocada por la misma.

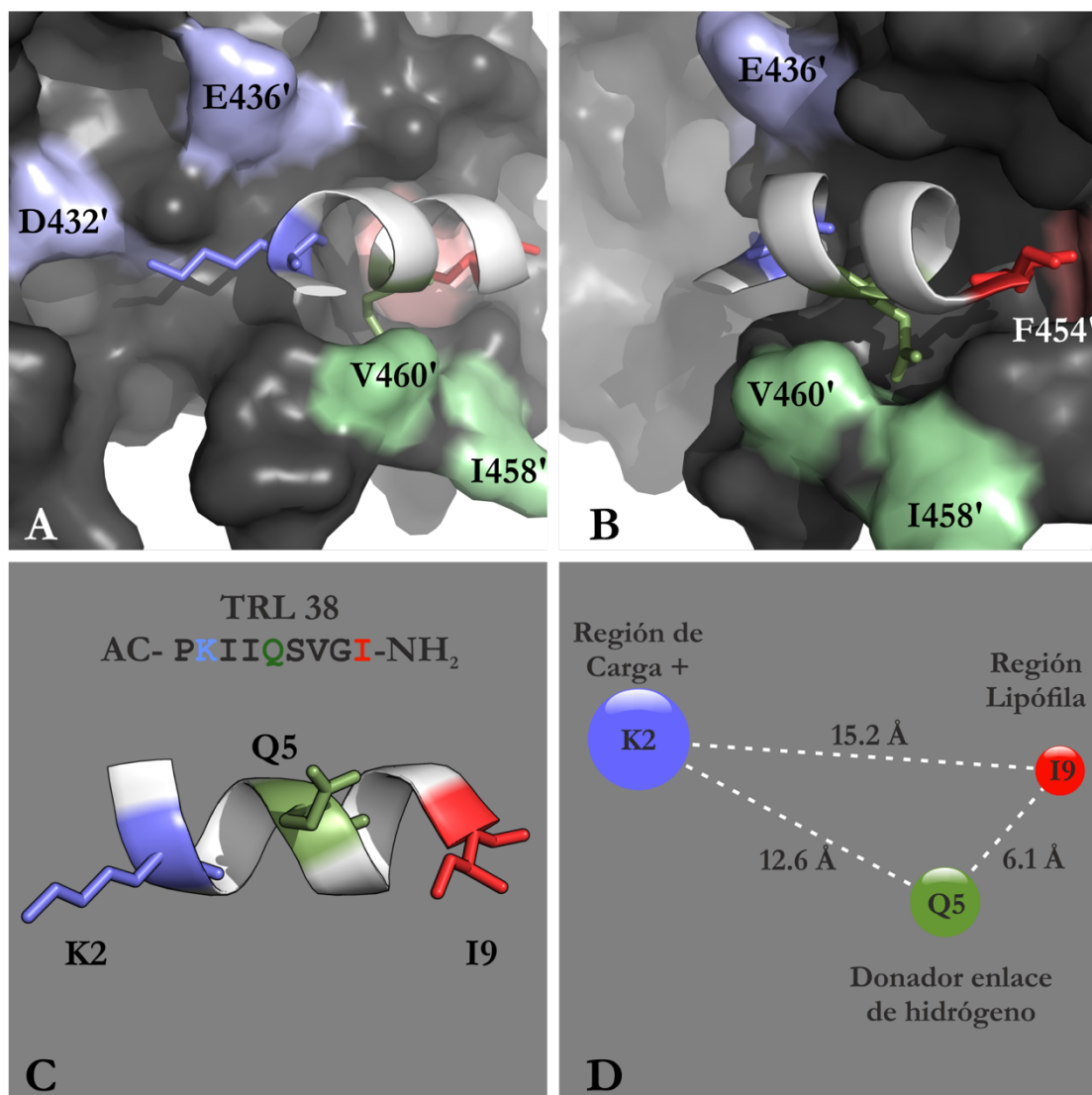
Con el fin de obtener un modelo farmacofórico de la interacción de los péptidos inhibitorios con la TryR, se tuvieron en cuenta los siguientes resultados experimentales:

- El cambio E2K en el péptido 3 (TRL14) aumenta su potencia inhibitoria (**Figura 4.20**).
- El *scanning* de alanina muestra la gran relevancia que presenta el residuo Q5 en la potencia del péptido (**Figura 4.26**).
- El estudio de los péptidos truncados demuestra la necesidad de que la isoleucina 9 (I9) esté presente en el péptido (TRL38) (**Figura 4.27**).

Con estos datos nuestro grupo desarrolló un modelo de farmacóforo para definir de forma simplificada la interacción entre TRL38 y el monómero de TryR (**Figura 4.41 A**). Este modelo describe 3 interacciones importantes: i) una interacción electrostática entre la cadena lateral de K2 y los carboxilatos del residuo clave E436' y el D432' del monómero; ii) un bolsillo donde se ubica la cadena lateral de Q5, que interacciona mediante enlaces de hidrógeno con el esqueleto polipeptídico de I458' y V460' (**Figura 4.41 A-B**); iii) una interacción hidrófoba entre I9 y F454'. Los residuos Q5 e I9 se encuentran a una distancia de 6.1 Å, mientras que K2 está a 12 Å de Q5 y a 15.2 Å de I9 (**Figura 4.41 D**).

### 4.7.1 Uso del Farmacóforo para la Identificación de Moléculas Pequeñas con Capacidad Inhibitoria de TryR

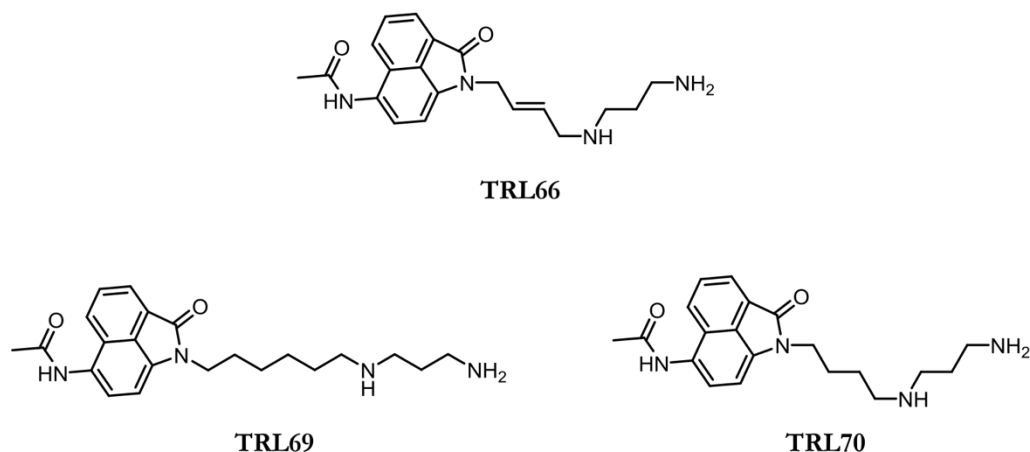
Una vez establecidos los residuos clave para la interacción entre el péptido inhibidor y la TryR (K2, G5 e I9), se realizó un cribado virtual empleando el programa CRDOCK implementado en la plataforma VSDMIP (272).



**Figura 4.41** | Modelo de interacción de TRL38 con la interfaz de dimerización de un monómero de TryR y modelo de farmacóforo. **A.** Vista de la interacción de la región amino-terminal de TRL38 con la interfaz de dimerización de un monómero de TryR. En azul K2 que interacciona con D432' o E436' de TryR; en verde Q5 que interacciona con I458' y V460', **B.** Otra vista de la misma interacción en el que se muestra el extremo carboxilo del TRL38 y la interacción de I9 con F454' de TryR. **C.** Secuencia y estructura de TRL38. Se muestran las cadenas laterales de los residuos de interés K2, Q5 e I9., **D.** Modelo de farmacóforo propuesto.

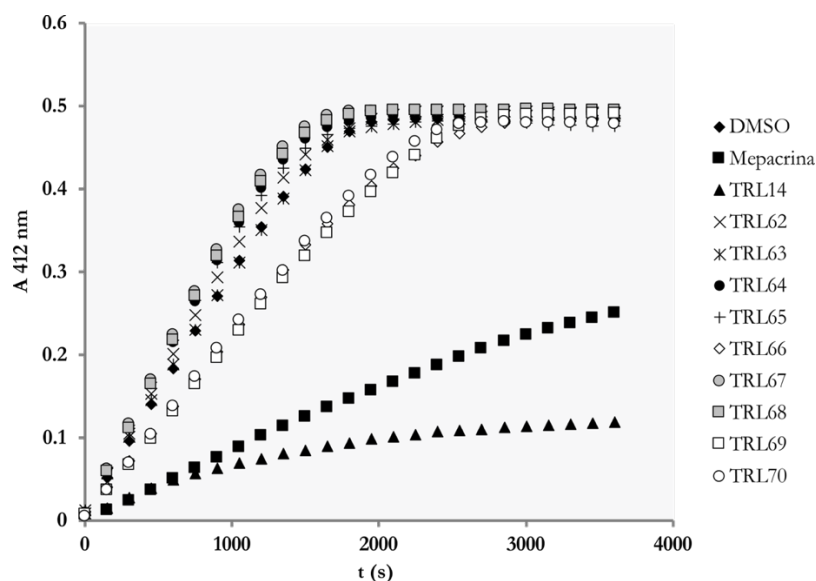
El cribado virtual se realizó a partir de >200 000 moléculas pertenecientes a la base de datos del *National Cancer Institute* (NCI) y del Instituto de Química Médica (IQM) del CSIC. Se obtuvieron unas 100 moléculas cuyas poses de *docking* fueron inspeccionadas visualmente, eligiéndose 17 moléculas para su estudio biológico, 5 procedentes del NCI y 12 del IQM.





**Figura 4.42** | Moléculas pequeñas con potencial inhibitorio derivadas del cribado virtual y pertenecientes a la base de datos del IQM.

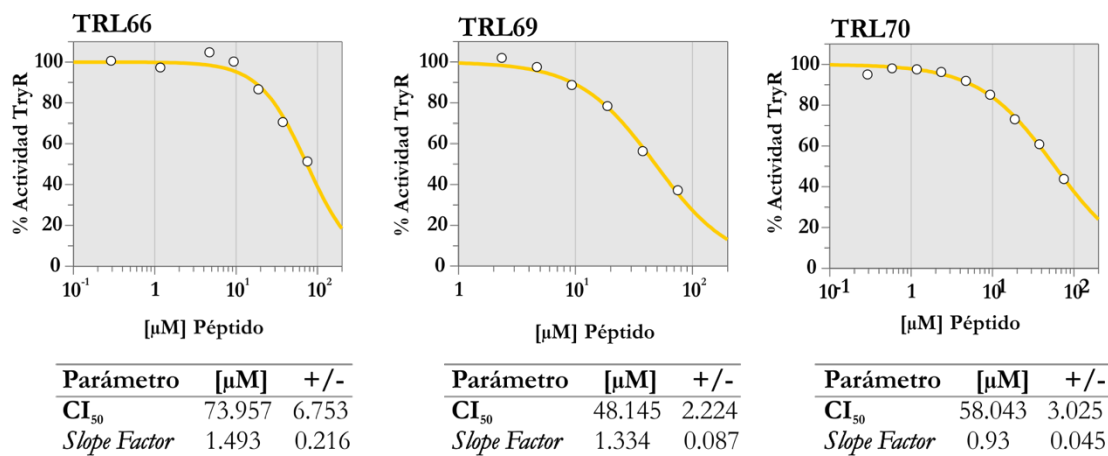
De las moléculas que eran solubles en un medio acuoso y lograron ser evaluadas a 25  $\mu\text{M}$  (**Figura 4.42**), solo TRL66, TRL69 y TRL70 mostraron actividad inhibitoria: (**Figura 4.43**), la cual fue caracterizada en mayor detalle en los ensayos enzimáticos y de dimerización.



**Figura 4.43** | Ensayo de actividad de las moléculas pequeñas seleccionadas a partir del cribado virtual. Todos los compuestos se evaluaron a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ . Además de los controles (mepacrina y TRL14), solo TRL66, TRL69 y TRL70 tienen capacidad inhibitoria de la actividad de TryR.

El ensayo enzimático (**Figura 4.44**) reveló que TRL69 es la molécula que presenta la mayor actividad inhibitoria, si bien su valor de  $\text{CI}_{50}$  es todavía muy superior al del péptido prototipo. A pesar de las diferencias, estos resultados avalan la estrategia de uso del farmacóforo

definido como base para un cribado virtual y constituyen un pequeño paso en la dirección correcta hacia la síntesis de moléculas de naturaleza no peptídica con actividad leishmanicida diseñadas de manera racional.



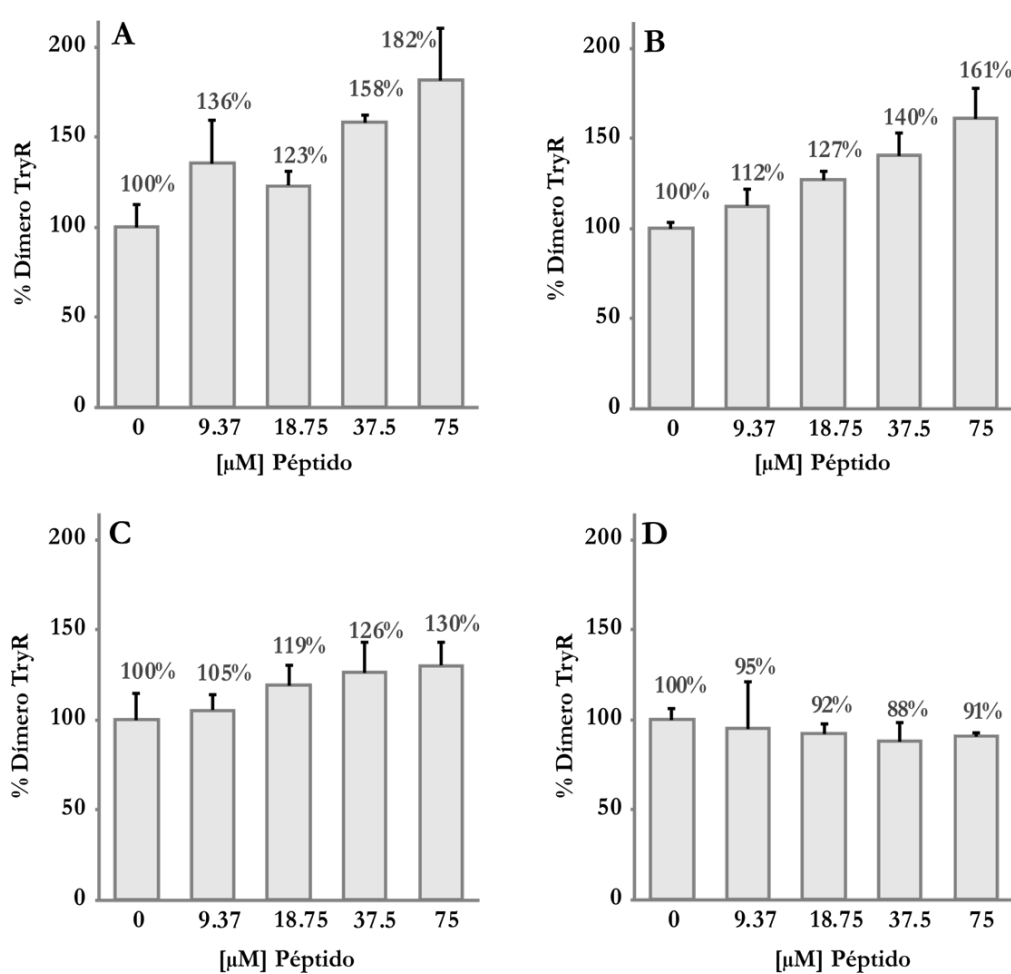
**Figura 4.44** | Actividad inhibitoria de TryR de TRL 66, TRL69 y TRL70.

Con respecto a los ensayos de dimerización (**Figura 4.45**), los resultados obtenidos no se corresponden con lo esperado. De manera sorprendente, un aumento de las concentraciones de estos compuestos se asocia a un aumento en las tasas de dimerización (**Figura 4.45 A, B y C**)

Para entender este resultado hay que tener en cuenta que las enzimas, tras ser diluidas e incubadas por periodos de tiempo prolongados, van perdiendo actividad de manera paulatina. En nuestro laboratorio hemos comprobado que la incubación de 400 nM de TryR a 37 °C durante 16 horas conlleva una pérdida de entre el 40 y el 45% de actividad, lo que se puede extrapolar a una pérdida de más del 40% de la forma dimérica. Tras la incubación con TRL66, 69 y 70 se muestra un aumento en la presencia de dímero de hasta un 160, 130 y 182% respectivamente (**Figura 4.45**), lo que nos lleva a pensar que estas moléculas se comportan como potentes estabilizadores de la TryR dimérica, dificultando la disociación natural de dímeros a monómeros que sufre la enzima tras ser diluida e incubada. Es de destacar que, en su presencia, se obtienen valores superiores al 100% de dímero con respecto al control en ausencia de tratamiento.

Este resultado, a pesar de ser difícil de interpretar *a priori*, sugiere que nuestras moléculas pueden establecer interacción con ambas subunidades de TryR, aunque dichas interacciones no necesariamente estén localizadas en la interfaz de dimerización objeto de nuestro estudio.

En nuestro modelo de inhibición de la actividad y desestabilización del dímero, el péptido se asocia con la interfaz de dimerización de una de las subunidades impidiendo su unión con la otra. Por este motivo sospechamos que el efecto de inhibición de estas moléculas no peptídicas podría deberse a una interacción en el sitio activo de la enzima, constituido por residuos procedentes de ambas subunidades, en lugar del inicialmente propuesto en la interfaz. Para evaluar nuestra hipótesis, realizamos un ensayo de dimerización usando TRL69 y, como competidor por el sitio activo, mepacrina. Como se observa en la **Figura 4.45 D**, al añadir mepacrina al ensayo de dimerización el efecto de estabilización de TRL69 desaparece, lo que apoya la hipótesis de que estas moléculas se ubican en el sitio activo de la enzima.



**Figura 4.45** | Ensayo de dimerización de TryR tras la incubación por 16 horas con diferentes concentraciones (9.4 μM – 75 μM) de **A.** TRL66, **B.** TRL69 y **C.** TRL70. **D.** Ensayo de competición entre TRL69 (9.4 μM – 75 μM) y mepacrina (75 μM).

## 4.8 Comparación de los Sistemas T(SH)<sub>2</sub>/TryR y GSH/GluR

### 4.8.1 Antecedentes

En la búsqueda de dianas terapéuticas en enfermedades infecciosas es ideal seleccionar aquellas que no tengan un equivalente en el ser humano. Para esto se identifican rutas metabólicas que estén presente en el parásito, pero no en el hospedador y se seleccionan proteínas que formen parte de las mismas, evaluando si el efecto de silenciar una de ellas es deletéreo para los parásitos.

El control adecuado del estrés oxidativo es central para todas las células aerobias. En el caso de los tripanosomátidos como *Leishmania spp*, el sistema es diferente al encontrado en otros organismos eucariotas como los seres humanos. En estos últimos, los sistemas glutatión/glutatión reductasa (GSH/GluR) y tioredoxina/tioredoxina reductasa son los encargados de la destoxificación de las especies oxidantes generadas durante la respiración aerobia, mientras que en *Leishmania* el sistema encargado del mantenimiento del equilibrio oxidoreductor en la célula es el sistema tripanotión/tripanotión reductasa (T(SH)<sub>2</sub>/TryR). Las diferentes proteínas que forman parte del metabolismo del tripanotión, tanto en su síntesis (tripanotión sintetasa), como en su reciclaje (TryR), son enzimas que solo están presentes en el parásito y cuya delección es letal para este **(101,102)**.

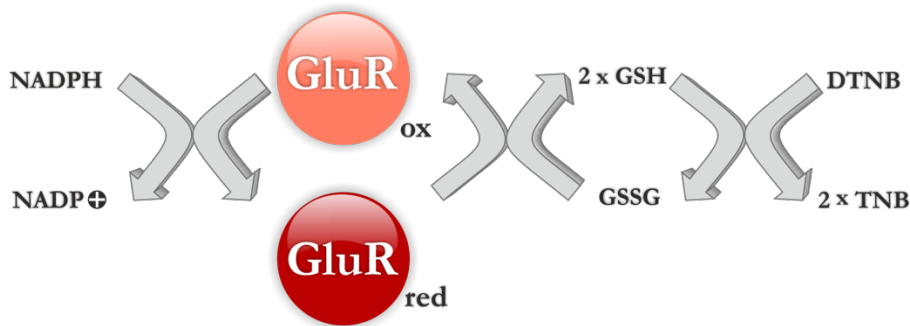
Aunque ambos sistemas son diferentes, con sustratos y enzimas distintas, la GluR y la TryR son enzimas homólogas. Por lo tanto, como progreso racional del trabajo era necesario contar con una preparación de la GluR humana sobre la cual evaluar el posible efecto de nuestros péptidos inhibitorios.

Para evaluar la actividad de la GluR humana, se adquirió un plásmido que contenía el gen *gsr* (Genebank ref: 2936). El gen fue subclonado en los plásmidos pRSET A y pET 24d>a emulando el procedimiento realizado con la TryR HF. Después de intentar expresar la GluR recombinante sin ningún éxito, decidimos eliminar la secuencia correspondiente al péptido señal y clonar de nuevo el gen tal y como ya hemos descrito. Procediendo de este modo, logramos expresar y purificar la enzima en condiciones análogas a las usadas para obtener la TryR.

Históricamente, la expresión de una GluR recombinante (tanto humana como de *Plasmodium spp*. o levadura, entre otras) se ha realizado en la cepa de *Escherichia coli* SG5(DE3) deficiente en GluR. Sin embargo, hemos podido demostrar que la GluR HF puede ser expresada y purificada de forma exitosa en la cepa comercial BL21 (DE3) Rosetta.

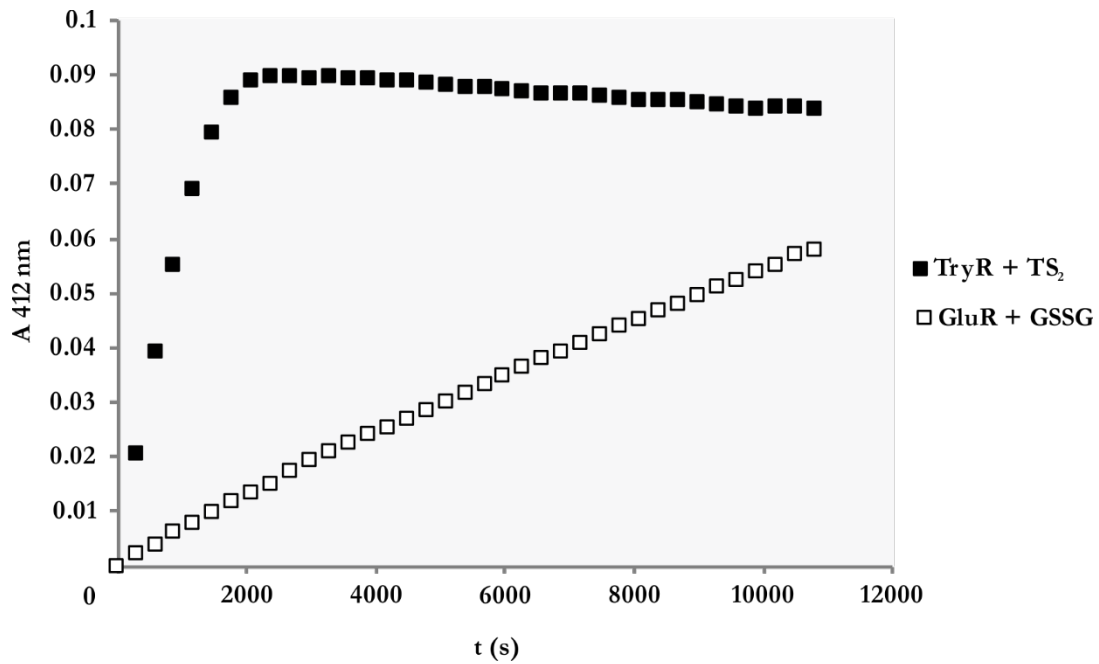
#### 4.8.2 Ensayo de Actividad Basado en DTNB

Tras la implementación del ensayo de actividad de TryR basado en la reducción del DTNB por *Hamilton et al.*, este planteó que aunque el DTNB se había utilizado para titular la reducción de GSSG por parte de la GluR en ensayos de punto final, no había mención del uso del ensayo en el seguimiento de la actividad (245). De esta manera, tras la purificación de la GluR recombinante se realizó una prueba de actividad, emulando el ensayo de actividad de la TryR basado en la reducción del DTNB ya descrito. En este ensayo, la actividad oxidoreductasa de la GluR se evidencia por la reducción del DTNB a TNB (amarillo), al reaccionar con el GSH generado durante el curso de la reacción **Figura 4.46**.



**Figura 4.46** | La GluR emplea el poder reductor del NADPH para reducir el GSSG a GSH. La oxidación posterior del GSH por el DTNB genera TNB.

Como se observa en la **Figura 4.47**, la GluR purificada en nuestro laboratorio es activa. Es destacable que, bajo las mismas condiciones experimentales de temperatura (26 °C), pH (8.0) y concentraciones molares de los diferentes componentes de la reacción enzimática (TryR o GluR (0,7 nM), DTNB (5 μM), NADPH (150 μM), TS2 o GSSG (1 μM) y HEPES 40 mM), la velocidad de la reacción es mucho mayor en el caso de la TryR.

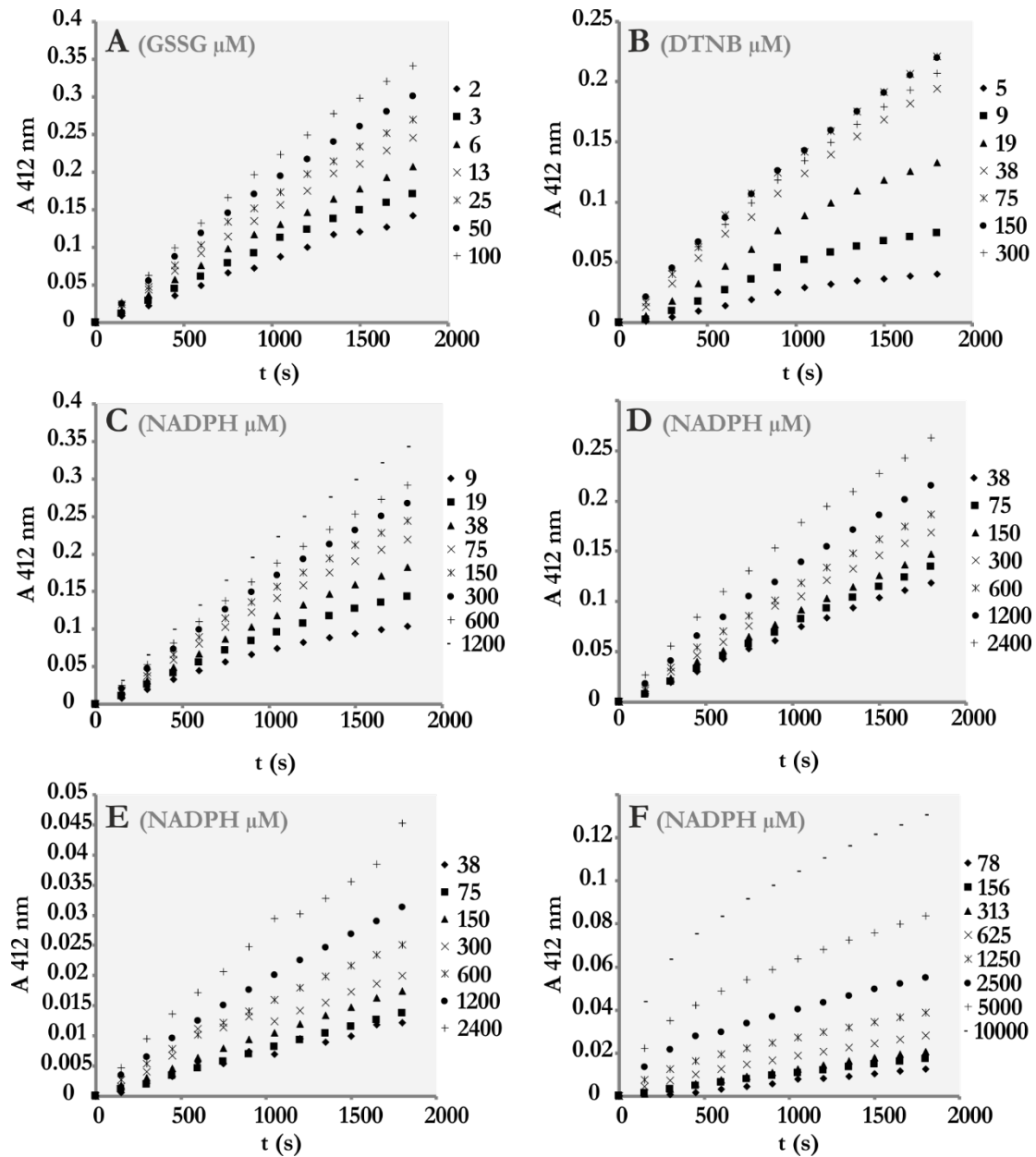


**Figura 4.47** | Actividad GluR (0.7 nM) usando el ensayo de actividad de DTNB (cuadros blancos) comparado con el ensayo usando la TryR (0.7 nM) (cuadros negros).

#### 4.8.2.1 *Saturación de GSSG y NADPH de GluR utilizando el ensayo basado en DTNB*

Debido a que la GluR utiliza dos sustratos (NADPH y GSSG) y a que su actividad se determina empleándose una reacción acoplada (DTNB), se hizo necesario determinar las concentraciones saturantes de estos reactivos para el sistema.

Basándonos en el ensayo ya establecido para la TryR y con el único fin de hallar una concentración de GSH que permitiera una medición de la reacción a lo largo del tiempo, se usaron diferentes concentraciones de GSSG (2  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) y la concentración establecida de enzima (7 nM) con un exceso molar de NADPH (300  $\mu\text{M}$ ) y de DTNB (100  $\mu\text{M}$ ), estos dos últimos a una concentración dos veces mayor que la empleada en el ensayo original de TryR.



**Figura 4.48** | Pasos para la puesta a punto del ensayo de actividad de la GluR con DTNB. **A.** Prueba de actividad con diferentes concentraciones de GSSG (2  $\mu\text{M}$ -100  $\mu\text{M}$ ) y 7nM de GluR, **B.** Prueba de saturación con diferentes concentraciones de DTNB (5  $\mu\text{M}$ -300  $\mu\text{M}$ ) y 7 nM de GluR, **C.** Prueba de saturación con diferentes concentraciones de NADPH (9-1200  $\mu\text{M}$ ) y 7 nM de GluR, **D.** Prueba de saturación con diferentes concentraciones de NADPH (38-2400  $\mu\text{M}$ ) y 3.5 nM de GluR, **E.** Prueba de saturación con diferentes concentraciones de NADPH (38-24000  $\mu\text{M}$ ) y 0.77 nM de GluR, **F.** Prueba de saturación con diferentes concentraciones de NADPH (78-10000  $\mu\text{M}$ ) y 0.7 nM de GluR.

En estas condiciones se comprobó que la velocidad de la reacción, conforme a lo esperado, es proporcional a la concentración de GSSG, estableciéndose una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de GSSG como punto de partida para continuar con el proceso de optimización del ensayo (**Figura 4.48 A**). Con objeto de poder establecer las condiciones que permiten el cálculo de

las constantes cinéticas de la enzima nos propusimos determinar el valor de las concentraciones saturantes de DTNB y NADPH. Los resultados que se muestran en la **Figura 4.48 B** indican que, a partir de 75  $\mu\text{M}$ , el sistema se encuentra aparentemente saturado de DTNB. Sin embargo, sorprendentemente, observamos un pequeño efecto adverso sobre la reacción (ligera pérdida de velocidad) al aumentar la concentración de DTNB hasta 300  $\mu\text{M}$ .

De forma similar, se buscó determinar la concentración saturante de NADPH. Inicialmente se usaron diferentes concentraciones en un intervalo comprendido entre 9  $\mu\text{M}$  y 1200  $\mu\text{M}$ . A pesar de ensayar hasta una concentración un orden de magnitud mayor que la usada en el ensayo de TryR, no conseguimos nunca alcanzar la concentración saturante (**Figura 4.48 C**). Dado que habíamos logrado el seguimiento de la actividad enzimática de 7 nM de GluR con 100  $\mu\text{M}$  de GSSG y saturarla con 75  $\mu\text{M}$  de DTNB, se decidió repetir el experimento reduciendo a la mitad (3,5  $\mu\text{M}$ ) la concentración de la enzima y llegando hasta 2 400  $\mu\text{M}$  de NADPH (**Figura 4.48 D**). De nuevo, no fue posible determinar la concentración saturante de NADPH, por lo que la concentración de enzima se redujo una vez más hasta 0,7 nM y se llegó hasta 10 000  $\mu\text{M}$  de NADPH. A pesar de usar 10 veces menos enzima y 60 veces más NADPH que en el ensayo establecido de TryR, no fue posible saturar el sistema. Resulta patente que el aumento en la concentración de NADPH siempre conduce a un aumento en la velocidad de la reacción (**Figura 4.48 E-F**).

#### **4.8.2.2 Diferencias de la reacción acoplada a DTNB entre TryR y GluR**

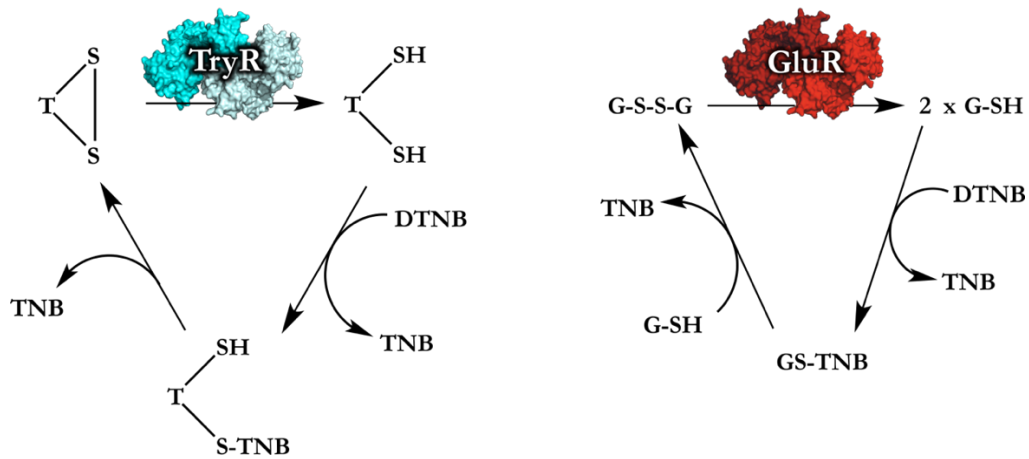
Teniendo en cuenta las diferencias estructurales entre Try y GSH (**Figura 4.49 y 4.50**), es razonable suponer que el problema de este ensayo para la determinación de la actividad radica en la formación de disulfuros mixtos GS-TNB que no llegan a ser reducidos por otra molécula de GSH. Este problema no parece existir en el caso del Try ya que ambas moléculas de GSH se encuentran unidas covalentemente y, por tanto, la reducción del disulfuro mixto por la segunda molécula de GSH es inmediata.

Esta hipótesis explicaría por qué un exceso de DTNB disminuye la velocidad de la reacción al causar una acumulación de disulfuros mixtos GS-TNB y una concomitante disminución de la concentración efectiva de GSH. El diferente comportamiento del T(SH)<sub>2</sub> y el GSH pone de manifiesto la mayor capacidad del sistema T(SH)<sub>2</sub>/TryR, de manera que la unión de las dos moléculas de GSH por un puente espermidina constituiría una adaptación de los parásitos a un entorno con alta capacidad oxidante.





conformacional en la misma que termine afectando al sitio de unión del NADPH, disminuyendo de esta manera su afinidad por el mismo. Ello justificaría por qué, incluso a concentraciones 60 veces superiores, no hemos sido capaces de alcanzar una saturación con NADPH.



**Figura 4.50** | Esquema de la reducción del tripanotión (TS<sub>2</sub>) y del glutatión (GSSG) por la tripanotión reductasa (TryR) y glutatión reductasa (GluR), respectivamente, y su relación con la reacción acoplada de DTNB.

### 4.8.3 Implementación del Ensayo Actividad de GluR por oxidación de NADPH.

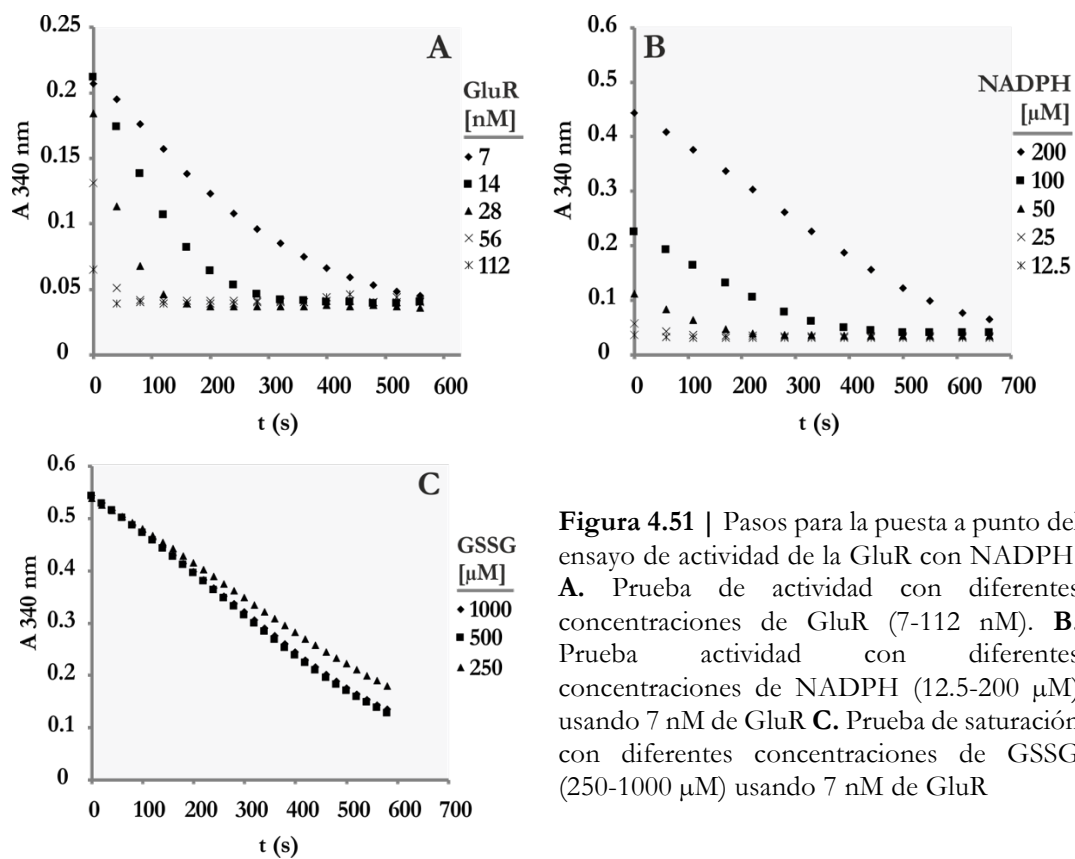
Teniendo en cuenta los problemas en la implementación del ensayo de actividad de la GluR mediante la reacción acoplada a la reducción del DTNB, decidimos tomar la aproximación clásica de *Mannervik et al.* (274) haciendo un seguimiento de la oxidación del NADPH mediante la variación de absorbancia a 340 nm. Esta metodología de monitorización de la reacción de la GluR, a pesar de haber sido desarrollada en 1975, sigue estando vigente en la actualidad y es utilizada en la identificación de inhibidores de la GluR, con apenas variaciones sobre su desarrollo original.

Brevemente, la reacción se realiza en un tampón de fosfato potásico pH 7.5 junto a EDTA, GSSG y GluR, iniciando la reacción al añadir NADPH. Ya que el seguimiento de la reacción se lleva a cabo al medir la oxidación del NADPH, variaciones en la concentración de este son fácilmente evidenciables desde el inicio del ensayo. Al comenzar esta serie de experimentos nos percatamos de que la concentración inicial de NADPH variaba entre ensayos realizados en un mismo día, lo que nos indujo a pensar que el NADPH se oxida rápidamente en este tampón. Dado que en ninguno de los experimentos realizados hasta la fecha en tampón HEPES habíamos observado este problema, decidimos sustituir el tampón fosfato por tampón HEPES.

Debido a nuestra experiencia en el ensayo de actividad de la TryR y a la observación empírica de que el NADPH concentrado (10 mM) podía ser almacenado a -20 °C en tampón HEPES 40 mM hasta 4 semanas, decidimos realizar todas las fases del ensayo en tampón HEPES, lo que condujo a un aumento de la reproducibilidad del mismo.

#### 4.8.3.1 Saturación de GSSG y NADPH de GluR utilizando el ensayo basado en NADPH

Al igual que hicimos previamente en el ensayo basado en DTNB, iniciamos la exploración de unas condiciones adecuadas para el seguimiento de la actividad GluR comprobando que el ensayo era sensible a distintas concentraciones de enzima y podía ser saturado tanto por NADPH como por GSSG (**Figura 4.51**). Este estudio nos permitió concluir que 200  $\mu$ M (A<sub>340</sub>=0.5) de NADPH (**Figura 4.51 B**) y 500  $\mu$ M de GSSG (**Figura 4.51 C**) son concentraciones saturantes para una concentración de GluR de 7 nM. Estas condiciones permiten un seguimiento de la reacción durante aproximadamente 10 minutos.

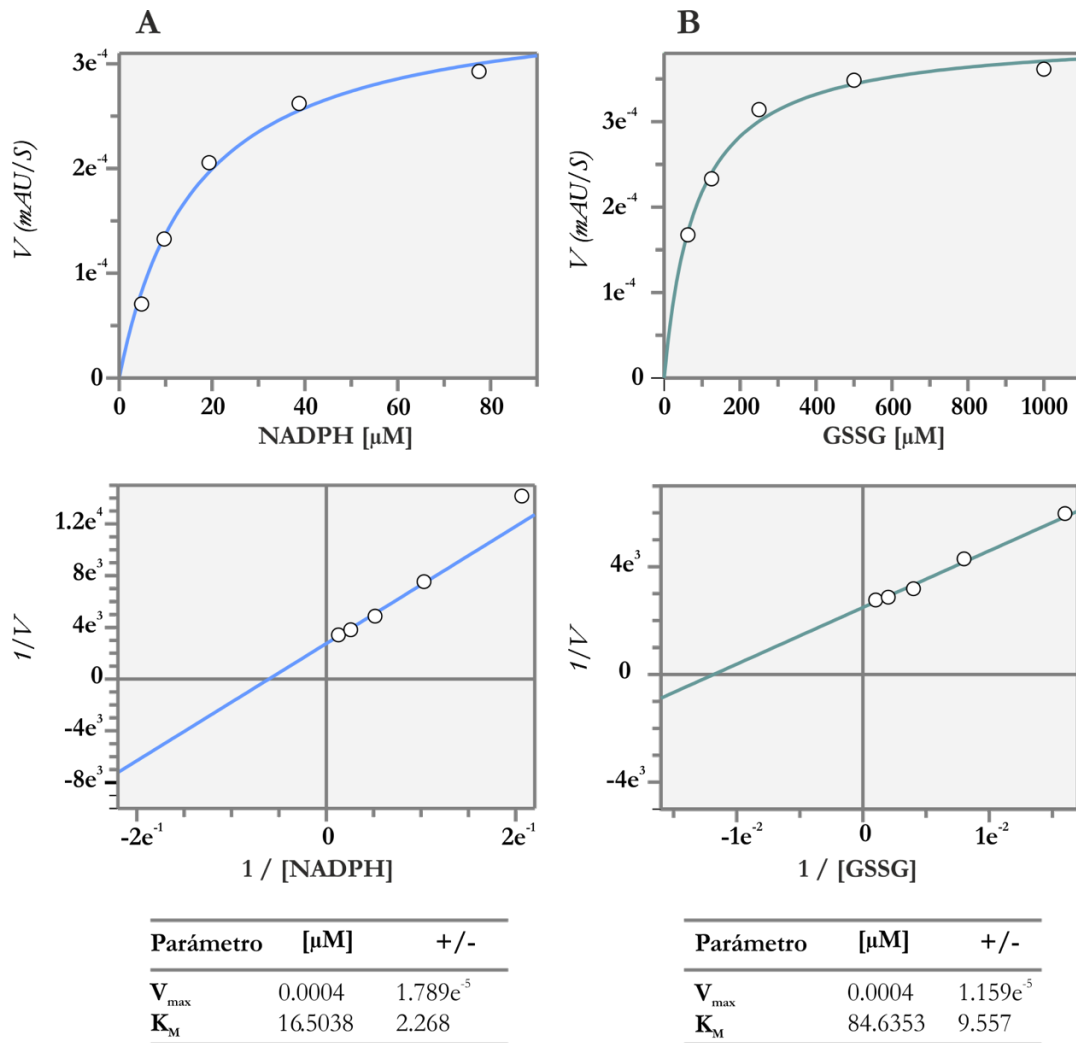


**Figura 4.51** | Pasos para la puesta a punto del ensayo de actividad de la GluR con NADPH. **A.** Prueba de actividad con diferentes concentraciones de GluR (7-112 nM). **B.** Prueba actividad con diferentes concentraciones de NADPH (12.5-200 μM) usando 7 nM de GluR **C.** Prueba de saturación con diferentes concentraciones de GSSG (250-1000 μM) usando 7 nM de GluR

#### 4.8.3.2 $K_M$ para NADPH y GSSG de la Glutación Reductasa Humana

Después de establecer las condiciones de actividad de la GluR, y con el fin de validar el ensayo, hicimos un cálculo de los valores de  $K_M$  tanto para GSSG como para NADPH.

Como se observa en la **Figura 4.52**, la  $K_M$  experimental que obtuvimos para el NADPH es 16 μM, un valor semejante a los 7 μM reportados en la literatura. Del mismo modo, el valor de  $K_M$  para el GSSG obtenido fue 84 μM, muy similar a descrito de 65 μM (275).



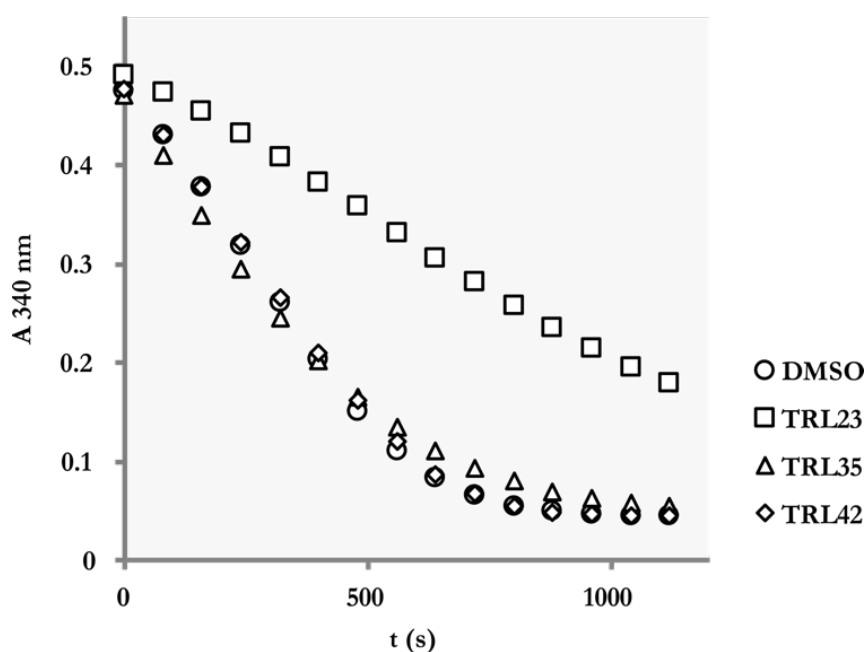
**Figura 4.52** | Gráficas de velocidad inicial de la reacción catalizada por GluR en función de concentraciones creciente de NADPH y GSSG según un modelo simple de *Michaelis-Menten* y valores calculados de  $K_M$  y  $V_{\text{MAX}}$ .

Gracias a los parámetros enzimáticos obtenidos se puede comprobar que, tanto la GluR recombinante producida en nuestro laboratorio como el método de ensayo de su actividad basado en la determinación del consumo de NADPH, son aptos para comenzar una exploración preliminar con miras a describir el efecto que nuestros péptidos inhibidores de la TryR podrían tener en la contraparte humana.

#### 4.8.3.3 *TRL 35 inhibe la TryR, pero no la GluR.*

Una vez se determinaron las condiciones óptimas para realizar el ensayo de actividad de la GluR humana, decidimos realizar pruebas con los inhibidores peptídicos más prometedores que teníamos a nuestra disposición. En este caso, se evaluó el efecto de TRL23(E2),

TRL35(K2) y TRL42, este último el péptido “revuelto” (*scrambled*) que se usa como control. Al realizar estos ensayos de actividad sin incubación previa no se observa inhibición alguna de la actividad de la GluR humana (7 nM) por ninguno de los péptidos (25  $\mu$ M). Sin embargo, al realizar una preincubación prolongada de 16 horas con 400 nM de hGluR y 75  $\mu$ M de los péptidos y tras una posterior dilución que conduce a alcanzar la concentración adecuada de enzima para el ensayo de actividad, encontramos que TRL23 tenía un leve efecto inhibitorio sobre la hGluR (**Figura 4.53**). Por el contrario, la reacción tras la incubación con TRL35 o TRL42 discurrió de forma similar a la del control con preincubación en ausencia de compuesto (DMSO). A pesar de que estos resultados deben ser considerados preliminares y que es necesario profundizar en el estudio de los efectos de estos péptidos inhibitorios sobre la actividad de la GluR humana y en su proceso de dimerización, la sustitución del residuo natural de glutámico en la posición 2 por uno de lisina parece ser doblemente interesante, ya que aumenta muy significativamente la actividad del péptido frente a TryR y, de forma simultánea, parece eliminar (aparentemente por completo) su actividad sobre la hGluR.



**Figura 4.53** | Actividad de hGluR tras su preincubación durante 16 horas con los péptidos inhibitorios (400 nM hGluR; 75  $\mu$ M péptidos) y posterior dilución hasta alcanzar las condiciones de ensayo establecidas (7 nM hGluR; 1.3  $\mu$ M péptidos).

## 4.9 Caracterización de la Inhibición de TryR por TRL35

### 4.9.1 Antecedentes.

Muchos de los fármacos usados hoy en día funcionan como inhibidores de enzimas relevantes en la patogénesis de la enfermedad. Un ejemplo clásico es la aspirina, que actúa como un inhibidor de la ciclooxigenasa (prostaglandina-endoperóxido sintasa) reduciendo la producción de prostaglandinas y así la inflamación. Existen otros numerosos ejemplos que abarcan distintos tipos de enfermedades como cáncer (Metotrexato / Dihidrofolato Reductasa), depresión (Fenelzina / Monoamina Oxidasa), enfermedades infecciosas (Aciclovir / DNA polimerasa del Virus Herpes) entre otras.

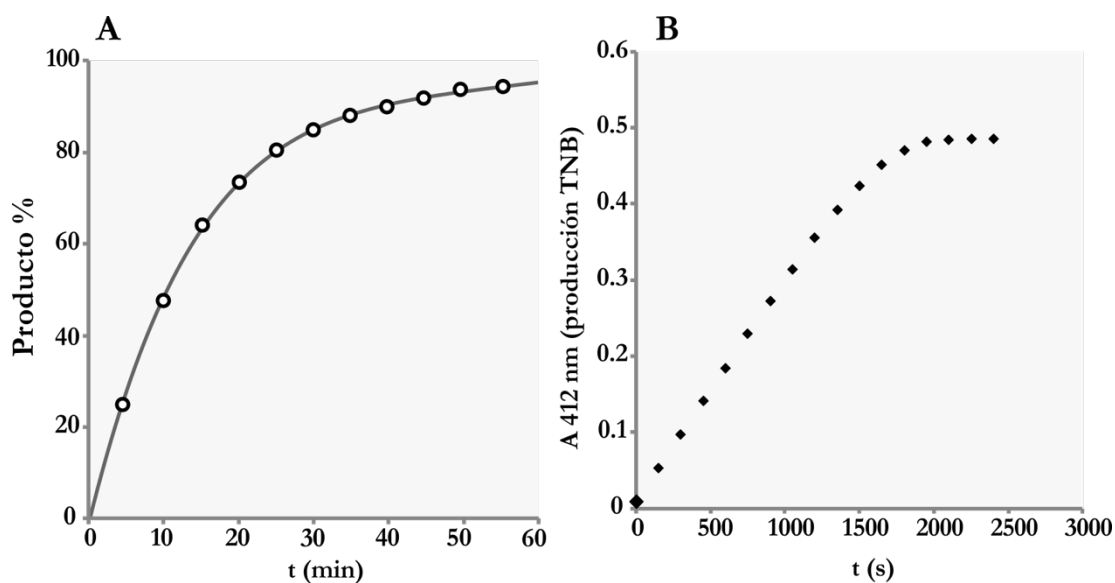
Entre las diferentes aproximaciones que existen para caracterizar la interacción entre una molécula y una enzima, la determinación de la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor ( $K_i$ ) es una de las más ampliamente usadas y aceptadas, ya que este valor es propio de cada inhibidor, inmutable e independiente de las condiciones de ensayo.

### 4.9.2 Modelo de Inhibición de la TryR

Hasta el momento ha quedado demostrado que algunas de las moléculas utilizadas en esta tesis doctoral tienen la capacidad de inhibir la actividad de la TryR de *L. infantum* e interferir en su proceso de dimerización. Estos resultados, sumados al hecho de que los péptidos han sido diseñados de manera racional para su interacción con la interfaz de dimerización, nos permiten postular que la inhibición debería estar basada en una perturbación del dímero de TryR debido a la unión de los péptidos en un sitio diferente al centro activo. Independientemente de que en algún momento podamos ser capaces de demostrar este mecanismo mediante cristalografía de rayos X o alguna otra técnica experimental, en estos momentos la manera más sencilla de evaluar nuestra hipótesis es hacer uso de las herramientas de la cinética enzimática, que son lo suficientemente potentes como para elucidar los mecanismos catalíticos de una enzima y dar una aproximación muy precisa del modo de acción de las moléculas utilizadas para reducir su actividad.

### 4.9.2.1 Mepacrina

La mepacrina, cuyo tipo de inhibición y valor de  $K_i$  son conocidos, se convierte en la molécula ideal para evaluar nuestro ensayo de actividad acoplado y observar si esta aproximación experimental puede tener algún efecto en la constante de inhibición ya descrita. Como ya se ha mencionado con anterioridad, el ensayo de actividad acoplado a DTNB es diferente a un ensayo enzimático tradicional. En estos ensayos clásicos la concentración de sustrato va disminuyendo mientras el producto aparece y, por tanto, la velocidad de la reacción decrece progresivamente. Debido a ello, la gráfica de evolución de la reacción tiene una forma curva (**Figura 4.54 A**). Por el contrario, debido a que en nuestro ensayo de actividad acoplado a DTNB la concentración de sustrato se mantiene constante, la gráfica de reacción de la TryR consiste en una línea recta que se prolonga hasta las fases finales de la reacción (en las que se consume el DTNB; **Figura 4.54 B**). Este comportamiento de la gráfica facilita en gran manera la determinación precisa de las velocidades de reacción que corresponden a cada concentración de sustrato.

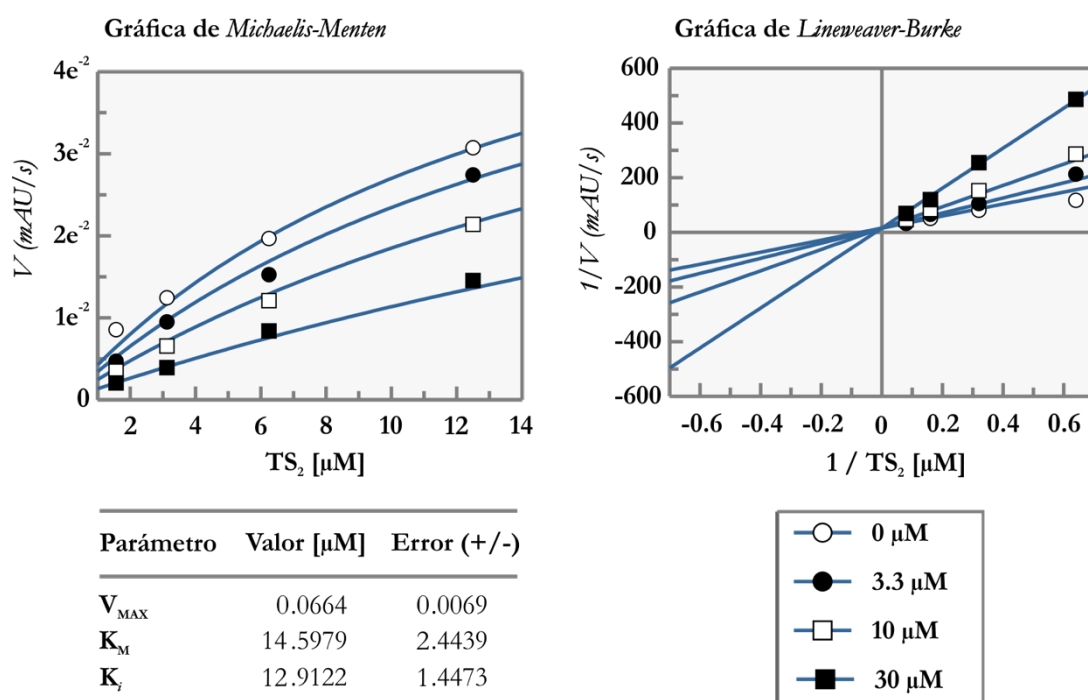


**Figura 4.54** | Representación gráfica de la progresión temporal de la reacción enzimática. **A.** Curva típica teórica de generación de producto en una reacción clásica en la que la concentración de sustrato disminuye continuamente (229), **B.** Curva de generación de TNB por TryR.

Los datos de velocidad de reacción obtenidos al realizar nuestro ensayo de actividad enzimática en presencia de mepacrina y diferentes concentraciones de TS2 se intentaron ajustar a los 3 modelos clásicos de inhibición: i) inhibición competitiva, ii) inhibición



acompetitiva y iii) inhibición no competitiva o mixta. Solo el ajuste utilizando las ecuaciones características de un proceso de inhibición competitiva mostró una representación gráfica satisfactoria (**Figura 4.55**). Por ello se determinó que, usando el ensayo de actividad de la TryR acoplado a DTNB, la mepacrina muestra un comportamiento inhibitorio competitivo con un valor de  $K_I$  de 13  $\mu\text{M}$ . Este valor está muy próximo al reportado previamente en la literatura (19  $\mu\text{M}$ ) (**276**). De esta forma, queda demostrado que la reacción acoplada puede ser utilizada para determinar el mecanismo inhibitorio de una molécula de interés sobre la TryR y determinar su  $K_I$ .

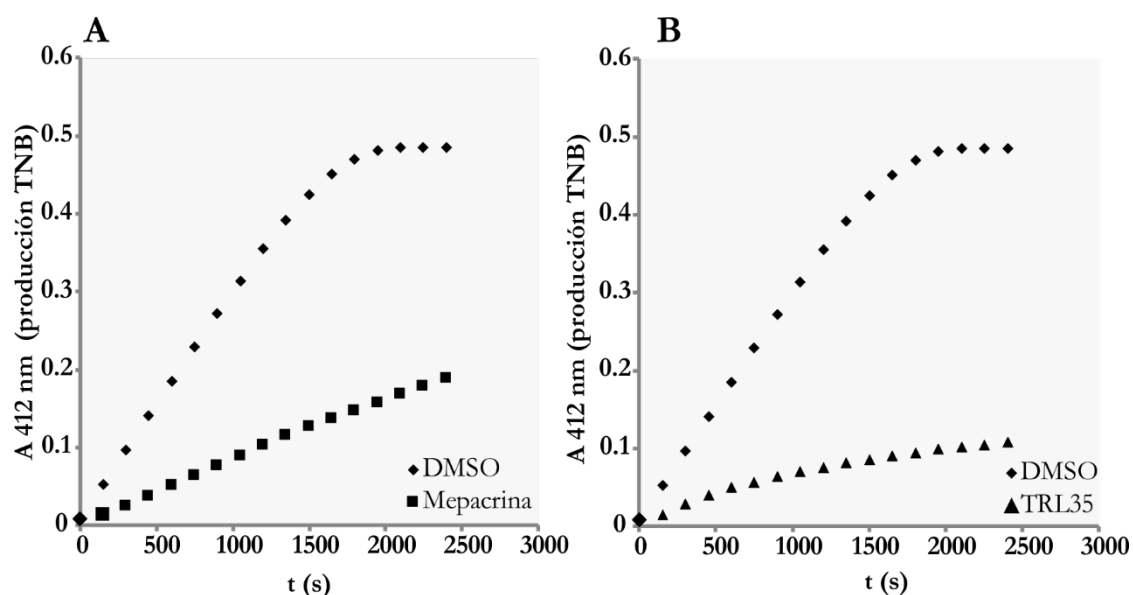


**Figura 4.55** | Representaciones gráficas de la velocidad inicial de la reacción catalizada por TryR en presencia de distintas concentraciones de mepacrina y cálculos de  $K_M$ ,  $V_{\text{MAX}}$  y  $K_I$ .

#### 4.9.2.2 *TRL35*

Al intentar ajustar los datos obtenidos de actividad de TryR, en presencia de TRL35, a los modelos de inhibición clásicos mencionados en el apartado anterior no fue posible obtener una representación gráfica satisfactoria. La observación de las curvas de progreso de la reacción en presencia de mepacrina (**Figura 4.56 A**) y TRL35 (**Figura 4.56 B**) revela que en el caso de la mepacrina la velocidad de la reacción es constante durante todo el tiempo ensayado. Este comportamiento es el típico de un inhibidor competitivo clásico. Por el contrario, en el caso de TRL35 la velocidad de la reacción va disminuyendo con el tiempo

hasta llegar a un valor muy próximo a 0 mucho antes de que llegue a consumirse todo el DTNB presente (hay que tener en cuenta que en las condiciones del ensayo la concentración de sustrato permanece constante hasta consumir todo el DTNB disponible). De hecho, incluso tras más de 24 horas de reacción, el análisis de la intensidad de color en los pocillos muestra que nunca se llega a consumir todo el DTNB. De manera intuitiva, esta observación nos indica que TRL35 podría ser un inhibidor irreversible de la TryR. Por otra parte, las curvas de progreso de la reacción son típicas de un inhibidor de unión lenta (**Figura 1.20**). Cabe destacar que ya habíamos apuntado anteriormente la posibilidad de que TRL35 fuera un inhibidor dependiente del mecanismo (**Figura 4.28**) y que estos inhibidores, según se sabe, son de unión lenta.



**Figura 4.56** | Curvas de progreso de la reacción catalizada por TryR. **A.** Inhibición por Mepacrina (25 $\mu$ M) y **B.** Inhibición por TRL35 (25  $\mu$ M).

#### 4.9.2.3 *Inhibición de unión lenta (tiempo-dependiente).*

Los modelos de inhibición lenta, o tiempo-dependientes como también son llamados, se ajustan a tres tipos de mecanismos: i) unión lenta reversible simple; ii) isomerización enzimática y iii) marcaje por afinidad / inhibición dependiente del mecanismo. Mientras que los dos primeros contemplan un proceso de inhibición reversible (**Figura 1.19 B y C**), el tercero conlleva a la inactivación definitiva de la enzima (**Figura 1.19 D**). Como hemos mencionado con anterioridad, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la

inhibición de la TryR por TRL35 es un proceso lento que requiere de la actividad de la enzima y que, además, parece ser irreversible.

Bajo estas premisas nos planteamos evaluar si nuestras curvas de progreso de la reacción se ajustan al esquema mostrado en la **Figura 4.57 A** que hace referencia a un inhibidor irreversible de unión lenta. En este modelo de inactivación irreversible el proceso de generación de una forma inactiva de TryR como consecuencia de su interacción con TRL35 está gobernado por la constante  $k_5$ . El término  $K_i^{app}$  hace referencia a la  $K_i$  aparente a una determinada concentración de sustrato. Como veremos, a partir de su valor es posible determinar la  $K_i$  de TRL35.

**A**



**B**

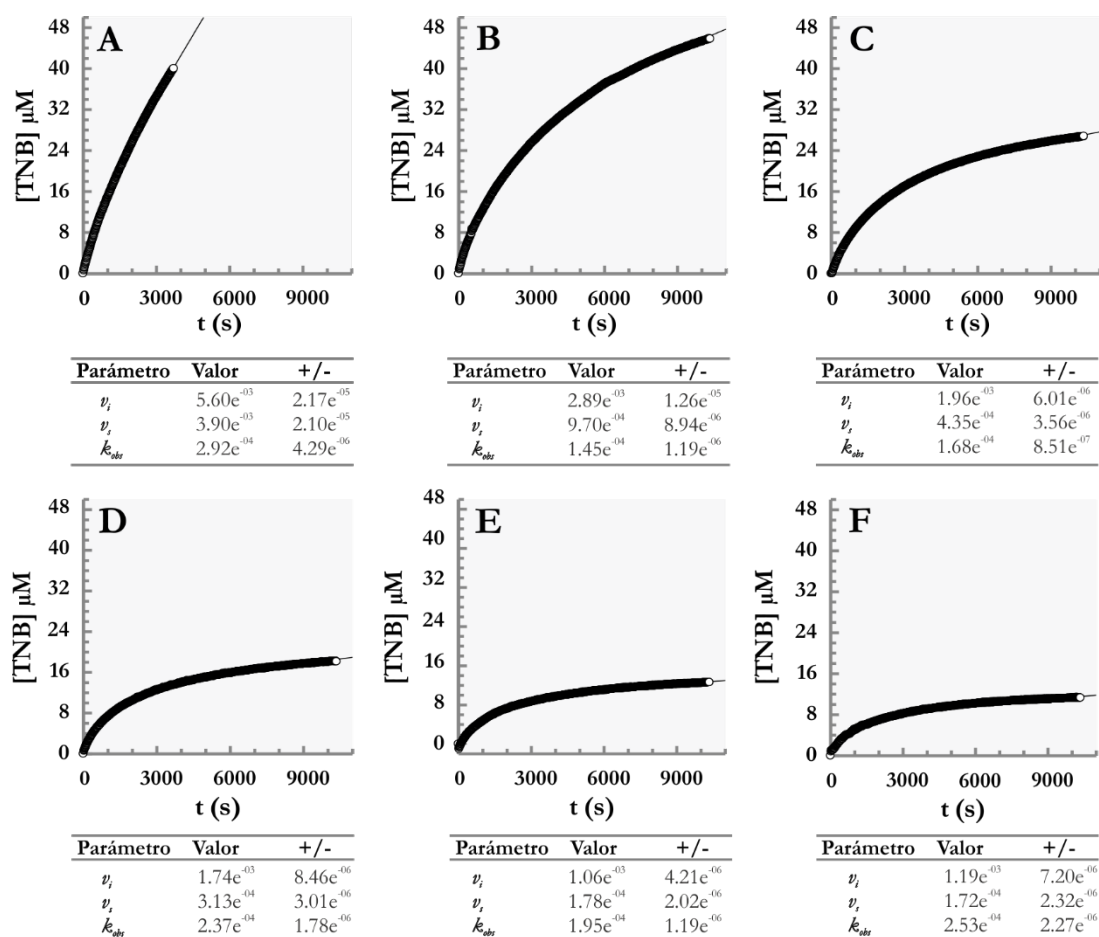
$$[\text{TNB}] = v_s t + \frac{v_i}{k_{obs}} [1 - \exp(-k_{obs} t)]$$

**C**

$$k_{obs} = \left[ \frac{k_5 [\text{TRL35}]}{K_i^{app} + [\text{TRL35}]} \right]$$

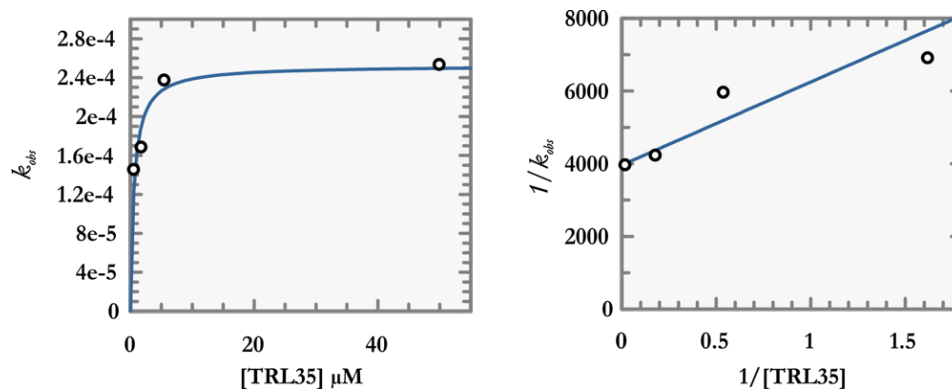
**Figura 4.57** | Inactivación de la TryR por TRL35. **A.** Modelo de inactivación propuesto. **B.** Ecuación que describe la curva de progreso de la reacción catalizada por TryR en presencia de un inhibidor de unión lenta. **C.** Ecuación empleada para determinar  $k_5$  y  $K_i^{app}$  en función de los valores de  $k_{obs}$  obtenidos a distintas concentraciones de TRL35 (Modelo de marcaje por afinidad / inhibición dependiente del mecanismo).

Uno de los parámetros clave para entender, y por ende describir, el proceso de asociación de un inhibidor de unión lenta con su enzima es la  $k_{obs}$ . Este parámetro describe la curvatura característica de la representación del progreso de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor de unión lenta y, por tanto, hace referencia a la conversión de la velocidad inicial de la reacción ( $v_i$ ) a la velocidad estacionaria final ( $v_s$ ) (**Figura 1.21**). La expresión matemática que describe este cambio en la velocidad de reacción se presenta en la **Figura 4.57 B** (**Ecuación 1.10**). El ajuste de nuestras curvas de progreso de las reacciones catalizadas por TryR a esta ecuación nos permite obtener los valores de  $v_p$ ,  $v_s$  y  $k_{obs}$  para cada concentración de TRL35 (**Figura 4.58**). Los valores obtenidos revelan que el aumento de la concentración de TRL35 conduce a un aumento en el valor de  $k_{obs}$  y a una disminución tanto de  $v_p$  como de  $v_s$ .



**Figura 4.58** | Curvas de progreso de las reacciones catalizadas por TryR en presencia de diferentes concentraciones de TRL35 a 1.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{TS}_2$ . La línea gruesa es la sucesión de cientos de datos experimentales representados por un círculo mientras que la línea delgada hace referencia al ajuste teórico. **A.** 0.206  $\mu\text{M}$  TRL35, **B.** 0.617  $\mu\text{M}$  de TRL35, **C.** 1.68  $\mu\text{M}$  de TRL35, **D.** 5.55  $\mu\text{M}$  TRL35, **E.** 16.6  $\mu\text{M}$  TRL35 y **F.** 50  $\mu\text{M}$  de TRL35.

La **Figura 4.57 C** muestra la expresión que relaciona las  $k_{obs}$  obtenidas a diferentes concentraciones de inhibidor con su  $K_i^{app}$  a una determinada concentración de sustrato. El ajuste a esta ecuación de los valores de  $k_{obs}$  obtenidos permite determinar un valor de  $2.5 \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$  para  $k_5$  y 0.6  $\mu\text{M}$  para  $K_i^{app}$  a una concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{TS}_2$ ; (**Figura 4.59**). Cabe destacar que, en la gráfica de inversos de esta figura, la línea recta generada corta el eje de ordenadas en un valor superior a cero, lo que indica que el mecanismo de inhibición requiere de dos pasos secuenciales, uno primero de unión entre enzima e inhibidor y un segundo consistente en un lento proceso de inactivación (229,230).



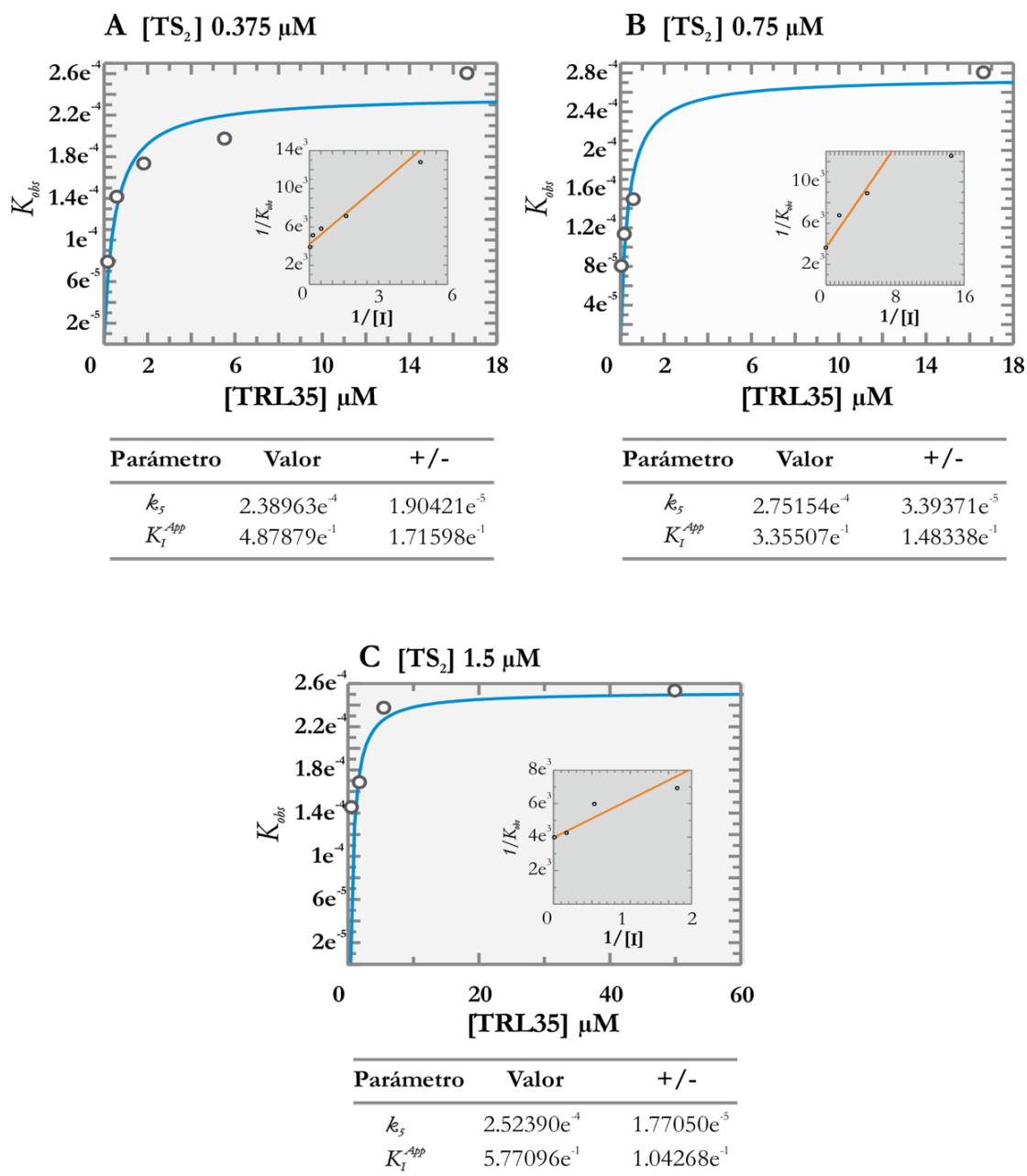
| Parámetro   | [μM]              | +/-               |
|-------------|-------------------|-------------------|
| $k_5$       | $2.52390e^{-004}$ | $1.77050e^{-005}$ |
| $K_i^{app}$ | $5.77096e^{-001}$ | $2.04268e^{-001}$ |

**Figura 4.59** | Representación gráfica de  $k_{obs}$  con respecto a la concentración de TRL35 y sus inversos utilizando la **Ecuación 1.14** para hallar  $k_5$  y  $K_i^{app}$  a  $1.5\mu\text{M}$  de  $\text{TS}_2$ .

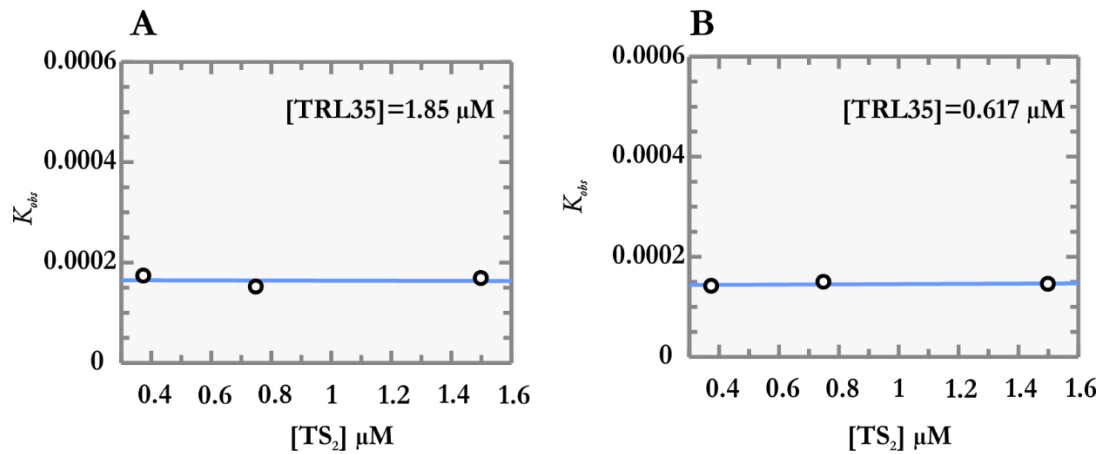
Tal y como se ha indicado,  $K_i^{app}$  es la constante de inhibición aparente que se observa a cada una de las concentraciones de sustrato ( $\text{TS}_2$ ) ensayadas. Por ello, todo el proceso mostrado que condujo a la determinación del valor de  $K_i^{app}$  a una concentración de  $\text{TS}_2$  de  $1,5\ \mu\text{M}$  se repitió para las concentraciones de  $0,75$  y  $0,375\ \mu\text{M}$  de sustrato. Los ajustes de los valores de  $k_{obs}$  obtenidos a distintas concentraciones de TRL35 para cada una de estas tres concentraciones de sustrato se muestran en la figura **Figura 4.60**, de la que podemos obtener los valores de  $K_i^{app}$  a cada concentración de  $\text{TS}_2$ .

El último paso en la caracterización de nuestro inhibidor consiste en la determinación de su  $K_i$  que, ahora sí, será una característica del mismo que se mantendrá constante en cualquier condición de ensayo. La relación entre  $K_i^{app}$  y  $K_i$  es distinta en función del tipo de inhibición de que se trate, por lo que antes de proceder al cálculo de  $K_i$  deberemos definir si nuestro inhibidor muestra un comportamiento competitivo, no competitivo o acompetitivo. En el caso de inhibidores tiempo-dependientes, el tipo de inhibición se puede determinar gráficamente al representar la  $k_{obs}$  frente a diferentes concentraciones de sustrato ( $\text{TS}_2$ ). Como se puede comprobar en la **Figura 4.61**, para las dos concentraciones distintas de TRL 35 ( $1.85\ \mu\text{M}$  y  $0.62\ \mu\text{M}$ ), el valor de  $k_{obs}$  se mantiene constante a las distintas concentraciones de sustrato ensayadas. Esta invariabilidad de la  $k_{obs}$  de TRL35 frente a las diferentes concentraciones de  $\text{TS}_2$  indica que se trata de un inhibidor no competitivo con un valor de  $\alpha$  igual a 1 ( $\alpha$  es la constante que hace referencia al efecto del inhibidor en la afinidad de la enzima por su sustrato y, de igual manera, al efecto del sustrato en la afinidad de la enzima

por el inhibidor; **Figura 1.18** (229,230). Este resultado es coherente con el diseño de nuestro péptido hacia la interfaz de dimerización, lo que permitiría su unión tanto a la enzima libre como a la enzima acomplejada con el TS<sub>2</sub>, característica que define a la inhibición no competitiva.



**Figura 4.60** | Representación gráfica de  $k_{obs}$  con respecto a la concentración de TRL35 para concentraciones de 0.375 (A), 0.75 (B) y 1.5 (C) μM de TS<sub>2</sub>.

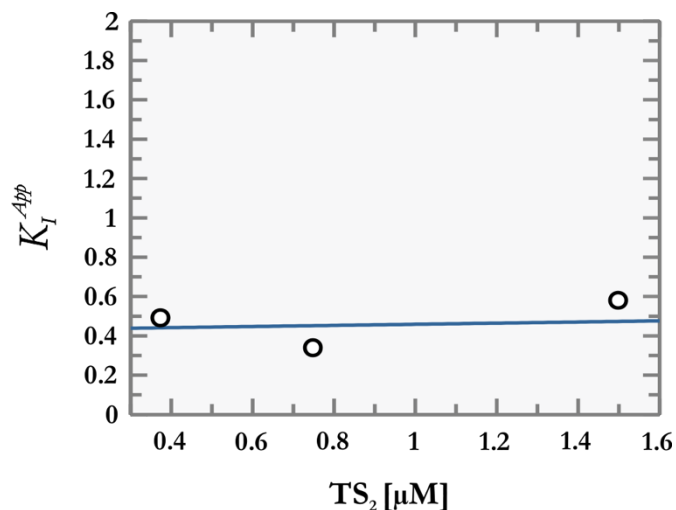


**Figura 4.61** | Evolución de los valores  $k_{obs}$  a diferentes concentraciones de  $TS_2$ . **A.** 1.85  $\mu M$  de TRL35. **B.** 0.67  $\mu M$  de TRL35.

Una vez determinado que TRL35 se comporta como un inhibidor no competitivo, es ya posible determinar su valor de  $K_i$  basándonos en sus valores de  $K_i^{app}$ . La relación entre ambas constantes viene dada por la **Ecuación 1.19** mostrada en la introducción y repetida a continuación:

$$K_i^{App} = \frac{[S] + K_M}{\frac{K_M}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}} \quad \text{Ecuación 1.19}$$

En la **Figura 4.62** se representan los valores de  $K_i^{app}$  obtenidos a las tres concentraciones de sustrato ensayadas y su ajuste a la **Ecuación 1.19** asumiendo un valor de 1 para  $\alpha$ . Al igual que ocurre con la  $k_{obs}$ , en los inhibidores no competitivos en los que se cumple que  $\alpha$  es igual a 1 el valor de  $K_i$  es independiente de la concentración de sustrato, por lo que  $K_i^{App}$  y  $K_i$  toman siempre el mismo valor, que en el caso de TRL35 es de 0,5  $\mu M$ .



| Parámetro | Valor  | +/-    |
|-----------|--------|--------|
| $K_I$     | 0.4756 | 0.0734 |

**Figura 4.62** | Evolución de los valores  $K_I^{App}$  a diferentes concentraciones de  $TS_2$ . El ajuste a la **Ecuación 1.19** permite establecer un valor de  $0.5 \mu\text{M}$  para la  $K_I$  de TRL35.

Como habíamos mencionado en el apartado 1.6.5.3 de la introducción, de la misma manera que la ratio  $k_{cat}/K_M$  es la mejor medida para definir la eficiencia catalítica de una enzima, la potencia inhibitoria de un inhibidor irreversible queda definida por la constante de segundo orden obtenida de la ratio  $k_5/K_I$ . En el caso de TRL 35 este parámetro toma un valor aproximado de  $5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , similar por ejemplo al de la inhibición de la prostaglandina G/H sintasa por la aspirina ( $2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) (277).

#### 4.9.2.4 Ensayo de Reversibilidad.

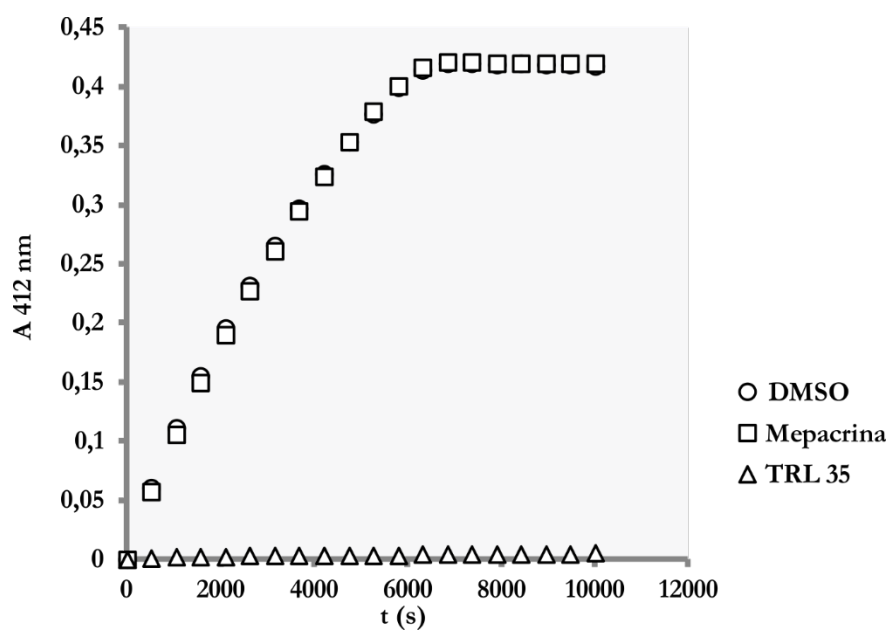
Con el fin de evaluar la afinidad de un inhibidor de manera acertada es importante definir el mecanismo de inactivación en términos de si es rápidamente reversible, lentamente reversible o irreversible. Esta información es relevante para entender qué tipo de equilibrio se establece entre la enzima y el inhibidor y así poder definir qué tratamiento dar a los datos experimentales obtenidos para determinar la constante de inhibición (230).

La reversibilidad de una inhibición se puede determinar con facilidad analizando la recuperación de la actividad enzimática tras una rápida dilución del complejo enzima inhibidor. Para esto se toma una cantidad de enzima superior a la utilizada en el ensayo de actividad y se incuba con una cantidad de inhibidor también superior. Tras un periodo de



incubación, la mezcla se diluye con una solución que contenga el sustrato y se determina la actividad enzimática (229,230).

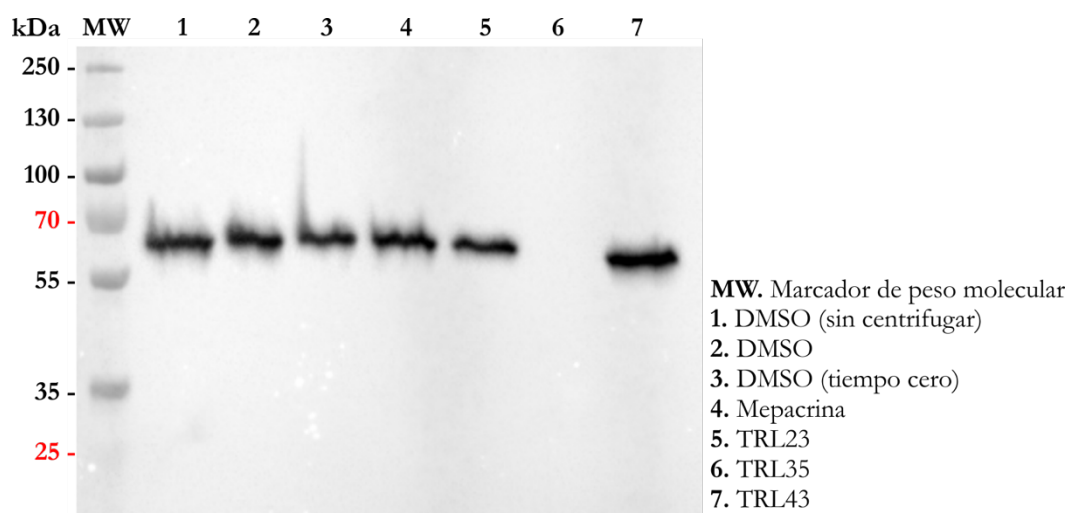
Con objeto de obtener una demostración adicional y directa de la irreversibilidad de nuestro proceso de inhibición, incubamos durante 16 h TryR con TRL35 a unas concentraciones de 400 nM y 75  $\mu$ M respectivamente. Como control se realizó la incubación de la misma concentración de enzima con 75  $\mu$ M de mepacrina. En todos los casos la reacción fue iniciada con una mezcla que contenía DTNB, NADPH, NADP<sup>+</sup> y TS<sub>2</sub>, quedando enzima e inhibidores a unas concentraciones finales de 7 nM y 1.3  $\mu$ M. Cuando en nuestro ensayo enzima e inhibidor se mezclan directamente a estas concentraciones ninguno de los dos inhibidores (mepacrina o TRL35) es capaz de reducir de forma apreciable la velocidad de la reacción. Sin embargo, los resultados que se muestran en la **Figura 4.63** indican que la enzima incubada con TRL35 sufre una inactivación completa. Ello nos permite afirmar que la interacción que se establece entre TryR y TRL35 durante la preincubación (400 nM y 75  $\mu$ M respectivamente) causa una inactivación de la enzima que no puede ser revertida en las nuevas condiciones en las que se realiza la reacción enzimática (7 nM y 1.3  $\mu$ M respectivamente), demostrándose por tanto un mecanismo de inhibición irreversible por TRL35. Los resultados obtenidos en el caso de TRL35 son completamente distintos a los mostrados para la mepacrina, la cual se comporta como un inhibidor reversible clásico, permitiendo la recuperación de la actividad de la enzima tras el proceso de dilución.



**Figura 4.63** | Actividad tras dilución (57x) del complejo EI incubado durante 16 horas. Los círculos hacen referencia al ensayo sin inhibidor, los cuadrados al ensayo en presencia de mepacrina y los triángulos al ensayo en presencia de TRL35.

#### 4.9.2.5 La inactivación irreversible de TryR por TRL35 es debida a la precipitación de la enzima

La observación de un precipitado turbio tras la incubación de TryR con TRL35 durante las 16 horas de incubación de los ensayos de dimerización nos llevó a plantear la hipótesis de la precipitación de la TryR como resultado final del proceso de inactivación por parte de TRL35. Dado que en nuestras condiciones la precipitación no podía ser demostrada por espectrofotometría (para determinar la precipitación de agregados proteicos se requiere una concentración de proteína superior a 10  $\mu\text{M}$  (278)), nos planteamos un sencillo ensayo en el cual, tras la incubación de la TryR durante 16 horas con diferentes péptidos, se centrifugan las muestras y se recuperan los sobrenadantes para realizar un *western-blot* en el que detectamos la presencia de la enzima mediante anticuerpos  $\alpha\text{-HIS}$ .



**Figura 4.64** | Ensayo de precipitación de TryR. Solo en presencia de TRL35 la TryR precipita y no puede ser detectada en el sobrenadante de la incubación mediante *Western-Blot* con un anticuerpo  $\alpha\text{-HIS}$ .

Tras este experimento, usando como como controles negativos TRL43 (péptido *scrambled*), mepacrina y una preparación con DMSO, pudimos comprobar que solo en la muestra tratada con TRL35 se observa una completa desaparición de la TryR en solución (**Figura 4.64, línea 6**), confirmando que la turbidez observada originalmente se debía a la precipitación de la proteína como consecuencia de la presencia del péptido. Es interesante indicar que TRL23, (versión de TRL35, K2E), que tiene efecto en el ensayo de dimerización ( $\text{CI}_{50}$  TRL35= 17  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CI}_{50}$  TRL23=33  $\mu\text{M}$ ), no induce precipitación de la enzima (**Figura 4.64, línea 5**). En

los controles negativos con DMSO se usó una preparación sin centrifugar (**Figura 4.64, línea 1**) así como una preparación sin incubar (**Figura 4.64, línea 3**). Esto se hizo para comprobar que ni la incubación por 16 horas ni la centrifugación de la enzima tienen efecto alguno sobre la cantidad de proteína total en solución.

En su conjunto, los resultados presentados en este trabajo demuestran que TRL35 es un inhibidor irreversible que muestra una inhibición tiempo-dependiente de tipo no competitivo basada en un proceso de modificación de la enzima TryR que conduce a una forma insoluble de la misma.

La existencia de un proceso de catálisis reduce en más de un orden de magnitud el tiempo necesario para que se alcance el estado de inactivación irreversible. La actividad de TRL35 como inhibidor queda definida por un valor de  $K_i$  de 0.5  $\mu\text{M}$  y una potencia inhibitoria de  $5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . Finalmente, es importante destacar que TRL35 no muestra una capacidad inhibitoria significativa frente a la GluR humana.

## DISCUSIÓN

---

## 5.1 ¿Por qué *Leishmania*? ¿Por qué Tripanotión Reductasa?

Aunque en Europa, sobretodo en la cuenca del mediterráneo, existen dos especies de *Leishmania* que son endémicas (*L. infantum* y *L. tropica*), la leishmaniosis sigue siendo de poco interés epidemiológico en el mundo desarrollado, estando considerada un problema más veterinario que de la clínica humana. De hecho, cuando la enfermedad se introduce en nuevas áreas los facultativos responsables no se encuentran familiarizados y no incluyen la leishmaniosis entre sus diagnósticos diferenciales. De esta manera, los tratamientos adecuados no son suministrados a los pacientes y se permite la libre circulación del parásito (279). En otras palabras, para muchos la leishmaniosis es considerada aun una enfermedad del tercer mundo, ya que es en estos países en donde su forma visceral sigue matando decenas de miles de personas cada año (13). Sin embargo, en Europa los fenómenos migratorios masivos debido a conflictos armados en países que son endémicos junto al cambio climático que sufre el planeta permite el contacto de parásitos con vectores permisivos y reservorios tan comunes como perros, liebres y ratas; exponiendo a un número más elevado de individuos año tras año. Hay que tener en cuenta que la leishmaniosis es considerada fundamentalmente una zoonosis en la cual el humano suele ser un hospedador accidental y que las condiciones necesarias para que se dé la enfermedad (la presencia del vector, un reservorio y un hospedador susceptible) pueden cumplirse en lugares donde antes no se reportaban casos autóctonos como es el caso en el norte de Italia, el sur de Francia e inclusive Alemania (280–282).

Con lo anteriormente expuesto simplemente se pretende acentuar que la Leishmaniosis no es solo un problema de los países pobres, máxime teniendo en cuenta que solo en España más de 30 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad, por lo que la investigación básica y aplicada en esta temática está más que justificada (13).

Además de un interés epidemiológico, los kinetoplastidios son organismos muy particulares que poseen rasgos tanto de eucariotas como de procariotas, con características que están relacionadas con las algas y moléculas que se creían eran exclusivas de los hongos. Este tipo de particularidades siempre han suscitado mucho interés desde el punto de vista de la investigación básica a la vez que la investigación aplicada ha tratado de explotarlas con el fin de identificar potenciales blancos terapéuticos únicos del parásito (17,283,284).

Es justo una de esas particularidades sobre la que se encuentra cimentado este trabajo, más específicamente en la forma particular mediante la que el parásito destoxifica su ambiente

intracelular de especies oxidantes al carecer del sistema GSH/GluR y reemplazarlo por el sistema T(SH)<sub>2</sub>/TryR.

El estudio de la TryR y de las posibles formas de inhibirla suscitó mucho interés durante la última década del siglo pasado ya que al ser una enzima única del parásito que emplea un sustrato inexistente en el hospedador, cumplía con uno de los requisitos fundamentales para ser un excelente blanco terapéutico. Su potencial fue confirmado cuando los estudios mostraron que los parásitos *knock-out* para esta enzima no eran viables y que una baja expresión de esta, hacía a los parásitos virtualmente avirulentos e incapaces de sobrevivir dentro del macrófago **(102)**. Sin embargo, el gran tamaño del sitio activo, su carga y el hecho de que se necesite inhibir su actividad en más de un 90% para que se observe un efecto deletéreo en los parásitos, indica que cualquier inhibidor que pretenda competir por la unión al sitio activo de la enzima deberá tener una altísima afinidad. Este tipo de contratiempos hicieron virar el interés hacia otros blancos que podrían tener una mayor repercusión en el metabolismo del tripanotión debido su rol insustituible. Entre estos se encuentra la inhibición de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa de la vía de las pentosas, que incidiría en la producción del NADPH consumido por la Tripanotión Reductasa, o en la inhibición de la Tripanotión Sintetasa *per se*, lo que sería desastroso para el parásito. El mismo descubridor del Tripanotión, *Alan H Fairlamb*, el cual lleva investigando desde los años 80 a la Tripanotión Reductasa y formas de inhibirla, reconoce las dificultades de esta aproximación y ha virado su interés hacia la Tripanotión Sintetasa **(285,286)**.

Somos conscientes de que la inhibición de la TryR no despierta el mismo interés que años atrás, aun cuando todavía en 2017 se sigan publicando estudios de inhibidores competitivos que van directamente al sitio activo **(287–289)**. Sin embargo, queremos recalcar que el estudio aquí presentado está enfocado hacia la inhibición de la enzima mediante el estudio de su interfaz de dimerización y no su sitio activo, con el interés último de afectar su condición de dímero e inactivarla. Esta diferencia en la aproximación hacia la inhibición de la enzima es fundamental, ya que la interfaz de dimerización no posee las características que hacen al sitio activo una pobre diana terapéutica. Estudios similares se llevaron a cabo en la Glutación Reductasa Humana en 1997 y en la de *Plasmodium falciparum* en 2003 pero, en ambos casos, se han usado agentes desnaturizantes en el ensayo de desdimerización del complejo y revisando la literatura no nos encontramos con que se haya seguido con estos esfuerzos **(126,290)**.

## 5.2 Análisis bioinformático de TryR: universalidad de Glu436, Gln439 y un presunto nuevo dominio.

Nuestro análisis de la secuencia de aminoácidos del dominio de dimerización ha incluido, de forma novedosa, secuencias de oxidoreductasas ausentes en análisis anteriores, como es el caso de las de tripanosomátidos que infectan insectos como *Stringomonas spp.* y *Angomonas spp.* (257,258). Además, como grupo externo que nos ha servido para realizar la raíz del árbol generado, hemos empleado una oxidoreductasa de *Archea* publicada en 2015 (257,258). El alineamiento y el análisis MEME del dominio de dimerización han revelado la importancia y la fuerte presión evolutiva que recae sobre los aminoácidos E436 y Q439 (numeración con respecto a la secuencia de *L. infantum*) dentro de la hélice  $\alpha 2$  del dominio de dimerización. Estos aminoácidos, como será discutido más adelante, son fundamentales en la interacción del péptido con la subunidad, habiéndose demostrado ya en la tesis del Dr. David Moreno la importancia del E436 en la interfaz de dimerización (91). Dentro de esta misma región también hemos identificado un motivo FAVA (Phe-Ala-Val-Ala) que, curiosamente, está ausente en las secuencias de los tripanosomátidos. Aunque todavía no sabemos la relevancia que este motivo pueda tener, su ausencia en el parásito podría presentar un punto de partida para explorar una inhibición selectiva entre la TryR y la GluR.

Una de las particularidades que encontramos en nuestro análisis *in-silico* con la suite MEME ha sido la identificación de un dominio de función desconocida (además de los 4 ya descritos). En un primer momento podría parecer que este hallazgo puede no ser más que una curiosidad o el resultado de aplicar un algoritmo diferente a la secuencia proteica de la TryR pero una publicación reciente que sugiere la interacción de una subunidad de la TryR con una subunidad de la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, otra de las enzimas mencionadas como potenciales blancos, podría darle sentido a este dominio de función desconocida que quizás sea el responsable de la interacción con la G6PD (291). Un análisis más profundo, tanto *in-silico* como experimental, de esta posible nueva interacción sería necesario.

## 5.3 Validación de los ensayos empleados

### 5.3.1 NADPH: ¿Regulador de la actividad TryR dentro del parásito?

Uno de nuestros objetivos principales ha sido la optimización de la capacidad inhibitoria del Péptido 3 obtenido en la tesis del Dr. David Moreno mediante cambios puntuales en las

diferentes posiciones de la secuencia peptídica, la realización de restricciones conformacionales y el acortamiento de la secuencia. Puesto que ello suponía la evaluación de cientos de variantes del Péptido 3, durante las primeras etapas de esta Tesis Doctoral se hizo un gran esfuerzo para optimizar los análisis de actividad de la TryR y de cuantificación de dímero (ensayo de dimerización), en un intento de generar ensayos muy robustos y altamente reproducibles.

Durante la implementación del ensayo de actividad de la TryR, que emplea el DTNB para reciclar el TS<sub>2</sub>, nos encontramos con una inconsistencia sistemática en los resultados obtenidos que se relacionaba directamente con una falta de consistencia en el grado de oxidación de las alícuotas de NADPH empleadas en la solución de reacción. Es bien sabido que la exposición tanto de la TryR como de la GluR al NADPH por periodos prolongados provoca una inactivación de la enzima (263). El mecanismo no es conocido, aunque se presume que podría estar relacionado con una sobre-reducción de la enzima a un estado EH<sub>4</sub> por parte del NADPH (245,261). En el caso de la glutatión reductasa, la forma EH<sub>4</sub> es considerada una enzima en *standby* inactiva, más importante desde el punto de vista metabólico que catalítico debido a su susceptibilidad a la inactivación proteolítica (95). Esta posible regulación de la GluR mediante su paso a la forma EH<sub>4</sub> podría ser utilizada también en el caso de la TryR, que de igual forma es susceptible a una sobre-reducción y subsecuente desactivación por parte del NADPH, tal y como hemos demostrado con nuestros resultados. En nuestro caso una proporción 5:1 NADPH:NADP<sup>+</sup> solucionó los problemas de inactivación de la enzima y variabilidad del ensayo, logrando obtenerse valores de K<sub>M</sub> para TS<sub>2</sub> (10 μM) y NADPH (13 μM) en consonancia con los reportados en la literatura para el ensayo no acoplado de reducción de NADPH (263,292). Además, se empleó el inhibidor mepacrina tanto para poner a punto el ensayo que permite obtener las CI<sub>50</sub> de los péptidos como para validar la constante de inhibición de TRL35. Los valores de CI<sub>50</sub> y de K<sub>I</sub> obtenidos para la mepacrina fueron exactamente iguales a los reportados en la literatura, validando de manera inequívoca nuestra aproximación experimental en la búsqueda de inhibidores de la actividad TryR.

### 5.3.2 Dimerización: el beneficio del desarrollo *in-house*

En el caso del ensayo de dimerización, también fue necesario realizar modificaciones con el fin de lograr aumentar al máximo su reproducibilidad. En primer lugar, en el ensayo original presentado por el Dr. David Moreno se empleaban dos diferentes TryR (HH y FF), las cuales



se premezclaban antes de ser puestas en la placa en presencia del inhibidor con el fin de obtener la especie TryR HF (91). En nuestro caso la coexpresión de ambas proteínas en una misma bacteria facilitaba la obtención de la especie HF en una misma purificación. Esta forma de producir la TryR HF demostró ser más eficiente en tiempo y también más reproducible, logrando obtener cantidades similares de la especie HF tras diferentes purificaciones. Dado que no observamos diferencias apreciables en la actividad de las especies HF, HH y FF, tanto los ensayos de actividad como los de dimerización se realizaron con los preparados proteicos obtenidos a partir de la bacteria que contiene ambos plásmidos. De manera sorprendente, descubrimos que los resultados obtenidos empleando placas comerciales sensibilizadas con anticuerpos anti-FLAG también sufrían de cierta variabilidad, por lo que decidimos elaborarlas nosotros mismos, aumentando de esta manera la reproducibilidad del ensayo. Probablemente el pobre comportamiento de las placas comerciales esté relacionado con el empleo de agentes bloqueantes no adecuados para la TryR. Esto lo concluimos al implementar el ensayo con la GluR humana bajo las mismas condiciones empleadas para TryR, encontrándonos de nuevo con una alta variabilidad en los resultados. Esta variabilidad fue solventada simplemente cambiando el agente bloqueante del ensayo (293). Otro de los focos de variabilidad en los ensayos tipo ELISA suele ser el tiempo que se permite que se desarrolle la reacción y la aparición del color, con lo que la intensidad del mismo refleja de manera imprecisa la cantidad de anticuerpo primario arrojando un resultado falso-positivo (294). De aquí la importancia de emplear siempre la misma cantidad de proteína inicial y un agente que finalice la reacción en tiempos establecidos. De igual manera, y con el fin de blindar el ensayo a futuro, la utilización de anticuerpos monoclonales conjugados directamente con HRP evita la necesidad de un anticuerpo secundario. Todas estas medidas han mantenido los resultados obtenidos por esta técnica altamente reproducibles durante varios años, permitiéndonos evaluar cientos de compuestos.

Aunque este tipo de optimizaciones de los ensayos suelen pasarse por alto por no considerarse dignos de mención en un trabajo doctoral, el *know-how* adquirido y la modularidad del ensayo han permitido su adaptación con éxito, de manera sencilla y rápida, al estudio de diversas proteínas diméricas como la Glutación Reductasa Humana, la Glutación Reductasa de *Plasmodium falciparum* y la transcriptasa reversa del VIH, evaluando inhibidores de la dimerización en todas ellas.

Ya que en el trabajo del Dr. David Moreno se estableció que el Péptido 3 es capaz de causar una pérdida de dímero de TryR, este constituyó un perfecto control positivo para evaluar el ensayo de dimerización. De igual manera la mepacrina, que se sabe no interfiere con el estado

dimérico de la enzima, se empleó como control negativo. Como era de esperar, el Péptido 3 causa una disminución del dímero de manera dosis dependiente con una  $CI_{50}$  de 40  $\mu M$  mientras que la mepacrina no tiene ningún efecto sobre el dímero de TryR.

## 5.4 Optimización del péptido inhibitorio

### 5.4.1 Una lisina en posición 2 mejora más de 30 veces la actividad inhibitoria: generación de TRL35

Una vez ambos ensayos se encontraban validados, nos dispusimos a mejorar el Péptido 3. Para comenzar, y teniendo en cuenta la importancia del glutámico en la posición 2 del péptido y en la posición 436' del monómero, se realizó una sustitución de este aminoácido con carga negativa por uno con carga positiva. Según la matriz de sustitución BLOSUM62, el aminoácido positivo más adecuado para esta sustitución es la lisina, seguido de la histidina y de la arginina. De esta forma el glutámico 2 del péptido fue reemplazado por lisina en el denominado TRL14. Tras los ensayos, comprobamos que TRL14 tiene una capacidad inhibitoria 6 veces superior al control positivo de inhibición en actividad (mepacrina) y casi más de dos veces superior al control positivo del ensayo de dimerización (Péptido 3). Las otras sustituciones realizadas en este sitio no mejoraron al Péptido 3 ni a TRL14.

Otra de las modificaciones que se hizo sobre el Péptido 3 y que fue subsecuentemente aplicada a TRL14 fue la sustitución de las metioninas 11 y 13 por norleucinas ( $N_{LE}$ ). Como es bien sabido, el grupo tioeter de la metionina es susceptible de oxidarse por agentes oxidantes, en particular por peróxido de hidrogeno (295). Esta susceptibilidad puede ser solventada al reemplazar las metioninas del péptido por norleucinas ( $N_{LE}$ ), más resistentes a estos agentes. Aunque el cambio de una metionina por una leucina o una valina es considerado como una sustitución conservadora, estos cambios pueden llevar a una disminución de la actividad en la proteína. Por el contrario, el cambio por una norleucina mantiene las propiedades catalíticas (295–297). De esta forma se generaron TRL23 (derivado del Péptido 3 en el que las metioninas 11 y 13 son sustituidas por norleucinas) y TRL35 (derivado de TRL14 con las mismas modificaciones). Ambos péptidos mostraron pequeñas mejoras en los resultados del ensayo de dimerización (34  $\mu M$  vs 41  $\mu M$  en el caso de TRL23, y 16  $\mu M$  vs 18  $\mu M$  en el caso de TRL35). En el caso de las actividades, no apreciamos diferencias significativas derivadas de estas sustituciones. Esto es fácilmente explicable debido a los tiempos prolongados ( $\geq 16$  h) del ensayo de dimerización vs los

tiempos más cortos ( $\leq 1$ h) del ensayo de actividad, lo que daría tiempo a una oxidación de los péptidos en el medio acuoso disminuyendo un poco su actividad con respecto a aquellos protegidos. Cuando se trabaja con péptidos, es común emplear el agente reductor DTT en las soluciones tampón con el fin de minimizar la oxidación de aminoácidos susceptibles como cisteínas y metioninas. Sin embargo, ello no es posible en nuestros ensayos al estar diseñados para la evaluación de la actividad de una oxidoreductasa. Por todo lo anterior, los péptidos protegidos con norleucinas son preferidos a aquellos con metioninas. Cabe anotar que la protección de todos los péptidos empleados en este estudio en el extremo amino (que se encuentra acetilado) y el extremo carboxilo (en forma de amida) está dirigida a evitar su degradación por proteasas y no debe confundirse con la protección frente a agentes oxidantes.

Aunque las sustituciones de las metioninas causan una pequeña mejoría tanto en la capacidad de inhibir la actividad de la enzima como su capacidad de inducir desdimerización, el cambio más relevante consistió en el reemplazo del glutámico en posición 2 por una lisina. Debido a la importancia de este aminoácido en la interacción entre ambas subunidades de TryR, donde se encuentra interaccionando con la serina 464' y la alanina 465', es sorprendente que su cambio por un aminoácido con carga opuesta no disminuya la potencia inhibitoria del Péptido 3 sino que, por el contrario, la mejore. Durante las simulaciones de dinámica molecular que el Dr. Pedro Sánchez realizó con el Péptido 3 y una única subunidad de TryR se demostró que las interacciones entre el glutámico 2 y los protones del enlace amida de la serina 464' y la alanina 465' son muy estables, apreciándose además una interacción adicional de la cadena lateral del glutámico con la serina 433' (**240**). Estas interacciones permiten una fuerte unión entre el péptido y la superficie de dimerización de la enzima que explica la capacidad del péptido 3 para desestabilizar el dímero de TryR. En el caso de TRL14 y TRL35 era de esperar que, ante la ausencia del glutámico, esta interacción se viera afectada y se disminuyera el efecto sobre la actividad y la dimerización del péptido en TryR. Sin embargo, las simulaciones de dinámica molecular del TRL35 con el monómero mostraron que, de forma estable a lo largo del tiempo, la cadena lateral de la lisina 2 encuentra los grupos carboxilato de los residuos E436' y D432', estableciendo con ellos una fuerte interacción electrostática. Además de esto, el oxígeno carbonílico de la prolina 1 de TRL35 se ancla al monómero por medio de dos interacciones de enlace de hidrogeno con la serina 464'. Estas interacciones son suficientes para justificar el mejor comportamiento de este péptido en los dos ensayos experimentales, con un valor de  $CI_{50}$  en el ensayo de actividad enzimática 30 veces inferior al del péptido 3 ( $1.6 \mu\text{M}$  vs  $>75\mu\text{M}$ ). Además, es muy importante señalar que

la pendiente de la curva de reacción en presencia de TRL35 se ve drásticamente afectada tras unos pocos minutos, llegándose a aplanar por completo en un valor cercano a cero. Este tipo de comportamiento nos hizo sospechar que quizás el péptido podría estar interactuando con alguno de los reactivos de la reacción acoplada y que la inhibición que estábamos observando fuera más artefactual que real. Sin embargo, tan solo la adición de una alícuota fresca de la enzima fue capaz de reactivar la reacción y la producción de TNB. Este comportamiento es similar al observado en las curvas de inhibición tanto de la GluR como de la TryR por el óxido de merlasen, inhibidor tiempo dependiente de ambas enzimas que reacciona con el sitio activo (298). Al emplear el ensayo acoplado hay que ser especialmente cuidadoso debido a que se ha reportado que un exceso de DTNB en la reacción puede generar curvas que se correspondan con este tipo de inhibición (245). Sin embargo, este no es nuestro caso ya que tanto en la reacción sin inhibidor como en aquella en presencia de un inhibidor competitivo como la mepacrina, el comportamiento de las curvas es consistentemente lineal.

#### **5.4.2 La inhibición de la actividad de la TryR por TRL35 está ligada a la desestabilización del estado dimérico de la enzima.**

A pesar de que TRL35 muestra un potente efecto tanto en los ensayos de actividad como en los de dimerización, fue necesario demostrar que ambos eventos derivan de un mismo mecanismo de acción. La implementación de un procedimiento experimental que acopla ambos ensayos demostró de manera inequívoca que la disminución de la actividad enzimática y la disminución de especies diméricas están directamente relacionadas. Además, estudios subsecuentes en los que se pretendía establecer la importancia de los tiempos de preincubación de la enzima con TRL35 revelaron que estos son prácticamente irrelevantes y que la rápida pérdida de actividad enzimática, asociada a la disrupción del dímero, tan solo se observa cuando la enzima está catalizando la reducción del tripanotión. El proceso de catálisis requiere de reorganizaciones transitorias tanto del sitio activo como de sitios distantes de la enzima. Hay que recordar que la TryR es un dímero compuesto por dos subunidades y posee dos sitios catalíticos independientes funcionando, presuntamente, de manera asincrónica (299–301). Todas estas fluctuaciones en el conjunto de conformaciones nativas de una proteína, que incluyen movimientos que van desde vibraciones atómicas, a movimientos más lentos de conformaciones secundarias, dominios o incluso subunidades, son conocidas como *breathing* de la proteína (302,303). Presumiblemente, este movimiento

de la enzima durante la catálisis facilita la unión del péptido y explica por qué, bajo estas condiciones, solo se requieren minutos para inactivar la enzima en comparación con las horas necesarias en el ensayo de dimerización (ausencia de reacción enzimática).

Nos gustaría también anotar que, en el caso de las reacciones en las que se lleva a cabo la transferencia de partículas livianas como electrones y protones, se ha planteado un modelo de catálisis que va más allá de estabilizar el estado de transición y llegar al estado de activación para facilitar la transferencia de estos y que, en su lugar, se plantea una transferencia por medio de una tunelización cuántica o *quantum tunneling* (303–307). Este tipo de transferencia ha sido demostrado en enzimas que transfieren el poder reductor del NADPH como la dehidrofolato reductasa (DHFR), en flavoproteínas como la trimetilamina deshidrogenasa (TMADH) y en enzimas de conformación tetramérica como la sarcosina deshidrogenasa (TSOX) (308). Si este fuera el caso en TryR, el alto nivel vibracional de la enzima requerida para la tunelización también podría favorecer la exposición de sitios de la enzima comúnmente enterrados, promoviendo así la unión del péptido.

Lo anteriormente expuesto es una forma de interpretar los datos experimentales observados en base a la literatura disponible. Sin embargo, la mejor manera de desvelar la naturaleza de la unión de TryR con TRL35 sería obtener una estructura cristalina de esta interacción. Este tipo de estudios se están llevando a cabo en el momento que se realiza esta memoria en conjunto con el laboratorio del Dr. Juan Hermoso del Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC) y para ello se ha producido una tripanotión reductasa con una pureza superior al 95% y que carece de los *tags* empleados durante el proceso de purificación.

### 5.4.3 La actividad de TRL35 es dependiente de secuencia

De momento es irrefutable que TRL35 tiene un efecto tanto en la actividad de TryR como en la estabilidad de su forma dimérica. Para validar que el efecto del péptido sobre la enzima es dependiente de su secuencia, se realizaron dos péptidos *scrambled* (TRL42 y TRL43) que cuentan con la misma composición de aminoácidos que TRL35 y con sus mismas características en los extremos, pero con una ordenación aleatoria de los residuos. Ambos péptidos carecen de capacidad inhibitoria tanto en el ensayo de dimerización como en el de actividad enzimática, quedando demostrado que el efecto del TRL35 sobre la enzima es dependiente de su secuencia (309).

Tras estos resultados, TRL35 (Ac-PEIIQSVGISN<sub>LE</sub>KN<sub>LE</sub>-NH<sub>2</sub>) se constituyó en nuestro péptido prototipo sobre el que comenzaron a realizarse mejoras en base a restricciones

conformacionales, acortamiento del péptido y la caracterización bioquímica de su actividad. Las diferencias entre este péptido y la hélice  $\alpha$  que emula en la TryR son: i) el residuo de glutámico en posición 2 es sustituido por una lisina, ii) la cisteína en la posición 10 esta sustituida por una serina, iii) las metioninas 11 y 13 están sustituidas por norleucinas y iv) el extremo amino se encuentra acetilado y el extremo carboxilo en forma de amida.

#### 5.4.4 Acortamiento de TRL35: generación de TRL38

Una vez demostrada la capacidad inhibitoria de TRL35 sobre TryR nos dispusimos a evaluar qué residuos eran más relevantes para su actividad. Al remitirnos al análisis de secuencia realizado inicialmente encontramos que, además de la fuerte presión evolutiva sobre el glutámico 2 y la glutamina 5 (numeración en el péptido), también se observa que en todas las especies de *Leishmania* la hélice  $\alpha$  de interés finaliza con un motivo MKM. Justo estas metioninas son las que han sido sustituidas por norleucinas para proteger el péptido ante eventos de oxidación. Con el fin de evaluar, posición por posición, la relevancia de cada residuo presente en el péptido se realizó un escaneo de alanina empleando como péptido de referencia TRL35. Tal y como esperábamos, comprobamos que los cambios más deletéreos en la actividad del péptido se corresponden con las sustituciones K2A y Q5A, que causan una disminución de la potencia de TRL35 en un 14% y un 36% respectivamente. El segundo mayor impacto en la potencia inhibitoria del péptido se observa justo en los 3 aminoácidos finales correspondientes al motivo MKM ( $N_{LE}KN_{LE}$ ), observándose una pérdida de actividad en torno al 9% como consecuencia de la sustitución de cualquiera de los aminoácidos de este motivo. Por el contrario, la potencia del péptido se ve aumentada en un 9% y un 4% respectivamente al reemplazar las serinas por alanina (S6A y S10A). Cabe anotar que la serina 10 corresponde a la cisteína 444 en la hélice  $\alpha$  de la subunidad de TryR y que su cambio por serina es resultado del cambio realizado en el Péptido 3 original para protegerlo contra la oxidación (91).

De estos resultados, el más interesante es el que demuestra la importancia de la glutamina 5 en la potencia inhibitoria de TRL35. Este residuo corresponde a la Q439 en la subunidad de TryR que, junto al E436, mostró la más relevante en cuanto a su contribución a la energía de dimerización. Mientras que la mutación E436A mostró ser catastrófica para la función de TryR, validándose así la calidad de *hotspot* de este residuo, el estudio en profundidad de la sustitución Q439A tanto desde el punto de vista catalítico como de plegamiento y unión al FAD indicó que esta variante de la proteína es idéntica a la versión *wild-type* en todos los

parámetros estudiados **(91,309)**. La diferencia de comportamiento de esta sustitución en la proteína completa y en el péptido podría ser debida a la diferencia en el patrón de enlaces de hidrogeno generados entre las subunidades de la proteína y en la interacción péptido-subunidad. Mientras que entre los monómeros se observa una interacción de la Q439 con el oxígeno carbonílico de la I458' y el protón amidico de la V460', la simulación de dinámica molecular de TRL35 con la subunidad de TryR desveló nuevas interacciones de la glutamina 5 con el oxígeno de la V460' y el hidroxilo de la T453' **(240)**. Hay que tener en cuenta además que la contribución de la Q439 en el marco de la dimerización entre las subunidades no es tan preponderante como lo es la del E436 y que, como consecuencia del menor número de residuos implicados en la interacción entre péptido y proteína, la contribución relativa de Q5 entre TRL35 y el monómero es mucho mayor que la observada entre subunidades. Destacamos por tanto que un residuo inicialmente descartado como *hot-spot* de dimerización finalmente se constituye en esencial en la unión del péptido al monómero.

Tras la identificación de los residuos relevantes en TRL35, quisimos evaluar cuál es la secuencia mínima con capacidad de retener la capacidad inhibitoria del péptido. Para esto se empleó una batería de péptidos que acortaban uno a uno, desde el extremo carboxilo, los 13 residuos originales de TRL35. De esta manera demostramos que 9 aminoácidos son suficientes para mantener la actividad inhibitoria del péptido. La eliminación del noveno residuo, que corresponde a una isoleucina, causa una pérdida completa de la actividad inhibitoria. Este péptido corto de 9 aminoácidos con capacidad inhibitoria es denominado TRL38 (Ac-PEIIQSVGI-NH<sub>2</sub>) y muestra una CI<sub>50</sub> de 3.6 μM *vs* los 1.6 μM de TRL35. Aunque TRL38 no mejora a TRL35 en potencia inhibitoria, la CI<sub>50</sub> del péptido corto es 3 veces inferior a la de la mepacrina, molécula utilizada como control positivo del ensayo. En el caso del ensayo de dimerización, la CI<sub>50</sub> de TRL38 es de 23 μM *vs* los 15 μM de TRL35.

La explicación de la disminución en el poder inhibitorio, tanto en actividad como en dimerización, de este péptido corto estaría dada por la pérdida del motivo MKM. Más interesante aún es la importancia de la isoleucina 9 en la potencia inhibitoria del péptido corto: el cambio de este residuo por una alanina en TRL35 no genera un cambio en la potencia del péptido. Sin embargo, el rol que desempeña esta isoleucina en posición 9 en el marco del péptido corto es claramente relevante. En un estudio profundo de la interfaz de dimerización de TryR que tenía en cuenta las contribuciones hidrófobas y electrostáticas, la Dra. Marta Ruiz-Santaquiteria reveló la importancia de la zona hidrófoba que rodea a la valina 441, la fenilalanina 454 y la leucina 468 **(241)**. Justo en esta región se aloja la cadena lateral de la isoleucina 9 de TRL35 y TRL38 que, ante la ausencia del motivo MKM, gana

importancia en la interacción entre TRL38 y el monómero de TryR. De nuevo, de forma similar a lo descrito para la Q439, un residuo con escasa relevancia en el contexto de la proteína completa adquiere una gran importancia en la interacción que se establece entre péptido inhibitorio y monómero de la proteína.

## 5.5 Inhibición de la TryR silvestre: un proceso naturalmente complejo

Como se mencionó anteriormente, las condiciones de una enzima en el laboratorio distan mucho de las condiciones encontradas dentro de la célula. El hacinamiento molecular característico del citoplasma de las células podría reducir tanto la tendencia de la enzima a exponer sus partes hidrófobas como su posible *breathing* (310). Asimismo, cabría esperar que las modificaciones postraduccionales de la proteína recombinante fueran distintas a las generadas en el interior de los parásitos, lo que podría causar un impacto en la efectividad del péptido inhibitorio sobre la TryR (311). Es por ello que decidimos evaluar la actividad inhibitoria de TRL 35 sobre extractos de promastigotes de *L. infantum*. Los resultados demostraron que el TRL35 es capaz de inhibir la enzima silvestre incluso en presencia del gran número de macromoléculas, metabolitos y otros componentes celulares que se encuentran presentes en el lisado y que podrían interactuar de manera inespecífica con el péptido, demostrando así su especificidad. El paso lógico a seguir entonces fue desarrollar un TRL35 unido a FITC (TRL58) para hacer un seguimiento mediante microscopia confocal del péptido y de su capacidad para llegar hasta el parásito pasando por el macrófago. Los experimentos con macrófagos demostraron que, en las condiciones de ensayo, el péptido forma agregados fluorescentes que son fagocitados dando lugar a una localización de la fluorescencia en compartimentos intracelulares discretos. La repetición de los experimentos con macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania* fluorescentes (DsRED) en presencia de TRL58 permitió observar, de nuevo, una compartimentalización del péptido pero, en ninguno de los campos observados, una colocalización parásito/péptido. Esto podría deberse a 3 factores: i) el péptido no es capaz de mantener su estructura helicoidal, ii) el péptido es degradado por proteasas extra o intracelulares y iii) el péptido no llega a alcanzar el interior de las vacuolas parasitóforas.

Con el fin de solventar el primer supuesto se desarrolló una batería de péptidos con restricciones conformacionales mediante enlaces hidrocarbonados (grapas) y puentes lactama. Los enlaces hidrocarbonados han demostrado ser efectivos en los 3 aspectos que



queríamos solventar: helicidad del péptido, protección ante proteasas y penetración al interior de la célula (312).

### 5.5.1 Estabilización de la hélice $\alpha$ de TRL23 y TRL35: restricción de la estructura (pero también de la actividad).

Un análisis inicial de TRL 23 (2E) y TRL35 (2K), mostró un bajo grado de helicidad de alrededor del 0.69%. Al integrar los cierres hidrocarbonados (péptidos grapados) en diferentes posiciones de ciclación tanto de TRL23 como de TRL35 se obtuvieron progresos en los valores de helicidad (71%) pero las potencias inhibitorias no mejoraron las de los prototipos lineales mientras que, por el contrario, disminuyó su capacidad para reducir las especies diméricas de TryR. De manera sorprendente, los derivados grapados de TRL35 no solo no reducen las especies diméricas de TryR, sino que aumentan el porcentaje final de dímero tras el ensayo de dimerización, es decir, se comportan como estabilizadores de la tripanotión reductasa. Por tanto, la aproximación de estabilización por grapas, en nuestro caso, no es una opción adecuada.

Los cierres tipo lactama han sido analizados de manera extensa desde la década de los 90 en lo referente a su capacidad de estabilizar la estructura helicoidal de péptidos e inducir mejoras en la bioactividad y biodisponibilidad de los mismos. Un ejemplo claro son los péptidos derivados de la nocioceptina que, al ser estabilizados con puentes lactama, aumentan su potencial analgésico tras ser inyectados, demostrándose así la estabilidad que este tipo de cierres brinda a los péptidos dentro de los organismos (313). Dependiendo de la ubicación de los mismos, la presencia de puentes lactama en los derivados de TRL23 y 35 genera una mejora marginal tanto en actividad como en dimerización, siendo las posiciones de ciclación 3,7 (TRL39) y 4,8 (TRL44) las más favorecedoras y los cierres 7,11 (TRL45) y 8,12 (TRL46) los peores.

Aunque la restricción conformacional de los péptidos lineales mediante la aproximación de grapas o cierres tipo lactama no mejoró la potencia de los péptidos lineales de manera significativa, sí que aumentó su nivel de helicidad y, más importante aún, los volvió más resistentes a la degradación por proteasas aumentando su tiempo de vida medio en un orden de magnitud con respecto a los prototipos TRL23 y TRL35.

Las simulaciones de dinámica molecular de los análogos lineales y cíclicos unidos a la superficie del monómero de TryR ofrecen una explicación racional de la diferencia encontrada entre los péptidos con cierres hidrocarbonados y aquellos con puentes lactama:

estos últimos mantienen la orientación correcta de la glutamina 5 mientras que los hidrocarbonados no **(240,314)**.

La estrategia de restricción conformacional de los péptidos resultó adecuada para la generación de péptidos más estables y resistentes con una actividad similar a la de los péptidos prototipo. Sin embargo, la misma estrategia aplicada a TRL38 (péptido corto) resultó en una pérdida absoluta de su actividad, tanto en los ensayos enzimáticos como en los de dimerización.

Otro de los resultados más llamativos durante esta exploración fue la estabilización del dímero de TryR por parte de los péptidos con cierres hidrocarbonados derivados de TRL35. Esta estabilización no parece ser debida a la formación de las grapas *per se* ya que el fenómeno estabilizador también se observa en los precursores del péptido antes de que se dé la reacción de metátesis que forma la grapa. Recordemos que, con el fin de realizar la síntesis de los péptidos grapados, en las posiciones de interés se introducen aminoácidos modificados de naturaleza hidrófoba similares a alanina **(314)**. Es por ello que el comportamiento estabilizador podría atribuirse a la naturaleza hidrófoba del péptido grapado y de su precursor lineal.

Es posible plantear diversas hipótesis sobre la conducta de estos péptidos. Podríamos considerar que su naturaleza hidrófoba los dirige al sitio activo (también hidrófobo) de la enzima, donde establecerían contacto con ambas subunidades, estabilizando la interacción entre las mismas. Sin embargo, el gran tamaño de los péptidos junto con su estructura en hélice  $\alpha$  dificultan este escenario.

Como mencionamos antes, el dímero en solución es susceptible de exponer de manera transitoria secciones hidrófobas que normalmente se encontrarían enterradas y asociarse consigo mismo o, en condiciones de laboratorio, con el recipiente que lo contiene. Esto en última instancia lleva a una agregación y/o precipitación de la proteína que acarrea una pérdida de actividad **(310,315)**. Este efecto de pérdida de dímero es contrastable en los controles sin péptido inhibidor en el ensayo de dimerización en los que, tras 16 horas de incubación, existe una pérdida de alrededor del 40% de dímero. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible plantear una hipótesis alternativa según la cual los péptidos estabilizadores se unirían a estos parches hidrófobos actuando como chaperones moleculares que evitarían, de forma reversible, las interacciones que conducen a la agregación inespecífica de la proteína.

Por tanto, la diferencia entre actividad disruptora y estabilizadora en los derivados de TRL35 vendría dada por un equilibrio entre fuerzas hidrófobas y electrostáticas, haciendo de un péptido con capacidad de desestabilizar el dímero de TryR un estabilizador al aumentar su naturaleza hidrófoba. De la misma forma, el péptido unido en estos parches induciría un cambio conformacional que conduciría a una pérdida de actividad de la enzima. Existen ejemplos como los de la timidilato sintetasa y la kinasa de EphA2, ambas proteínas dimericas, en las que la unión de un péptido inhibitorio a la interfaz de dimerización provoca cambios conformacionales que estabilizan el dímero e inhiben su actividad de forma alostérica (316,317). Este tipo de inhibición explicaría también por qué las curvas de inhibición de los péptidos grapados derivados de TRL35 describen un comportamiento lineal, más similar al encontrado con un inhibidor como la mepacrina, y no curvilíneo, como en el caso de TRL35. Aunque este comportamiento dual de inhibición/estabilización localizado en la misma región de una proteína parece contraintuitivo, existen ejemplos como el de la proteína adaptadora 14-3-3 que indican que en el mismo sitio pueden unirse moléculas que pueden funcionar como estabilizadores e inhibidores (318).

### 5.5.2 De péptidos a moléculas pequeñas y la promiscuidad de TryR

El trabajo desarrollado en la optimización del péptido 3 inicial nos ha permitido obtener la *prueba de concepto* que valida el uso de disruptores de dimerización como estrategia en el desarrollo de moléculas con capacidad de inhibir la TryR. Sin embargo, el uso de los péptidos está ampliamente limitado por las pobres propiedades farmacocinéticas de estas grandes estructuras (319,320). Por lo anterior, y teniendo en cuenta que la exploración en lo referente a variaciones en la secuencia, acortamiento de la misma y estabilización nos suministró las referencias suficientes para determinar qué interacciones son las más relevantes en la interacción del péptido con el monómero de TryR, utilizamos toda esta información para intentar dar el salto desde péptido a molécula pequeña (241). Para ello condensamos la información obtenida en un modelo de farmacóforo que tuviera en cuenta 3 premisas: i) la relevancia de la lisina en la posición 2, ii) la importancia de la glutamina en posición 5 y iii) la influencia de la isoleucina 9 en los péptidos cortos. Un cribado virtual de más de 200 000 compuestos empleando este modelo farmacofórico condujo a la identificación de aproximadamente 100 moléculas que, tras ser curadas de forma manual, derivaron en 17 hits de interés. La evaluación experimental de estas 17 moléculas mostró que solo 3 poseían potencial inhibitorio (TRL66, TRL69 y TRL70). TRL69 es el compuesto más potente,

aunque sus valores de  $CI_{50}$  ( $48 \mu\text{M}$ ) están todavía muy alejados de los de TRL35 y TRL38 ( $1.4$  y  $3.6 \mu\text{M}$  respectivamente). En el caso del ensayo de dimerización nos encontramos de nuevo con un fenómeno de estabilización del dímero, pero en este caso más pronunciado que el observado por parte de los péptidos grapados. Como discutimos anteriormente en el caso de la estabilización del dímero por parte de los péptidos, una de las primeras hipótesis a tener en cuenta ante este comportamiento es la que supone el alojamiento de las moléculas en el sitio activo. El gran tamaño de los péptidos grapados supone un serio hándicap para la aceptación de esta hipótesis pero, en el caso de las moléculas pequeñas (50% más pequeñas que TS<sub>2</sub>) esta explicación es mucho más plausible. Los ensayos de dimerización en presencia de mepacrina (la mepacrina se une al centro activo sin causar estabilización del dímero) demostraron que esta compete con la unión de nuestras moléculas y elimina su efecto estabilizador, lo que permite concluir que todas ellas comparten el mismo sitio de unión **(116)**. Por tanto, las moléculas pequeñas seleccionadas tras nuestro proceso de cribado se alojan en sitio activo de la TryR interaccionando con ambas subunidades y estabilizando la conformación dimérica de la enzima. Aunque estos resultados no eran los esperados, demuestran de primera la mano lo promiscuo que es el sitio activo de la TryR, potenciando nuestro interés en inhibidores no clásicos para esta enzima.

Es interesante señalar que el modelo farmacofórico planteado en esta tesis está sirviendo de base para el desarrollo “*inteligente*” de nuevos peptidomiméticos con excelente potencial inhibitorio de TryR.

## 5.6 TryR y hGluR: Igualmente distintas

Aunque la TryR y la GluR son enzimas con sustratos mutuamente excluyentes, estas enzimas son tan similares desde el punto de vista estructural que es posible hacer que la Glutión Reductasa humana y la de *E.coli* catalicen la reducción de tripanotión tras un reducido número de mutaciones **(321,322)**. Por lo anterior, es importante caracterizar el efecto de nuestros inhibidores (no dirigidos al sitio activo de la enzima) en hGluR. Para ello expresamos y purificamos hGluR en nuestro laboratorio y evaluamos sobre ella los péptidos inhibitorios descritos en esta memoria. Curiosamente, al revisar la literatura nos encontramos con que, de forma consistente, la expresión en *E. coli* de glutión reductasas procedentes de diversas especies se ha realizado siempre en una cepa que tiene deleciónado el gen *gor* bacteriano (GluR de *E.coli*) y que fue desarrollada en los años 80 **(94,275,323–325)**. No sabemos si esto se debe al temor de que al expresar de forma simultánea la GluR

recombinante otras especie junto a la GluR de *E. coli* se puedan producir especies híbridas de la enzima o al propio procedimiento de purificación, basado en el empleo de columnas con 2'5' ADP-Sepharosa, que conduciría a la copurificación de ambas enzimas (326). En nuestro caso, la hGluR recombinante fue producida de forma análoga a como se expresa y purifica la TryR del parásito, obteniéndose una enzima que muestra las mismas constantes cinéticas tanto para NADPH como para GSH reportadas para la GluR humana. Con respecto a las actividades de los sistemas TryR/ T(SH)<sub>2</sub> y hGluR/ GSH es sabido que aunque el GSH es un mejor nucleófilo que el T(SH)<sub>2</sub> este último es más reactivo al permanecer ionizado en un rango más amplio de pH. Además, la mayor velocidad de oxidación del tripanotión cuando se emplea DTNB deja patente que la naturaleza intramolecular de la oxidación del segundo tior del tripanotión hace que este sea mucho más efectivo en su labor reductora que el glutatión (77). Es interesante, sin embargo, comprobar de primera mano cómo estas características del tripanotión permiten la implementación del ensayo de actividad acoplado al DTNB sin ningún problema y como, al intentarlo en hGluR, la ralentización en la oxidación de las especies intermediarias GS-TNB por una segunda molécula de GSH hace inviable la utilización de esta aproximación. Además, nuestros resultados nos permiten postular que las especies intermediarias producidas que tardan más tiempo en resolverse (GS-TNB) tienen un efecto en la afinidad de la GluR por el NADPH (Ver apartado 4.8.2).

### 5.6.1 TRL35 discrimina entre TryR y hGluR

Tras la implementación y validación de un ensayo estándar de evaluación de la actividad de la hGluR mediante el seguimiento por espectrofotometría de la oxidación de NADPH, determinamos la capacidad inhibitoria de los péptidos TRL23 (2E), TRL35(2K) y el péptido *scrambled* TRL42. Los ensayos de inhibición de la actividad enzimática en ausencia de preincubación no fueron capaces de detectar ninguna actividad inhibitoria en nuestros péptidos. Sin embargo, sabemos que su comportamiento y su interacción con la proteína puede verse favorecido con el tiempo, tal y como ocurre en los ensayos de dimerización de TryR. Por ello realizamos preincubaciones de péptidos y enzima a concentraciones más altas y por un tiempo más prolongado, observando que TRL23 tiene un efecto deletéreo en la actividad mientras que TRL35 y TRL42 se comportan exactamente igual que el control sin péptido. Es muy relevante que el simple cambio del residuo de glutámico presente en la posición 2 de TRL23 (residuo original en la hélice de la interfaz de dimerización) por una lisina en TRL35 sea responsable de la dramática diferencia observada en la actividad de estos

péptidos frente a ambas enzimas. Este resultado es un muy buen indicador de la posibilidad de inhibir la enzima del parásito sin afectar a la contraparte humana y constituye un estímulo para el desarrollo de estrategias similares que puedan resultar útiles en otros escenarios en los que la inhibición de la Glutación Reductasa es importante, como en el caso de las infecciones por *Plasmodium* o el desarrollo de algunos tumores (141,327–330).

Cabe recordar que en el caso de la hGluR existe un enlace disulfuro entre las cisteínas 90 que une ambas subunidades de forma covalente haciendo la conformación dimérica mucho más estable y restringiendo los movimientos de esta (299,331).

## **5.7 TRL35 inhibe la TryR mediante un mecanismo no competitivo irreversible que causa la precipitación de la enzima inactiva**

A pesar de saber con certeza que el TRL35 interacciona con la TryR llevando a la enzima a perder su conformación dimérica y perder su actividad, hasta que no se cuente con un cristal de la proteína acomplejado con el inhibidor que demuestre cómo se da la interacción entre péptido y enzima, las hipótesis que planteemos con respecto a esta interacción serán tan buenas como los datos experimentales y la literatura que nos ayuden a explicarlas. Sin embargo, la bioquímica nos provee de poderosas herramientas que, a partir de estudios de cinética enzimática, nos permiten hacer una aproximación muy precisa al modo de acción de nuestros péptidos. En nuestro caso, los datos de las cinéticas de inhibición de la TryR por TRL35 no pudieron ser ajustados a los modelos clásicos de inhibición. En ningún momento debe de plantearse que el seguimiento de la actividad de la enzima acoplada a la reducción del DTNB no es apto para este tipo de estudios, ya que en las mismas condiciones nuestro control con mepacrina describió con éxito el modelo competitivo de inhibición que esta molécula exhibe.

Como ya habíamos mencionado con anterioridad, las curvas de actividad que describen la reacción en presencia de TRL35 son similares a las descritas por el óxido de merlasen, que es un inhibidor tiempo dependiente de la TryR que tiene como diana el sitio activo de la enzima. Curiosamente, en la publicación en la que se describe la reacción acoplada a DTNB también describen inhibidores tiempo-dependientes como la lunarina y un derivado de esta, el PK43 (245).

Al recurrir a un modelo de inhibición más complejo, como lo es la inhibición tiempo dependiente, en el que se tiene en cuenta la función curvilínea producto del proceso lento de inhibición que genera un cambio de las velocidades durante el transcurso de la reacción, el

ajuste de nuestros datos probó ser consistente con este mecanismo. Los resultados de este análisis nos dicen que el TRL35 es un inhibidor irreversible no competitivo de la tripanotión reductasa con una  $K_i$  de 0.5  $\mu\text{M}$ , muy inferior a los 304  $\mu\text{M}$  de la lunarina, los 59  $\mu\text{M}$  del PK43 y los 18  $\mu\text{M}$  del óxido de merlasen (245). Una de las implicaciones más importantes de que la inhibición sea de naturaleza no competitiva es que corrobora de manera inequívoca que el inhibidor peptídico es capaz de unirse tanto a la enzima sola (ensayo de dimerización) como a la enzima acomplejada con el sustrato (ensayo de actividad). Esta explicación desde la cinética enzimática es completamente compatible con la hipótesis de inhibición planteada a lo largo de este trabajo.

Las inhibiciones tiempo dependientes de tipo irreversible están basadas en un mecanismo que contempla una modificación permanente de la enzima tras su unión al inhibidor que conduce a una modificación irreversible de la misma (230). Teniendo en cuenta que tras la incubación de TryR con TRL35 es común observar un precipitado en la solución, nos planteamos una hipotética inhibición irreversible causada por la precipitación de la enzima. Tras incubar la TryR con diferentes moléculas inhibitorias como mepacrina, TRL23, TRL35 y el control *scrambled* TRL42, comprobamos que solo TRL35 tiene la capacidad de generar una completa disrupción del dímero de TryR y llevar a la enzima a un punto de no retorno que, postulamos, es debido a la precipitación sus especies monoméricas. El hecho de que la irreversibilidad de la actividad venga dada por una precipitación de la enzima tras la pérdida de su forma dimérica nos confirma, una vez más, la naturaleza disruptiva de los dímeros por parte del TRL35.

## 5.8 Observaciones Finales

Los resultados obtenidos en la presente Tesis demuestran que la unión de TRL35 a la enzima induce en ella una serie de cambios conformacionales que son dependientes de la correcta distribución de grupos hidrófobos, de la carga y de la flexibilidad estructural del péptido. Es probable que durante la unión de TRL35 a la enzima se produzcan modificaciones estructurales en busca de la conformación más adecuada para su interacción con la interfaz de dimerización y que la estructura final no suponga una conformación de hélice  $\alpha$  canónica. Esto explicaría porque los péptidos conformacionalmente restringidos pueden unirse a la enzima, pero no pueden desdimerizarla o, por lo menos, no al nivel de TRL35.

La acusada aceleración del proceso de inactivación cuando la enzima está implicada en el proceso de catálisis sugiere que los probables movimientos de la enzima durante este proceso

facilitan el acceso, y por tanto la interacción, del péptido a la interfaz de dimerización. Parece razonable suponer que una de las guías más importantes en el proceso de ubicación dinámica del péptido en la interfaz este dada por la lisina en posición 2, lo que explicaría la potencia de TRL35 en comparación con la de TRL23.

Los resultados aquí presentados nos llevan a concluir que TRL35 interacciona con la interfaz de dimerización de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* desestabilizando la conformación dimérica de esta y causando una pérdida irreversible de actividad como consecuencia de la precipitación de sus monómeros.



## CONCLUSIONES

---

- 1) La presencia de NADP<sup>+</sup> en el medio de reacción es imprescindible para que la TryR de *L. infantum* ejerza su actividad catalítica en los ensayos *in vitro* con la enzima purificada.
- 2) La sustitución del glutámico en posición 2 por una lisina en un péptido prototipo de 13 aminoácidos, derivado de una hélice  $\alpha$  que forma parte de la interfaz de dimerización de TryR, mejora drásticamente su capacidad de desestabilizar el dímero e inhibir su actividad catalítica.
- 3) La glutamina 5 del péptido resultante, TRL35, es un aminoácido que ha demostrado ser esencial para la interacción con la enzima, a pesar de que su equivalente en TryR, la Gln439, no es un *hot spot* de dimerización.
- 4) Los derivados de TRL35 con conformación restringida, por la introducción de grapas o puentes lactama, tienen un índice de helicidad más alto que el péptido prototipo y una mayor resistencia a la digestión por proteinasa K. Sin embargo, estas restricciones disminuyen la capacidad inhibitoria del péptido, lo que sugiere que la existencia de cierta flexibilidad es importante para su actividad.
- 5) La actividad inhibitoria de TRL35 no se ve reducida sustancialmente por el acortamiento de su secuencia desde el extremo C-terminal mientras se mantengan los 9 primeros aminoácidos. Este comportamiento revela la importancia de la isoleucina 9 en la interacción del péptido con la enzima.
- 6) La identificación de las posiciones 2, 5 y 9 de TRL35 como las más relevantes para su interacción con la proteína nos ha permitido generar un farmacóforo con el que se han realizado cribados virtuales de quimiotecas y se podrán diseñar nuevos inhibidores de TryR.
- 7) La capacidad de TRL35 de inhibir a la TryR silvestre en un ambiente molecularmente complejo, como son los extractos celulares de promastigotes de *L. infantum*, demuestra una alta especificidad de este péptido por su diana.

- 8) A pesar de la similitud estructural entre la TryR estudiada y la GluR humana, TRL35 solo muestra capacidad para inhibir la enzima del parásito.
- 9) La capacidad de TRL35 para desestabilizar la estructura dimérica de TryR se ve drásticamente aumentada cuando la enzima está ejerciendo su actividad catalítica.
- 10) TRL35 es un inhibidor no competitivo, de unión lenta, de la TryR de *L. infantum*.
- 11) La disrupción del dímero de TryR es un proceso no reversible que conduce a la precipitación de la enzima.
- 12) La inhibición de la TryR de *L. infantum* mediante la disrupción de su estructura dimérica constituye una estrategia novedosa que puede conducir al desarrollo de nuevos fármacos antileishmania.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354:1191–9.
2. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561–77.
3. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect* [Internet]. 2014;69 Suppl 1:S10-8.
4. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305–18.
5. WHO | Leishmaniasis. [cited 2015 Sep 1];
6. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Jan 9];64:1–109.
7. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1013–8.
8. Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Marangi M, Grande R, Armignacco O, et al. Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(6):e0129418.
9. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* [Internet]. 2012;190(1–2):268–71.
10. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(30):20545.
11. Herrador Z, Martín JVS, Gherasim A, Aguado M. Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region , Spain , September 2009 to April 2013. 2015;(April 2013):1–10.
12. Herrador Z, Gherasim A, Jimenez BC, Granados M, San Martín JV, Aparicio P. Epidemiological Changes in Leishmaniasis in Spain According to Hospitalization-Based Records, 1997–2011: Raising Awareness towards Leishmaniasis in Non-HIV Patients. Carvalho EM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Mar 10;9(3):e0003594.
13. WHO. Weekly Epidemiological Record. Vol. 91, World Health Organisation Weekly epidemiological record. 2016.
14. Rico E, Alzate JF, Arias AA, Moreno D, Clos J, Gago F, et al. *Leishmania infantum* expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the

- nucleus in response to an apoptotic stimulus. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;163(1):28–38.
15. Benne R. Review RNA editing in trypanosomes. *Eur J Biochem.* 1994;23:9–23.
  16. Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: Insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol.* 2001;31(5–6):443–52.
  17. Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, et al. *Leishmania* major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):2902–6.
  18. Myler PJ, Sisk E, McDonagh PD, Martinez-Calvillo S, Schnauffer a, Sunkin SM, et al. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(5):527–31.
  19. Reed SG, Scott P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol.* 1993;5(4):524–31.
  20. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors [Internet].* 2012;5:276.
  21. Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997;91(7):693–701.
  22. Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 1989;69(1):100–3.
  23. Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology [Internet].* 1994 Mar;108(S1):S55.
  24. Voth BR, Kelly BL, Joshi PB, Ivens AC, McMaster WR. Differentially expressed *Leishmania* major gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;93(1):31–41.
  25. van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2006 Sep 12;103(37):13837–42.
  26. Fadok V a., Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: Recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest.* 2001;108(7):957–62.
  27. Henson PM, Bratton DL, Fadok V a. Apoptotic cell removal. *Curr Biol.* 2001;11(19):795–805.

28. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):334–59.
29. de Menezes JPB, Guedes CES, Petersen ALDOA, Fraga DBM, Veras PST. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–11.
30. Monzote L. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrob Agents J* [Internet]. 2009;1(September):9–19.
31. Chakraborty a K, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152(2):605–11.
32. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004;279(38):39925–32.
33. Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol.* 1996;152(1):65–75.
34. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):3010–5.
35. Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(5):787–94.
36. Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of Leishmaniasis : Past , Present and Future. 2007;1153–69.
37. Sherwood J a, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, et al. Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1994;19(6):1034–9.
38. Carvalho L, Luque-Ortega JR, López-Martín C, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4204–10.
39. Sogin ML, Hinkle G, Leipe DD. Universal tree of life. Vol. 362, *Nature.* 1993. p. 795.
40. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:449–70.
41. Bates P a. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine

- sand flies. *Int J Parasitol* [Internet]. 2007;37(10):1097–106.
42. Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*. 1998;222(1):107–17.
  43. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 2005;309(5733):404–9.
  44. Worthey E a., Martinez-Calvillo S, Schnaufer A, Aggarwal G, Cawthra J, Fazelinia G, et al. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(14):4201–10.
  45. Siegel TN, Tan KSW, Cross G a M. Systematic Study of Sequence Motifs for RNA trans Splicing in *Trypanosoma brucei* Systematic Study of Sequence Motifs for RNA trans Splicing in *Trypanosoma brucei*. 2005;25(21):9586–94.
  46. Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;143(2):125–34.
  47. Berberof M, Vanhamme L, Pays E. *Trypanosoma brucei*: A Preferential Splicing at the Inverted Polyadenylation Site of the VSG mRNA Provides Further Evidence for Coupling between Trans-splicing and Polyadenylation. *Exp Parasitol* [Internet]. 1995 May;80(3):563–7.
  48. Rauch C a, Perez-Morga D, Cozzarelli NR, Englund PT. The absence of supercoiling in kinetoplast DNA minicircles. *EMBO J*. 1993;12(2):403–11.
  49. Zheng Z, Butler KD, Tweten RK, Mensa-Wilmot K. Endosomes, glycosomes, and glycosylphosphatidylinositol catabolism in *Leishmania major*. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2015 Sep 2];279(40):42106–13.
  50. Santhamma KR, Bhaduri A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;75(1):43–53.
  51. Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;115(2):189–98.
  52. Aguilar Ruiz MJ. ¿La enzima? ¿El enzima? Un sustantivo de género ambiguo. *Rev Hispanoam Hernia* [Internet]. 2016 Apr;4(2):77–8.
  53. Plewes K a., Barr SD, Gedamu L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infect Immun*. 2003;71(10):5910–20.
  54. Wilson ME, Andersen K a., Britigan BE. Response of *Leishmania chagasi*



- promastigotes to oxidant stress. *Infect Immun*. 1994;62(11):5133–41.
55. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev [Internet]*. 2014;n/a-n/a.
  56. Kovářová J, Barrett MP. The Pentose Phosphate Pathway in Parasitic Trypanosomatids. *Trends Parasitol [Internet]*. 2016;xx:1–13.
  57. Kleijn RJ, Van Winden WA, Van Gulik WM, Heijnen JJ. Revisiting the <sup>13</sup>C-label distribution of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway based upon kinetic and genetic evidence. *FEBS J*. 2005;272(19):4970–82.
  58. Igoillo-Esteve M, Maugeri D, Stern AL, Beluardi P, Cazzulo JJ. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. *An Acad Bras Cienc [Internet]*. 2007;79(4):649–63.
  59. Maugeri DA, Cazzulo JJ, Burchmore RJS, Barrett MP, Ogbunude POJ. Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;130(2):117–25.
  60. Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PAM. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003;2(1):11.
  61. Henderson GB, Fairlamb a H. Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitol Today*. 1987;3(10):312–5.
  62. Igoillo-Esteve M, Cazzulo JJ. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;149(2):170–81.
  63. Krauth-Siegel RL, Comini M a. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta [Internet]*. 2008 Nov [cited 2014 Oct 25];1780(11):1236–48.
  64. Flohé L. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *Int J Med Microbiol [Internet]*. 2012 Oct [cited 2014 Jan 9];302(4–5):216–20.
  65. Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Cerami A. Synthesis of the trypanosomatid metabolites trypanothione, and N 1-mono- and N 8-mono-glutathionylspermidine. *J Chem Soc Chem Commun*. 1986;2(2):593.
  66. Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, Fairlamb AH. A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in

- Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2002;277(39):35853–61.
67. Oza SL, Shaw MP, Wyllie S, Fairlamb AH. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;139(1):107–16.
  68. Krauth-Siegel LR, Comini MA, Schlecker T. The Trypanothione System. In 2007. p. 231–51.
  69. Shames SL, Fairlamb AH, Cerami A, Walsh CT. Purification and Characterization of Trypanothione Reductase from *Crithidia fasciculata*, a Newly Discovered Member of the Family of Disulfide-Containing Flavoprotein Reductases? *Biochemistry*. 1986;25:3519–26.
  70. Krauth-siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH, Schirmer RH. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem* [Internet]. 1987 Apr 1 [cited 2014 Jan 9];128(1):123–8.
  71. Ariyanayagam MR, Oza SL, Guther MLS, Fairlamb AH. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *Biochem J*. 2005;391(Pt 2):425–32.
  72. Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, et al. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J Biol Chem* [Internet]. 2012;10(4):1–8.
  73. Shim H, Fairlamb a H. Levels of polyamines, glutathione and glutathione-spermidine conjugates during growth of the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J Gen Microbiol*. 1988;134(3):807–17.
  74. Bollinger JM, Kwon DS, Huisman GW, Kolter R, Walsh CT. Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*: Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. *J Biol Chem*. 1995;270(23):14031–41.
  75. Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1992 Oct [cited 2014 Jan 9];46(1):695–729.
  76. Gilbert HF. Molecular and Cellular Aspects of Thiol-Disulfide Exchange. In 1990. p. 69–172.
  77. Moutiez M, Meziane-Cherif D, Aumercier M, Sergheraert C, Tartar A. Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 1994;42(12):2641–4.

78. Awad S, Henderson GB, Cerami A, Held KD. Effects of trypanothione on the biological activity of irradiated transforming DNA. *Int J Radiat Biol.* 1992;62(4):410–407.
79. Thomson L, Denicola A, Radi R. The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys.* 2003;412(1):55–64.
80. Dormeyer M, Reckenfelderbäumer N, Lüdemann H, Krauth-Siegel RL. Trypanothione-dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* Ribonucleotide Reductase. *J Biol Chem.* 2001;276(14):10602–6.
81. Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *J Med Chem.* 2009;52(8):2603–12.
82. Ariza A, Vickers TJ, Greig N, Armour KA, Dixon MJ, Eggleston IM, et al. Specificity of the trypanothione-dependent *Leishmania major* glyoxalase I: Structure and biochemical comparison with the human enzyme. *Mol Microbiol.* 2006;59(4):1239–48.
83. Taylor MC, Kelly JM, Chapman CJ, Fairlamb a H, Miles M a. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;64(2):293–301.
84. Krauth-Siegel RL, Schöneck R. Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J [Internet].* 1995 Sep;9(12):1138–46.
85. Kuriyan J, Kong XP, Krishna TS, Sweet RM, Murgolo NJ, Field H, et al. X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 1991;88(19):8764–8.
86. Hunter WN, Bailey S, Habash J, Harrop SJ, Helliwell JR, Aboagye-Kwarteng T, et al. Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *J Mol Biol.* 1992;227(1):322–33.
87. Lantwin CB, Schlichting I, Kabsch W, Pai EF, Krauth-Siegel RL. The Structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione Reductase in the Oxidized and NADPH Reduced State. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 1994;18(2):161–73.
88. Karplus PA, Schulz GE. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution. *J Mol Biol.* 1989;210(1):163–80.
89. Karplus PA, Schulz GE. Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å

- resolution. *J Mol Biol.* 1987;195(3):701–29.
90. Fox KM, Karplus PA. The flavin environment in old yellow enzyme. An evaluation of insights from spectroscopic and artificial flavin studies. *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274(14):9357–62.
  91. Moreno-Mateos D. Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti- Leishmania. 2010.
  92. Krauth-Siegel RL, Bauer H, Schirmer RH. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew Chemie - Int Ed.* 2005;44(5):690–715.
  93. Sullivan FX, Shames SL, Walsh CT. Expression of *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase in *Escherichia coli*: overproduction, purification, and characterization. *Biochemistry.* 1989;28(12):4986–92.
  94. Berkholz DS, Faber HR, Savvides SN, Karplus PA. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *J Mol Biol* [Internet]. 2008 Oct 3 [cited 2014 Jan 9];382(2):371–84.
  95. Bohme CC, Arscott LD, Becker K, Schirmer RH, Williams CH. Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Comparison with the human enzyme. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2014 Jan 17];275(48):37317–23.
  96. Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol* [Internet]. 2003 Jul [cited 2014 Jan 9];19(7):320–8.
  97. Colotti G, Ilari A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids* [Internet]. 2011 Feb [cited 2014 Jan 9];40(2):269–85.
  98. Olin-Sandoval V, González-Chávez Z, Berzunza-Cruz M, Martínez I, Jasso-Chávez R, Becker I, et al. Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS J* [Internet]. 2012;279(10):1811–33.
  99. Comini MA, Flohé L. Trypanothione-Based Redox Metabolism of Trypanosomatids. In: *Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery.* 2013. p. 167–99.
  100. Roberts SC, Scott J, Gasteier JE, Jiang Y, Brooks B, Jardim A, et al. S-adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania donovani*: Molecular, genetic, and biochemical characterization of null mutants and overproducers. *J Biol Chem.* 2002;277(8):5902–9.
  101. Comini M a., Guerrero S a., Haile S, Menge U, Lünsdorf H, Flohé L. Validation of

- Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic Biol Med.* 2004;36(10):1289–302.
102. Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb a H, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol.* 2000;35(3):542–52.
  103. Tovar J, Wilkinson S, Mottram JC, Fairlamb a H. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in Leishmania by targeted replacement of the tryA gene locus. *Mol Microbiol.* 1998;29(2):653–60.
  104. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb a H, Tamar S, et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 1997;16(10):2590–8.
  105. Halgren TA. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *J Chem Inf Model.* 2009;49(2):377–89.
  106. Comini MA, Dirdjaja N, Kaschel M, Krauth-Siegel RL. Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *Int J Parasitol [Internet].* 2009;39(10):1059–62.
  107. Bernardes LSC, Zani CL, Carvalho I. Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. *Curr Med Chem [Internet].* 2013;20(21):2673–96.
  108. Jones DC, Ariza A, Chow WHA, Oza SL, Fairlamb AH. Comparative structural, kinetic and inhibitor studies of Trypanosoma brucei trypanothione reductase with T. cruzi. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;169(1):12–9.
  109. Lo Presti MS, Bazán PC, Strauss M, Báez AL, Rivarola HW, Paglini-Oliva P a. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Trop [Internet].* 2015;1–9.
  110. Richardson JL, Nett IRE, Jones DC, Abdille MH, Gilbert IH, Fairlamb AH. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. *ChemMedChem [Internet].* 2009 Aug [cited 2015 Jan 29];4(8):1333–40.
  111. Holloway GA, Charman WN, Fairlamb AH, Brun R, Kaiser M, Kostewicz E, et al. Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2824–33.
  112. Walton JGA, Jones DC, Kiuru P, Durie AJ, Westwood NJ, Fairlamb AH. Synthesis and Evaluation of Indatraline-Based Inhibitors for Trypanothione Reductase.

- ChemMedChem. 2011;6:321–8.
113. Patterson S, Jones DC, Shanks EJ, Frearson JA, Gilbert IH, Wyatt PG, et al. Synthesis and evaluation of 1-(1-(benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl) piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem*. 2009;4(8):1341–53.
  114. Spinks D, Shanks EJ, Cleghorn L a T, McElroy S, Jones D, James D, et al. Investigation of trypanothione reductase as a drug target in *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem* [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Jan 9];4(12):2060–9.
  115. Baiocco P, Poce G, Alfonso S, Cocozza M, Porretta GC, Colotti G, et al. Inhibition of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase by Azole-Based Compounds: a Comparative Analysis with Its Physiological Substrate by X-ray Crystallography. *ChemMedChem* [Internet]. 2013 Jul [cited 2014 Jan 9];8(7):1175–83.
  116. Saravanamuthu A, Vickers TJ, Bond CS, Peterson MR, Hunter WN, Fairlamb AH. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: A template for drug design. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29493–500.
  117. Beig M, Bender F, Gassel M, Krauth-Siegel RL, Selzer PM. Trypanothione Reductase: A Target Protein for a Combined in silico and in vitro Screening Approach. *Prep*. 2015;1–19.
  118. Lizzi F, Veronesi G, Belluti F, Bergamini C, López-Sánchez A, Kaiser M, et al. Conjugation of quinones with natural polyamines: toward an expanded antitrypanosomatid profile. *J Med Chem* [Internet]. 2012;55(23):10490–500.
  119. Gendron T, Lanfranchi DA, Davioud-Charvet E. Redox-Active Agents in Reactions Involving the Trypanothione/Trypanothione Reductase-based System to Fight Kinetoplastid Parasites. In: *Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery*. 2013. p. 405–28.
  120. Belluti F, Uliassi E, Veronesi G, Bergamini C, Kaiser M, Brun R, et al. Toward the Development of Dual-Targeted Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase/Trypanothione Reductase Inhibitors against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *ChemMedChem* [Internet]. 2014 Jan 8 [cited 2014 Jan 10];1–13.
  121. Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem*. 2011;11:2072–84.

122. Ayyari M, Salehi P, Ebrahimi SN, Zimmermann S, Portmann L, Krauth-Siegel RL, et al. Antitrypanosomal isothiocyanate and thiocarbamate glycosides from *moringa peregrina*. Vol. 80, *Planta Medica*. 2014. p. 86–9.
123. Lu J, Vodnala SK, Gustavsson AL, Gustafsson TN, Sjöberg B, Johansson HA, et al. Ebsulfur is a benzisothiazolone cytotoxic inhibitor targeting the trypanothione reductase of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2013;288(38):27456–68.
124. Ilari A, Baiocco P, Messori L, Fiorillo A, Boffi A, Gramiccia M, et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids* [Internet]. 2012 Feb [cited 2014 Jan 9];42(2–3):803–11.
125. Sharlow ER, Leimgruber S, Murray S, Lira A, Sciotti RJ, Hickman M, et al. Auranofin is an apoptosis-simulating agent with in vitro and in vivo anti-leishmanial activity. *ACS Chem Biol*. 2014;
126. Nordhoff A, Tziatzios C. Denaturation and reactivation of dimeric human glutathione reductase. *Eur J ...* [Internet]. 1997 [cited 2014 Jun 23];282:273–82.
127. Shimba N, Nomura AM, Marnett AB, Craik CS. Herpesvirus protease inhibition by dimer disruption. *J Virol*. 2004;78(12):6657–65.
128. Scott DE, Bayly AR, Abell C, Skidmore J. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;15(8):533–50.
129. Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: How and why. Vol. 13, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2005. p. 5013–20.
130. Nooren IM a. NEW EMBO MEMBER’S REVIEW: Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J*. 2003;22(14):3486–92.
131. Jones S, Thornton JM. Protein-protein interactions: A review of protein dimer structures. *Prog Biophys Mol Biol*. 1995;63(1):31–65.
132. Zhanhua C, Gan JG-K, Lei L, Sakharkar MK, Kanguane P. Protein subunit interfaces: heterodimers versus homodimers. *Bioinformation* [Internet]. 2005;1(2):28–39.
133. Hurtley SM, Helenius A. Protein oligomerization in the Endoplasmic Reticulum. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:277–307.
134. Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - Examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. Vol. 275, *FEBS Journal*. 2008.

- p. 4700–27.
135. Neet KE, Timm DE. Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* 1994;3(12):2167–74.
  136. Mei G, Di Venere A, Rosato N, Finazzi-Agrò A. The importance of being dimeric. Vol. 272, *FEBS Journal.* 2005. p. 16–27.
  137. Rumfeldt JAO, Galvagnion C, Vassall KA, Meiering EM. Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. Vol. 98, *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2008. p. 61–84.
  138. Gunasekaran K, Tsai CJ, Nussinov R. Analysis of ordered and disordered protein complexes reveals structural features discriminating between stable and unstable monomers. *J Mol Biol.* 2004;341(5):1327–41.
  139. Xu D, Tsai CJ, Nussinov R. Mechanism and evolution of protein dimerization. *Protein Sci.* 1998;7(3):533–44.
  140. Lupas A, Ponting C, Russell RB. On the evolution of protein folds: are similar motifs in different protein folds the result of .... *J Struct Biol [Internet].* 2001;
  141. Cardinale D, Salo-Ahen OMH, Ferrari S, Ponterini G, Cruciani G, Carosati E, et al. Homodimeric enzymes as drug targets. *Curr Med Chem.* 2010;17(9):826–46.
  142. Chandler D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature [Internet].* 2005;437(7059):640–7.
  143. Chothia C, Chothia C, Janin J, Janin J. Principles of protein-protein recognition. *Nature [Internet].* 1975;256(5520):705–8.
  144. Janin J, Chothia C. The structure of protein-protein recognition sites. Vol. 265, *Journal of Biological Chemistry.* 1990. p. 16027–30.
  145. Eisenberg D, McLachlan AD, Eisenberg D, McLachlan AD, McLachlan AD. Solvation energy in protein folding and binding. *Nature [Internet].* 1986;319(6050):199–203.
  146. Xu D, Lin SL, Nussinov R. Protein binding versus protein folding: the role of hydrophilic bridges in protein associations. *J Mol Biol [Internet].* 1997;265(1):68–84.
  147. Tsai CJ, Lin SL, Wolfson HJ, Nussinov R. Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci.* 1997;6(1):53–64.
  148. Horton N, Lewis M. Calculation of the free energy of association for protein complexes. *Protein Sci [Internet].* 1992;1:169–81.
  149. Frederick KK, Marlow MS, Valentine KG, Wand a J. Conformational entropy in molecular recognition by proteins. *Nature.* 2007;448(7151):325–9.



150. Grünberg R, Nilges M, Leckner J. Flexibility and Conformational Entropy in Protein-Protein Binding. *Structure*. 2006;14(4):683–93.
151. Honig B, Nicholls A. Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* [Internet]. 1995;268(5214):1144–9.
152. Koehl P. Electrostatics calculations: latest methodological advances. Vol. 16, *Current Opinion in Structural Biology*. 2006. p. 142–51.
153. Chen J, Brooks CL, Khandogin J. Recent advances in implicit solvent-based methods for biomolecular simulations. Vol. 18, *Current Opinion in Structural Biology*. 2008. p. 140–8.
154. Bashford D, Case DA. Generalized born models of macromolecular solvation effects. *Annu Rev Phys Chem* [Internet]. 2000;51:129–52.
155. Fogolari F, Brigo A, Molinari H. The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: A tool for structural biology. Vol. 15, *Journal of Molecular Recognition*. 2002. p. 377–92.
156. Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res*. 2000;33(12):889–97.
157. Srinivasan J, Cheatham TE, Cieplak P, Kollman PA, Case DA. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices. *J Am Chem Soc*. 1998;120(37):9401–9.
158. Bertoni C, Honig B, Alexov E. Poisson-Boltzmann calculations of nonspecific salt effects on protein-protein binding free energies. *Biophys J* [Internet]. 2007;92(6):1891–9.
159. Casciari D, Dell'Orco D, Fanelli F. Homodimerization of neurotensin 1 receptor involves helices 1, 2, and 4: Insights from quaternary structure predictions and dimerization free energy estimations. *J Chem Inf Model*. 2008;48(8):1669–78.
160. Clackson T, Wells J a. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* (80- ). 1995;267(5196):383–6.
161. Bogan AA, Thorn KS. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* [Internet]. 1998;280(1):1–9.
162. Keskin O, Ma B, Nussinov R. Hot regions in protein-protein interactions: The organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *J Mol Biol*. 2005;345(5):1281–94.
163. Halperin I, Wolfson H, Nussinov R. Protein-protein interactions: Coupling of

- structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking. *Structure*. 2004;12(6):1027–38.
164. Ma B, Elkayam T, Wolfson H, Nussinov R. Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(10):5772–7.
  165. Ma B, Nussinov R. Trp/Met/Phe hot spots in protein-protein interactions: potential targets in drug design. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2007;7(10):999–1005.
  166. Hu Z, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins Struct Funct Genet*. 2000;39(4):331–42.
  167. Gao Y, Wang R, Lai L. Structure-based method for analyzing protein-protein interfaces. *J Mol Model*. 2004;10(1):44–54.
  168. Kortemme T, Kim DE, Baker D. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Sci STKE* [Internet]. 2004;2004(219):pl2.
  169. Kortemme T, Baker D. A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002;99(22):14116–21.
  170. Thorn KS, Bogan AA. ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics* [Internet]. 2001;17(3):284–5.
  171. Fry DC. Protein-protein interactions as targets for small molecule drug discovery. Vol. 84, *Biopolymers - Peptide Science Section*. 2006. p. 535–52.
  172. DeLano WL. Unraveling hot spots in binding interfaces: Progress and challenges. Vol. 12, *Current Opinion in Structural Biology*. 2002. p. 14–20.
  173. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Hot spots - A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. Vol. 68, *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2007. p. 803–12.
  174. Tuncbag N, Kar G, Keskin O, Gursoy A, Nussinov R. A survey of available tools and web servers for analysis of protein-protein interactions and interfaces. *Brief Bioinform*. 2009;10(3):217–32.
  175. Brandsdal BO, Smalås a O. Evaluation of protein-protein association energies by free energy perturbation calculations. *Protein Eng*. 2000;13(4):239–45.
  176. Darnell SJ, Page D, Mitchell JC. An automated decision-tree approach to predicting protein interaction hot spots. *Proteins* [Internet]. 2007;68(4):813–23.
  177. Darnell SJ, LeGault L, Mitchell JC. KFC Server: interactive forecasting of protein

- interaction hot spots. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue).
178. Brinda K V, Vishveshwara S. Oligomeric protein structure networks: insights into protein-protein interactions. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2005;6:296.
  179. del Sol A, O'Meara P. Small-world network approach to identify key residues in protein-protein interaction. *Proteins.* 2005;58(3):672–82.
  180. Rudolph J. Inhibiting transient protein-protein interactions: lessons from the Cdc25 protein tyrosine phosphatases. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(3):202–11.
  181. Laurie ATR, Jackson RM. Methods for the prediction of protein-ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2006;7(5):395–406.
  182. Henrich S, Salo-Ahen OMH, Huang B, Rippmann F, Cruciani G, Wade RC. Computational approaches to identifying and characterizing protein binding sites for ligand design. *J Mol Recognit.* 2010;23(2):209–19.
  183. Arkin MR, McDowell RS, Randal M, DeLano WL, Hyde J, Luong TN, et al. Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(4):1603–8.
  184. Hyde J, Braisted AC, Randal M, Arkin MR. Discovery and characterization of cooperative ligand binding in the adaptive region of interleukin-2. *Biochemistry.* 2003;42(21):6475–83.
  185. Wong CF, Kua J, Zhang Y, Straatsma TP, McCammon JA. Molecular docking of balanol to dynamics snapshots of protein kinase A. *Proteins Struct Funct Genet.* 2005;61(4):850–8.
  186. Landon MR, Amaro RE, Baron R, Ngan CH, Ozonoff D, Andrew McCammon J, et al. Novel druggable hot spots in avian influenza neuraminidase H5N1 revealed by computational solvent mapping of a reduced and representative receptor ensemble. *Chem Biol Drug Des.* 2008;71(2):106–16.
  187. Lei M, Zavodszky MI, Kuhn LA, Thorpe MF. Sampling protein conformations and pathways. *J Comput Chem.* 2004;25(9):1133–48.
  188. Zavodszky MI, Lei M, Thorpe MF, Day AR, Kuhn LA. Modeling correlated main-chain motions in proteins for flexible molecular recognition. *Proteins Struct Funct Genet.* 2004;57(2):243–61.
  189. Wells S, Menor S, Hesperheide B, Thorpe MF. Constrained geometric simulation of diffusive motion in proteins. *Phys Biol* [Internet]. 2005;2(4):S127–36.
  190. Ma J. Usefulness and limitations of normal mode analysis in modeling dynamics of

- biomolecular complexes. Vol. 13, Structure. 2005. p. 373–80.
191. De Groot BL, Van Aalten DMF, Scheek RM, Amadei A, Vriend G, Berendsen HJC. Prediction of protein conformational freedom from distance constraints. *Proteins Struct Funct Genet*. 1997;29(2):240–51.
  192. Seeliger D, Haas J, de Groot BL. Geometry-Based Sampling of Conformational Transitions in Proteins. *Structure*. 2007;15(11):1482–92.
  193. Eyrisch S, Helms V. Transient pockets on protein surfaces involved in protein-protein interaction. *J Med Chem*. 2007;50(15):3457–64.
  194. Brady GP, Stouten PFW. Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. *J Comput Aided Mol Des*. 2000;14(4):383–401.
  195. Eyrisch S, Helms V. What induces pocket openings on protein surface patches involved in protein - Protein interactions? *J Comput Aided Mol Des*. 2009;23(2):73–86.
  196. Gonzalez-Ruiz D, Gohlke H. Targeting Protein-Protein Interactions with Small Molecules: Challenges and Perspectives for omputational Binding Epitope Detection and Ligand Finding. *Curr Med Chem [Internet]*. 2006;13(22):2607–25.
  197. McMillan K, Adler M, Auld DS, Baldwin JJ, Blasko E, Browne LJ, et al. Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1506–11.
  198. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*. 2004;432(7019):862–5.
  199. Tuccinardi T. Docking-based virtual screening: Recent developments. *Comb Chem High Throughput Screen [Internet]*. 2009;12(3):303–14.
  200. Baroni M, Cruciani G, Sciabola S, Perruccio F, Mason JS. A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): Theory and application. *J Chem Inf Model*. 2007;47(2):279–94.
  201. Schneider G, Fechner U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2005;4(8):649–63.
  202. Mauser H, Guba W. Recent developments in de novo design and scaffold hopping. *Curr Opin Drug Discov Devel [Internet]*. 2008;11(3):365–74.
  203. Che Y, Brooks BR, Marshall GR. Development of small molecules designed to modulate protein-protein interactions. *J Comput Aided Mol Des*. 2006;20(2):109–30.
  204. Che Y, Marshall GR. Privileged scaffolds targeting reverse-turn and helix recognition. *Expert Opin Ther Targets [Internet]*. 2008;12(1):101–14.
  205. Jesús Pérez De Vega M, Martín-Martínez M, González-Muñiz R. Modulation of

- Protein-Protein Interactions by Stabilizing/Mimicking Protein Secondary Structure Elements. *Curr Top Med Chem*. 2007;7:33–62.
206. Zondlo NJ, Schepartz A. Highly specific DNA recognition by a designed miniature protein [2]. Vol. 121, *Journal of the American Chemical Society*. 1999. p. 6938–9.
207. Hickman AB, Palmer I, Engelman A, Craigie R, Wingfield P. Biophysical and enzymatic properties of the catalytic domain of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* [Internet]. 1994;269(46):29279–87.
208. Sourgen F, Maroun RG, Frère V, Bouziane M, Auclair C, Troalen F, et al. A synthetic peptide from the human immunodeficiency virus type-1 integrase exhibits coiled-coil properties and interferes with the in vitro integration activity of the enzyme. Correlated biochemical and spectroscopic results. *Eur J Biochem* [Internet]. 1996 Sep 15;240(3):765–73.
209. Zhao L, O'Reilly MK, Shultz MD, Chmielewski J. Interfacial peptide inhibitors of HIV-1 integrase activity and dimerization. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2003;13(6):1175–7.
210. Maroun RG, Gayet S, Benleulmi MS, Porumb H, Zargarian L, Merad H, et al. Peptide inhibitors of HIV-1 integrase dissociate the enzyme oligomers. *Biochemistry*. 2001;40(46):13840–8.
211. Schmidt U, Darke PL. Dimerization and activation of the herpes simplex virus type 1 protease. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(12):7732–5.
212. Shimba N, Nomura AM, Marnett AB, Craik CS. Herpesvirus protease inhibition by dimer disruption. *J Virol*. 2004;78(12):6657–65.
213. Geda P, Patury S, Ma J, Bharucha N, Dobry CJ, Lawson SK, et al. A small molecule-directed approach to control protein localization and function. *Yeast*. 2008;25(8):577–94.
214. Prasanna V, Bhattacharjya S, Balaran P. Synthetic interface peptides as inactivators of multimeric enzymes: Inhibitory and conformational properties of three fragments from *Lactobacillus casei* thymidylate synthase. *Biochemistry*. 1998;37(19):6883–93.
215. Agarwalla S, Gokhale RS, Santi D V, Balaran P. Covalent tethering of the dimer interface annuls aggregation in thymidylate synthase. *Protein Sci* [Internet]. 1996;5(2):270–7.
216. Maithal K, Ravindra G, Nagaraj G, Singh SK, Balaran H, Balaran P. Subunit interface mutation disrupting an aromatic cluster in *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: effect on dimer stability. *Protein Eng*. 2002;15(7):575–84.

217. Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*. 1997;36(32):9655–62.
218. Singh SK, Maithal K, Balaram H, Balaram P. Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: Inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Lett*. 2001;501(1):19–23.
219. Olivares-Illana V, Rodríguez-Romero A, Becker I, Berzunza M, García J, Pérez-Montfort R, et al. Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2007 Oct 31;1(1):e1.
220. Téllez-Valencia A, Olivares-Illana V, Hernández-Santoyo A, Pérez-Montfort R, Costas M, Rodríguez-Romero A, et al. Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J Mol Biol*. 2004;341(5):1355–65.
221. Zhang ZY, Poorman RA, Maggiora LL, Heinrikson RL, Kézdy FJ. Dissociative inhibition of dimeric enzymes: Kinetic characterization of the inhibition of HIV-1 protease by its COOH-terminal tetrapeptide. *J Biol Chem*. 1991;266(24):15591–4.
222. Bannwarth L, Rose T, Dufau L, Vanderesse R, Dumond J, Jamart-Grégoire B, et al. Dimer disruption and monomer sequestration by alkyl tripeptides are successful strategies for inhibiting wild-type and multidrug-resistant mutated HIV-1 proteases. *Biochemistry*. 2009;48(2):379–87.
223. Frutos S, Rodríguez-Mías RA, Madurga S, Collinet B, Reboud-Ravaux M, Ludevid D, et al. Disruption of the HIV-1 protease dimer with interface peptides: structural studies using NMR spectroscopy combined with [2-(13)C]-Trp selective labeling. *Biopolymers* [Internet]. 2007;88(2):164–73.
224. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* [Internet]. 1995;59(1):94–123.
225. McDonnell JM. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2001;5(5):572–7.
226. Acharya KR, Lloyd MD. The advantages and limitations of protein crystal structures. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(1):10–4.
227. Molteni V, Greenwald J, Rhodes D, Hwang Y, Kwiatkowski W, Bushman FD, et al. Identification of a small-molecule binding site at the dimer interface of the HIV

- integrase catalytic domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* [Internet]. 2001 Apr;57(Pt 4):536–44.
228. Sluis-Cremer N, Hamamouch N, San Félix A, Velazquez S, Balzarini J, Camarasa M-J. Structure-activity relationships of [2',5'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5'-(4'-amino-1,2'-oxathiole-2',2'-dioxide)thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J Med Chem*. 2006;49(16):4834–41.
  229. Copeland RA. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. [Internet]. Vol. 46, *Methods of biochemical analysis*. 2005. 1-265 p.
  230. Copeland RA. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Second Edition [Internet]. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. 416 p.
  231. Leskovac V. *Comprehensive Enzyme Kinetics* [Internet]. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. 438 p.
  232. Copeland RA. *Methods for Protein Analysis* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1994.
  233. Lundblad RL. *Chemical Reagents for Protein Modification - Contents*. *Chemical Reagents for Protein Modification*. 2004. 670 p.
  234. Morrison JF, Walsh CT. The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* [Internet]. 1988;61:201–301.
  235. Tipton KF. Enzyme kinetics in relation to enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1973 Dec;22(23):2933–41.
  236. KITZ R, WILSON IB. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* [Internet]. 1962 Oct;237:3245–9.
  237. Morrison JF. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1982 Mar;7(3):102–5.
  238. Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, et al. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Nov 8;91(23):11202–6.
  239. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.
  240. Sanchez Murcia PA. Interacciones Proteína-Proteína Como Diana Terapéutica En La Transcriptasa Inversa Del VIH-1 Y En La Tripanotión Reductasa De Leishmania

- infantum. 2013.
241. Ruiz-Santaquiteria M. De péptidos a peptidomiméticos en la búsqueda de inhibidores novedosos de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (Li-TryR). Universidad Complutense de Madrid; 2016.
  242. Cortés Cabrera Á. Desarrollo de una plataforma informática para la búsqueda de nuevos fármacos. Universidad Autonoma de Madrid; 2013.
  243. Leatherbarrow RJ. GraFit Version 7. Horley, U.K.: Erithacus Software Ltd.; 2009.
  244. Russell DW, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual [Internet]. Cold Spring Harbour. 2001. 2231 p.
  245. Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem J*. 2003;369(Pt 3):529–37.
  246. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat*. 2011;10(2):128–34.
  247. van den Bogaart E, Schoone GJ, England P, Faber D, Orrling KM, Dujardin J-C, et al. Simple Colorimetric Trypanothione Reductase-Based Assay for High-Throughput Screening of Drugs against *Leishmania* Intracellular Amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jan 30];58(1):527–35.
  248. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. In: *Methods in Enzymology Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* [Internet]. 1996. p. 383–402.
  249. Mount DW. Using BLOSUM in Sequence Alignments. *CSH Protoc* [Internet]. 2008;2008:pdb.top39.
  250. Wheeler D. Selecting the right protein-scoring matrix. *Curr Protoc Bioinformatics* [Internet]. 2002;Chapter 3:Unit 3.5.
  251. Pearson WR. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. In: *Current Protocols in Bioinformatics* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 1028–40.
  252. Bailey TL, Boden M, Buske F a., Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 2):202–8.
  253. Le SQ, Lartillot N, Gascuel O. Phylogenetic mixture models for proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363(1512):3965–76.



254. Le SQ, Gascuel O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2008;25(7):1307–20.
255. Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev* [Internet]. 2012;13(5):303–14.
256. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N Y) [Internet]. 1985 Jul;39(4):783.
257. Hirt RP, Muller S, Embley TM, Coombs GH. The diversity & evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends Parasitol*. 2002;18(7):302–8.
258. Opperdoes FR, Szikora JP. In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;147(2):193–206.
259. Rosano GL, Ceccarelli E a. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5(April):1–17.
260. Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2011 Dec [cited 2014 Oct 20];80(2):283–93.
261. Lively CR, McFarland JT. The EH2 reduced intermediate of glutathione reductase contains oxidised flavin-while EH4 does not. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1986 Apr 14;136(1):22–9.
262. Martyn DC, Jones DC, Fairlamb AH, Clardy J. High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007;17(5):1280–3.
263. Cunningham ML, Fairlamb a H. Trypanothione Reductase From *Leishmania-Donovani* - Purification, Characterization and Inhibition By Trivalent Antimonials. *Eur J Biochem*. 1995;230:460–468 ST-TRYPANOTHIONE REDUCTASE FROM LEISHMA.
264. Harlow E, Lane D. *Antibodies A Laboratory Manual*. New York: CSH; 1988.
265. Guo W, Wisniewski JA, Ji H. Hot spot-based design of small-molecule inhibitors for protein–protein interactions. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2014;24(11):2546–54.
266. Nordhoff A, Bücheler US, Werner D, Schirmer RH. Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446-->Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry* [Internet]. 1993 Apr 20;32(15):4060–6.
267. Francisco-marquez M, Galano A. Role of the Sulfur Atom on the Reactivity of Methionine toward OH Radicals : Comparison with Norleucine. *J Phys Chem B*. 2009;113:4947–52.

268. Cunningham BC, Wells J a. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*. 1989;244(4908):1081–5.
269. Derda R (Ed. . Peptide Libraries [Internet]. Derda R, editor. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York; 2015. 278 pp.
270. Henchey LK, Jochim AL, Arora PS. Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the  $\alpha$ -helical conformation. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12(6):692–7.
271. Sánchez-Murcia P a., Ruiz-Santaquiteria M, Toro M a., de Lucio H, Jiménez MÁ, Gago F, et al. Comparison of hydrocarbon-and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase. *RSC Adv* [Internet]. 2015;5(69):55784–94.
272. Klett J, Santos HG Dos, Perona A, Francis SM, Priego EM, Gago F, et al. CRDOCK : An Ultrafast Multipurpose Protein – Ligand Docking Tool A´ lvaro Corte s. 2012;
273. Eyer P, Podhradský D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman’s reagent. *Anal Biochem*. 1986;153:57–66.
274. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* [Internet]. 1975 Jul 25 [cited 2014 Jan 20];250(14):5475–80.
275. Krauth-Siegel RL, Arscott LD, Schönleben-Janas a, Schirmer RH, Williams CH. Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry*. 1998;37(40):13968–77.
276. Bonse S, Santelli-Rouvier C, Barbe J, Krauth-Siegel RL. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. *J Med Chem*. 1999;42(26):5448–54.
277. Weissmann G. Aspirin. *Sci Am* [Internet]. 1991 Jan;264(1):84–90.
278. Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem*. 2003;316(2):223–31.
279. Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill* [Internet]. 2013 Jul 25;18(30):20540.
280. Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* [Internet]. 2008 Dec 23;103 Suppl(S1):S65-8.
281. Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martinez S, Pratlong F, Balard Y, et al. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus

- outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2009 Dec;9(6):687–94.
282. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglia E, Genchi C, et al. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2008 Feb;13(2):256–64.
283. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2011;11(16):2060–71.
284. Bodyl A, Mackiewicz P, Milanowski R. Did trypanosomatid parasites contain a eukaryotic alga-derived plastid in their evolutionary past? *J Parasitol* [Internet]. 2010 Apr;96(2):465–75.
285. Field MC, Horn D, Fairlamb AH, Ferguson MAJ, Gray DW, Read KD, et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017;
286. Spinks D, Torrie LS, Thompson S, Harrison JR, Frearson JA, Read KD, et al. Design, synthesis and biological evaluation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase inhibitors. *ChemMedChem* [Internet]. 2012 Jan 2;7(1):95–106.
287. Saccoliti F, Angiulli G, Pupo G, Pescatori L, Madia VN, Messori A, et al. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. 2017;32(1):304–10.
288. da Rosa R, de Moraes MH, Zimmermann LA, Schenkel EP, Steindel M, Bernardes LSC. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2017;128:25–35.
289. Chacón-Vargas K, Noguera-Torres B, Sánchez-Torres L, Suarez-Contreras E, Villalobos-Rocha J, Torres-Martinez Y, et al. Trypanocidal Activity of Quinoxaline 1,4 Di-N-oxide Derivatives as Trypanothione Reductase Inhibitors. *Molecules* [Internet]. 2017;22(2):220.
290. Sarma GN, Savvides SN, Becker K, Schirmer M, Schirmer RH, Karplus PA. Glutathione Reductase of the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*: Crystal Structure and Inhibitor Development. *J Mol Biol* [Internet]. 2003 May [cited 2014 Jun 23];328(4):893–907.
291. Ghosh AK, Saini S, Das S, Mandal A, Hasan Sardar A, Yousuf Ansari M, et al.

- Glucose-6-phosphate dehydrogenase and Trypanothione reductase interaction protects *Leishmania donovani* from metalloid mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017;106(September 2016):10–23.
292. Angiulli G, Lantella A, Forte E, Angelucci F, Colotti G, Ilari A, et al. *Leishmania infantum* trypanothione reductase is a promiscuous enzyme carrying an NADPH:O<sub>2</sub> oxidoreductase activity shared by glutathione reductase. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2015;
293. Xiao Y, Isaacs S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Blocking with Bovine Serum Albumin (BSA). *J Immunol Methods*. 2013;384:148–51.
294. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2013;133(9):e12.
295. Gilles AM, Marliere P, Rose T, Sarfati R, Longin R, Meier A, et al. Conservative replacement of methionine by norleucine in *Escherichia coli* adenylate kinase. *J Biol Chem*. 1988;263(17):8204–9.
296. Estell DA, Graycar TP, Wells JA. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J Biol Chem* [Internet]. 1985 Jun 10 [cited 2017 Mar 21];260(11):6518–21.
297. Rosenberg S, Barr PJ, Najarian RC, Hallewell RA. Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human alpha-antitrypsin. *Nature* [Internet]. 1984 [cited 2017 Mar 21];312(5989):77–80.
298. CUNNINGHAM ML, ZVELEBIL MJM, FAIRLAMB AH. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *Eur J Biochem* [Internet]. 1994 Apr [cited 2017 Mar 22];221(1):285–95.
299. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(5):3217–66.
300. Deonarain MP, Scrutton NS, Perham RN. Engineering surface charge. 2. A method for purifying heterodimers of *Escherichia coli* glutathione reductase. *Biochemistry* [Internet]. 1992 Feb;31(5):1498–504.
301. Kim TH, Mehrabi P, Ren Z, Sljoka A, Ing C, Bezginov A, et al. The role of dimer asymmetry and protomer dynamics in enzyme catalysis. *Science* (80- ) [Internet]. 2017;355(6322):eaag2355.
302. Kossiakoff AA. Protein dynamics investigated by neutron diffraction. *Methods Enzymol* [Internet]. 1986;131:433–47.

303. Klinman JP. An integrated model for enzyme catalysis emerges from studies of hydrogen tunneling. *Chem Phys Lett* [Internet]. 2009 Mar;471(4–6):179–93.
304. Benkovic SJ, Hammes-Schiffer S. A perspective on enzyme catalysis. *Science* (80- ) [Internet]. 2003;301(5637):1196–202.
305. Hammes-Schiffer S. Hydrogen Tunneling and Protein Motion in Enzyme Reactions. 2005;39(2):93–100.
306. Klinman JP, Kohen A. Hydrogen Tunneling Links Protein Dynamics to Enzyme Catalysis. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2013 Jun 2;82(1):471–96.
307. Cha Y, Murray C, Klinman J. Hydrogen tunneling in enzyme reactions. *Science* (80- ) [Internet]. 1989 Mar 10;243(4896):1325–30.
308. Sutcliffe MJ, Scrutton NS. A new conceptual framework for enzyme catalysis: Hydrogen tunneling coupled to enzyme dynamics in flavoprotein and quinoprotein enzymes. *Eur J Biochem*. 2002;269(13):3096–102.
309. Toro M a., Sánchez-Murcia P a., Moreno D, Ruiz-Santaquiteria M, Alzate JF, Negri A, et al. Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides. *ChemBioChem*. 2013;14(10):1212–7.
310. Makowski L, Rodi DJ, Mandava S, Minh DDL, Gore DB, Fischetti RF. Molecular Crowding Inhibits Intramolecular Breathing Motions in Proteins. *J Mol Biol* [Internet]. 2008 Jan;375(2):529–46.
311. Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*. 2006;24(10):1241–52.
312. Chu Q, Moellering RE, Hilinski GJ, Kim Y-W, Grossmann TN, Yeh JT-H, et al. Towards understanding cell penetration by stapled peptides. *Med Chem Commun* [Internet]. 2015;6(1):111–9.
313. Bock ME, Garutti C, Guerra C. Effective Labelling of molecular surface points for cavity detection and location of putative binding sites. *Proc Life Sci Soc Syst Bioinforma Conf August*. 2007;6:263–74.
314. Sánchez-Murcia PA, Ruiz-Santaquiteria M, Toro MA, de Lucio H, Jiménez MÁ, Gago F, et al. Comparison of hydrocarbon-and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase. *RSC Adv* [Internet]. 2015;5(69):55784–94.
315. ÓFágáin C. Stabilizing protein function [Internet]. Berlin ; Springer,; 1997 [cited 2017 Mar 29].

316. Cardinale D, Guaitoli G, Tondi D, Luciani R, Henrich S, Salo-Ahen OMH, et al. Protein-protein interface-binding peptides inhibit the cancer therapy target human thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011 Aug 23;108(34):E542–9.
317. Singh DR, Pasquale EB, Hristova K. A small peptide promotes EphA2 kinase-dependent signaling by stabilizing EphA2 dimers. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2016;1860(9):1922–8.
318. Milroy LG, Bartel M, Henen MA, Leysen S, Adriaans JMC, Brunsveld L, et al. Stabilizer-Guided Inhibition of Protein-Protein Interactions. *Angew Chemie - Int Ed*. 2015;54(52):15720–4.
319. Cirillo D, Pentimalli F, Giordano A. Peptides or small molecules? Different approaches to develop more effective CDK inhibitors. *Curr Med Chem* [Internet]. 2011;18(19):2854–66.
320. Talmadge JE. Pharmacodynamic aspects of peptide administration biological response modifiers. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;33(3):241–52.
321. Bradley M, Bücheler US, Walsh CT, Buecheler US, Walsh CT. Redox enzyme engineering: conversion of human glutathione reductase into a trypanothione reductase. *Biochemistry* [Internet]. 1991 Jun 25 [cited 2014 Jan 17];30(25):6124–7.
322. Henderson GB, Murgolo NJ, Kuriyan J, Osapay K, Kominos D, Berry a, et al. Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991;88(19):8769–73.
323. Davis NK, Greer S, Jones-Mortimer MC, Perham RN. Isolation and mapping of glutathione reductase-negative mutants of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol*. 1982;128(7):1631–4.
324. Nordhoff A, Tziatzios C, Broek JA, Schott MK, Kalbitzer H-R, Becker K, et al. Denaturation and Reactivation of Dimeric Human Glutathione Reductase. An Assay for Folding Inhibitors. *Eur J Biochem* [Internet]. 1997 Apr 15 [cited 2014 Jan 29];245(2):273–82.
325. Buchholz K, Schirmer RH, Eubel JK, Akoachere MB, Dandekar T, Becker K, et al. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(1):183–91.
326. Chung PM, Cappel RE, Gilbert HF. Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 1991;288(1):48–53.
327. Gamcsik MP, Kasibhatla MS, Teeter SD, Colvin OM. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers* [Internet]. 2012;17(8):671–91.

328. Hwang GH, Ryu JM, Jeon YJ, Choi J, Han HJ, Lee Y-M, et al. The role of thioredoxin reductase and glutathione reductase in plumbagin-induced, reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cell lines. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015;765:384–93.
329. Zhang YA, Hempelmann E, Schirmer RH. Glutathione reductase inhibitors as potential antimalarial drugs. Effects of nitrosoureas on *Plasmodium falciparum* in vitro. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(5):855–60.
330. Dubois VL, Platel DF, Pauly G, Tribouley-Duret J. *Plasmodium berghei*: implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance in vivo. *Exp Parasitol* [Internet]. 1995 Aug;81(1):117–24.
331. Thieme R, Pai EF, Schirmer RH, Schulz GE. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*. 1981;152(4):763–82.
332. Jacoby EM, Schlichting I, Lantwin CB, Kabsch W, Krauth-Siegel RL. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase-mepacrine complex. *Proteins* [Internet]. 1996;24(1):73.
333. Burlingham BT, Widlanski TS. An Intuitive Look at the Relationship of  $K_i$  and  $IC_{50}$ : A More General Use for the Dixon Plot. *J Chem Educ* [Internet]. 2003;80(2):214.
334. Yung-Chi C, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 1973;22(23):3099–108.

## ANEXOS

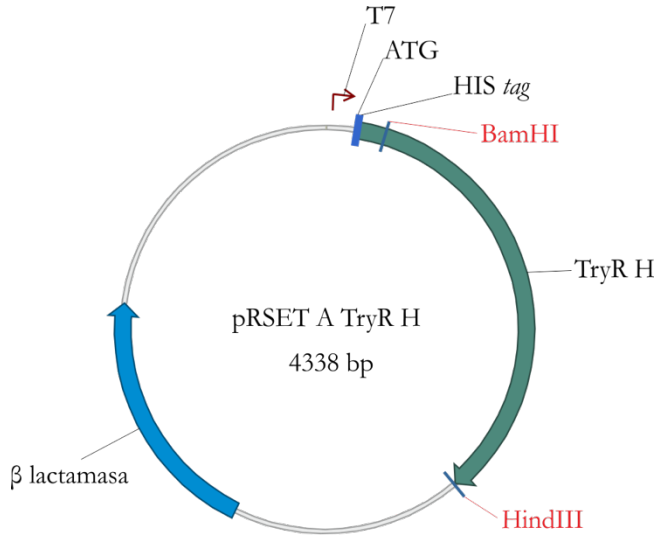
---



## **ANEXO I – Genes y Proteínas Empleadas**

# Tripanotión Reductasa H

## Plásmido



| ELEMENTO    | SITIO |
|-------------|-------|
| Promotor T7 | 20    |
| ATG inicial | 100   |
| His Tag     | 112   |
| BamHI       | 203   |
| HindIII     | 1685  |
| Stop        | 1681  |

## Oligonucleótidos

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| <b>Forward</b> | CCCGGATCCATGTCCCGCGGTACGA  |
| <b>Reverse</b> | CCCAAGCTTTCAGAGGTTGCTGCTGA |

## Gen

En azul se muestra la secuencia que codifica para el HIS tag y en verde el ATG inicial de la TryR.

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGG  
 ATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCATGTCCTCCCGCGGTACGACCTCGTGGTGCCTGG  
 CGCCGGATCTGGAGGTCTGGAGGCGGGATGGAACGCGGCCGTCACGCACAAGAAGAAGGTGGCCGTCGTC  
 GATGTGCAGGCGACGCACGGTCCGCCGCTCTTCGCTGCGCTCGGCGGCACGTGCGTGAACGTCGGCTGCG  
 TGCCAAAGAACTCATGGTGACAGGTGCCAGTACATGGACCTGATCCGTGAGTCTGGCGGCTTCGGATG  
 GGAGATGGACCGGAATCGCTCTGCCCAACTGGAAGACGCTCATCGCCGCAAGAACAAGGTGGTGAAC  
 AGCATCAACGAGAGCTACAAGAGCATGTTTCGCTGATACGGAGGGCCTCAGCTTTCACATGGGCTTCGGTG  
 CCCTTCAAGACGCTCACACGGTGGTGGTGCGAAGTCGGAAGACCCACACAGCGACGTGCTGGAGACCCT  
 CGACACGGAGTACATCCTCATTGCCACCGGCTCCTGGCCGACGCGCCTCGGAGTCCCCGGCGACGAGTTC  
 TGCATCACGAGCAACGAGGCCTTCTACCTCGAGGATGCCCCAAGCGGATGCTGTTCGCTCGGCGGGCT  
 ACATCGCCGTTGAGTTTGCCGGCATCTTCAACGGCTACAAGCCCTGCGGTGGCTATGTGACCTGTGCTA  
 CCGCGGCGATCTTATTTTGC GCGGCTTCGATACAGAGGTGCGCAAGAGCCTGACGAAGCAGCTGGGGCG  
 AACGGAATAAGAGTGCGTACAACTTGAACCCGACGAAGATCACGAAGAATGAGGACGGCTCGAATCACG  
 TTCACTTCAACGATGGCACGGAGGAGGACTACGATCAGGTTCATGCTCGCGATCGGTGCGGTGCCGCGCTC  
 GCAGGCACTACAGCTCGACAAGGCCGGCTCCGAACAGGAAAGAACGGTGCCGTGCAGGTGACGCGTAT  
 TCGAAGACATCGGTGGACAACATCTACGCCATCGGCGACGTGACGAACCGCGTGATGTTGACGCCGGTGG  
 CCATCAACGAAGGCCCGCCTTCGTTGAAACCGTCTTCGGTGGCAAGCCCCGCGCCACCACCACACGAA  
 GGTGCGGTGCGCCGTGTTCTCCATACCGCCGATCGGCACGTGCGGCATGACGGAGGAGGAGGCGGCGAAG  
 AACTACGAAACCGTCGCCGTGTACGCGAGTCTTTCACGCCCTTATGCACAACATCAGCGGCAGCAAGC

ACAAGGAATTCATGATCCGCATCATCACGAACGAATCCAACGGCGAGGTTCTGGGTGTTACATGCTCGG  
 CGACAGTGCCTGAGATCATCCAGAGCGTCGGCATTTCATGAAGATGGGTGCCAAGATCAGCGACTTC  
 CACAGCACCATCGGAGTCCACCCGACGAGCGCGGAGGAGCTCTGCTCCATGCGCACCCAGCGTACTTCT  
 ACGAGAGTGGCAAGCGCGTCGAAAAGCTCAGCAGCAACCTC\*

### Proteína

En azul se muestra la secuencia que codifica para el HIS *tag* y en verde la metionina inicial de la TryR.

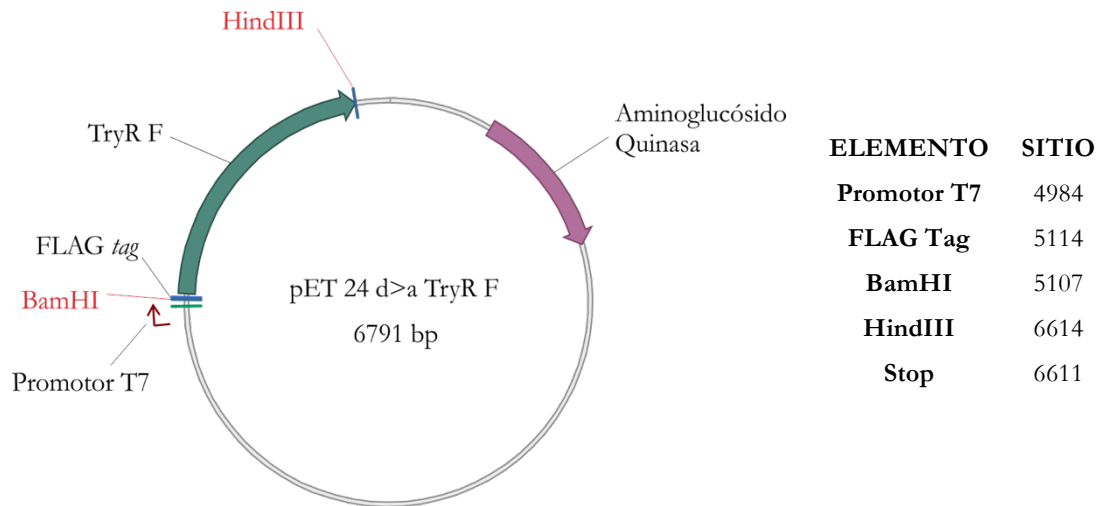
MRGS **HHHHHH**GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGS **M**SRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTYKKKVAVI  
 DAQATHGPPFFAALGGTCVNVGCVPKKLMVTGAQYMDLIRESGGFGWEMNRESLCPNWKTLIAAKNKVVN  
 DINESYKSMFADTEGLSFHMGFGALQDAHTVLRKSEDPNSDVLETLDTEYILIATGSWPTRLGVPDEF  
 CITSNEAFYLEDAPKRMLCVGGGYIAVEFAGIFNGYKPRGGYVDLCYPGDILRGFDTEVRKSLTKQLGA  
 NGIRVRTNLNPTKITKNEDGSNHVHFNDGTEEDYDQVMLAIGRVPRSQALQLDKVGVQTGKNGAVQVDAY  
 SKTSVDNIYAIGDVTNRVMLTPVAINEGAAFVETVFGGKPRATDHTKVACAVFSIPPIGTCGMTEEAAAK  
 NHETVAVYESCFTPLMHNISGSKHKEFMIRIITNQPTGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICMKMGAKISDF  
 HSTIGVHPTSAEELCSMHTPAYFYESGKRVEKLSNL

### Propiedades de la Proteína

| Análisis                        | Proteína Completa |
|---------------------------------|-------------------|
| Tamaño                          | 527               |
| Peso Molecular (MW)             | 57176.90 Da       |
| 1 µg                            | 17.490 pMoles     |
| Coefficiente de Extinción Molar | 51530             |
| 1 A[280]                        | 1.11 mg/ml        |
| A[280] de 1 mg/ml               | 0.90 AU           |
| Punto Isoeléctrico              | 5.89              |
| Carga a pH 7.0                  | -10.62            |

# Tripanotión Reductasa F

## Plásmido



## Oligonucleótidos

**Forward** GGGGAGCTCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGCCCTGCTGCCCCGAGC  
**Reverse** GGGAAAGCTTTCAACGAAGTGTGACCAGC

## Gen

En rojo se muestra la secuencia que codifica para el FLAG tag y en verde el ATG inicial de la TryR.

ATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCC **SACTACAAAGACGACGACGACAAAGATG** TCCCGCGCG  
TACGACCTCGTGGTGTCTGGCGCCGATCTGGAGGTCTGGAGGCGGGATGGAACGCGGCCGTACGCACA  
AGAAGAAGGTGGCCGTCGTCGATGTGCAGGCGACGACGGTCCGCGCTCTTCGCTGCGCTCGGCGGCAC  
GTGCGTGAACGTCGGCTGCGTGCCAAAGAACTCATGGTGACAGGTGCCAGTACATGGACCTGATCCGT  
GAGTCTGGCGGCTTCGGATGGGAGATGGACCGGAATCGCTCTGCCCAACTGGAAGACGCTCATCGCCG  
CGAAGAACAAGGTGGTGAACAGCATCAACGAGAGCTACAAGAGCATGTTTCGCTGATACGGAGGGCCTCAG  
CTTTACATGGGCTTCGGTGCCCTTCAAGACGCTCACACGGTGGTGGTGGCGCAAGTCGGAAGACCCACAC  
AGCGACGTGCTGGAGACCCTCGACACGGAGTACATCCTCATTGCCACCGGCTCCTGGCCGACGCGCCTCG  
GAGTCCCCGGCGACGAGTCTGCATCACGAGCAACGAGGCCCTTACCTCGAGGATGCCCCAAGCGGAT  
GCTGTGCGTCCGGCGGCGGCTACATCGCCGTTGAGTTTGCCGGCATCTTCAACGGCTACAAGCCCTGCGGT  
GGCTATGTGTCGACCTGTGCTACCGCGGCGATCTTATTTTGC GCGGCTTCGATACAGAGGTGCGCAAGAGCC  
TGACGAAGCAGCTGGGGCGAACGGAATAAGAGTGCGTACAAACTTGAACCCGACGAAGATCACGAAGAA  
TGAGGACGGCTCGAATCACGTTCACTTCAACGATGGCACGGAGGAGGACTACGATCAGGTCATGCTCGCG  
ATCGGTGCGCTGCCGCGCTCGCAGGCACTACAGTCTCGACAAGGCCGGCGTCCGAACAGGAAAGAACGGTG  
CCGTGCAGGTGACGCGTATTCGAAGACATCGGTGGACAACATCTACGCCATCGGCGACGTGACGAACCG  
CGTGATGTTGACCCGGTGGCCATCAACGAAGGCGCCGCTTCGTTGAAACCGTCTTCGGTGGCAAGCCC  
CGCGCCACCGACCACGAAGGTGCGGTGCGCCGTGTTCTCCATACCGCCGATCGGCACGTGCGGCATGA  
CGGAGGAGGAGGCGGCAAGAACTACGAAACCGTCCCGTGTACGCGAGCTCCTTACGCCCCTTATGCA  
CAACATCAGCGGCAGCAAGCACAAGGAATTCATGATCCGCATCATCACGAACGAATCCAACGGCGAGGTT  
CTGGGTGTTACATGCTCGGCGACAGTGCCTGAGATCATCCAGAGCGTCGGCATTTCATGAAGATGG

GTGCCAAGATCAGCGACTTCCACAGCACCATCGGAGTCCACCCGACGAGCGCCGAGGAGCTCTGCTCCAT  
GCGCACCCAGCGTACTTCTACGAGAGTGGCAAGCGCGTCGAAAAGCTCAGCAGCAACCTC

## Proteína

En rojo se muestra la secuencia que codifica para el FLAG *tag* y en verde la metionina inicial de la TryR.

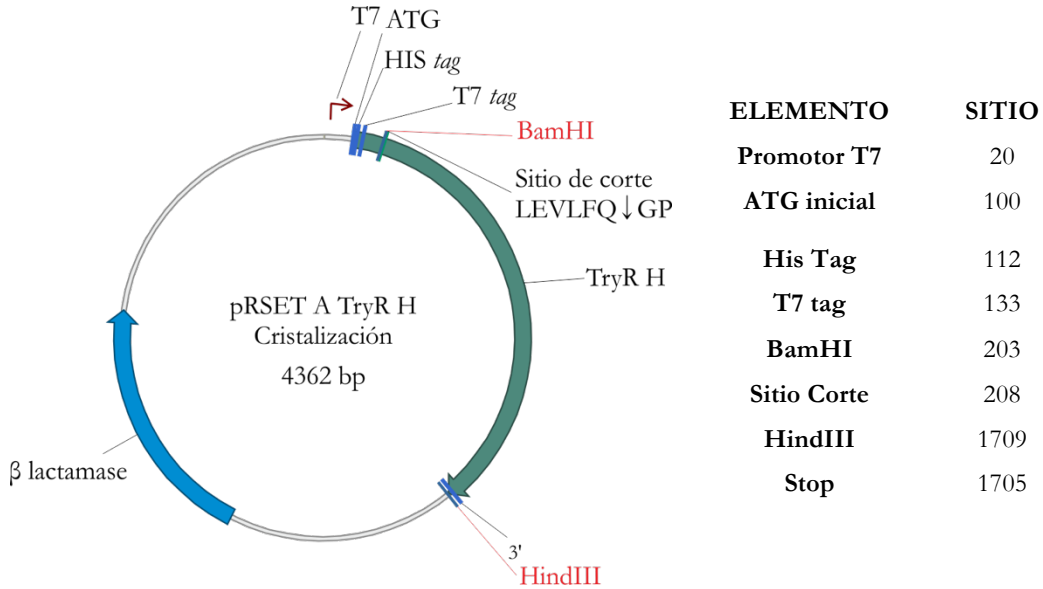
MASMTGGQQMGRGS **DYKDDDDK**M SRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTYKKKVAVIDAQATHGPPFFAAL  
GGTCVNVGCVPKKLMVTGAQYMDLIRESGGFGWEMNRESLCPNWKTLLIAAKNKVVNDINESYKSMFADTE  
GLSFHMGFGALQDAHTVLVRKSEDPNSDVLETLDTEYILIAATGSWPTRLGVPGDEFECITSNEAFYLEDAP  
KRMLCVGGGYIAVEFAGIFNGYKPRGGYVDLCYRGDLILRGFDTEVRKSLTKQLGANGIRVRTNLNPTKI  
TKNEDGSNHVHFNDGTEEDYDQVMLAIGRVPRSQALQLDKVGVQGTGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYAIGDV  
TNRVMLTPVAINEGAAAFVETVFGGKPRATDHTKVACAVFSIPPIGTCGMTEEAAAKNHETVAVYESCFTP  
LMHNISGSKHKEFMIRIITNQPTGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEEL  
CSMHTPAYFYESGKRVEKLSSNL

## Propiedades de la Proteína

| Análisis                        | Proteína Completa |
|---------------------------------|-------------------|
| Tamaño                          | 513 aa            |
| Peso Molecular (MW)             | 55482.13          |
| 1 µg                            | 18.024 pMoles     |
| Coefficiente de Extinción Molar | 45840             |
| 1 A[280]                        | 1.21 mg/ml        |
| A[280] de 1 mg/ml               | 0.83 AU           |
| Punto Isoeléctrico              | 5.68              |
| Carga a pH 7.0                  | -10.14            |

# Tripanotión Reductasa Para Cristalización

## Plásmido



## Oligonucleótidos

**Forward** GGGGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGTCCC GCGGTACGA

**Reverse** CCCAAGCTTTCAGAGGTTGCTGCTGA

## Gen

En azul se muestra la secuencia que codifica para el HIS tag, en amarillo el sitio de corte de la proteasa y en verde el ATG inicial de la TryR.

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGG  
 ATCTGTACGACGATGACGATAAAGGATCGATGGGGATCCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATGTC  
 CGCGTACGACCTCGTGGTGTCTGGCGCCGGATCTGGAGGTTCTGGAGGCGGGATGGAACGCGGCCGTCACG  
 CACAAGAAGAAGGTGGCCGTCGATGTCAGGCGACGCACGGTCCGCCGCTCTTCGCTGCGCTCGGCG  
 GCACGTGCGTGAACGTCGGCTGCGTGCCAAAGAACTCATGGTGACAGGTGCCAGTACATGGACCTGAT  
 CCGTGAGTCTGGCGGCTTCGGATGGGAGATGGACCGGAATCGCTCTGCCCAACTGGAAGACGCTCATC  
 GCCGGAAGAACAAGGTGGTGAACAGCATCAACGAGAGCTACAAGAGCATGTTTCGCTGATACGGAGGGCC  
 TCAGCTTTCACATGGGCTTCGGTGCCCTTCAAGACGCTCACACGGTGGTGGTGGCAAGTCGGAAGACCC  
 ACACAGCGACGTGCTGGAGACCCTCGACACGGAGTACATCCTCATTGCCACCGGCTCCTGGCCGACGCGC  
 CTCGGAGTCCCCGGCGACGAGTCTGCATCACGAGCAACGAGGCCCTTCTACCTCGAGGATGCCCCAAGC  
 GGATGCTGTGCGTCGGCGGCGGCTACATCGCCGTTGAGTTTGCCGGCATCTTCAACGGCTACAAGCCCTG  
 CGGTGGCTATGTCGACCTGTGCTACCGCGGCGATCTTATTTTGGCGGGCTTCGATACAGAGGTGCGCAAG  
 AGCCTGACGAAGCAGCTGGGGGCGAACGGAATAAGAGTGCCTACAACTTGAACCCGACGAAGATCACGA  
 AGAATGAGGACGGCTCGAATCACGTTCACTTCAACGATGGCACGGAGGAGGACTACGATCAGGTCATGCT  
 CGCGATCGGTGCGGTGCCGCTCGCAGGCACTACAGCTCGACAAGGCCGGCGTCCGAACAGGAAAGAAC  
 GGTGCCGTGCAGGTGACGCGTATTCGAAGACATCGGTGGACAACATCTACGCCATCGGCGACGTGACGA  
 ACCGCGTATGTTGACGCCGGTGGCCATCAACGAAGGCCCGCCCTTCGTTGAAACCGTCTTCGGTGGCAA  
 GCCCCGCGCCACCGACCACGAAGGTGCGGTGCGCCGTGTTCTCCATACCGCCGATCGGCACGTGCGGC

ATGACGGAGGAGGAGGCGGCGAAGAAGTACGAAACCGTCGCCGTGTACGCGAGCTCCTTCACGCCCCCTTA  
 TGCACAACATCAGCGGCAGCAAGCACAAGGAATTCATGATCCGCATCATCACGAACGAATCCAACGGCGA  
 GGTTCTGGGTGTTTACATGCTCGGCGACAGTGCCTGAGATCATCCAGAGCGTCCGCATTTGCATGAAG  
 ATGGGTGCCAAGATCAGCGACTTCCACAGCACCATCGGAGTCCACCCGACGAGCGCCGAGGAGCTCTGCT  
 CCATGCGCACCCAGCGTACTTCTACGAGAGTGGCAAGCGCGTCGAAAAGCTCAGCAGCAACCTC\*

### Proteína (tras escisión)

En verde la metionina inicial de la TryR.

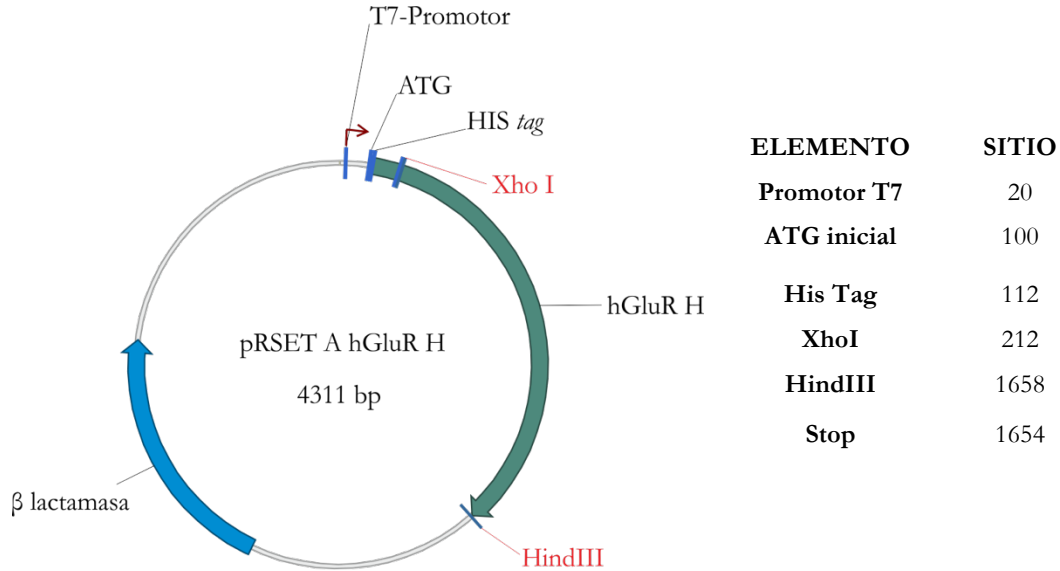
GPMSRAYDLVVVLGAGSGGLEAGWNAAVTHKKKVAVVDVQATHGPPPLFAALGGTCVNVGCVPKKLMVTGAQ  
 YMDLIRESGGFGWEMDRESLCPNWKTLIAAKNKVVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGFGALQDAHTVVVR  
 KSEDPHSDVLETLDTEYILIIATGSWPTRLGVPDEFCTISNEAFYLEDAPKRMLCVGGGYIAVEFAGIFN  
 GYKPCGGYVDLCYRGDLILRGFDTEVRKSLTKQLGANGIRVRTNLNPTKITKNEDGSNHVHFNDGTEEDY  
 DQVMLAIGRVPRSQALQLDKAGVRTGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYAIGDVTNRVMLTPVAINEGAAFVET  
 VFGGKPRATDHTKVACAVFSIPPIGTTCGMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMIRIITN  
 ESNGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICMKMGAKISDFHSTIGVHPTSAAEELCSMRTPAYFYESGKRVEKLS  
 SNL

### Propiedades de la Proteína (tras escisión)

| Análisis                        | Proteína Completa |
|---------------------------------|-------------------|
| Tamaño                          | 493 aa            |
| Peso Molecular (MW)             | 53176.82 Da       |
| 1 µg                            | 18.805 pMoles     |
| Coefficiente de Extinción Molar | 44560             |
| 1 A[280]                        | 1.19 mg/ml        |
| A[280] de 1 mg/ml               | 0.84 UA           |
| Punto Isoeléctrico              | 5.85              |
| Carga a pH 7.0                  | -8.14             |

# Glutación Reductasa Humana H

## Plásmido



## Oligonucleótidos

**Forward** GGGCTCGAGATGGCCCTGCTGCCCCGA  
**Reverse** GGGCTCGAGATGGCCCTGCAGGCAGGAGCC

## Gen

En azul se muestra la secuencia que codifica para el HIS tag y en verde el ATG inicial de la GluR humana.

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGGG  
 ATCTGTACGACGATGACGATAAAGGATCGATGGGGATCCGAGCTCGAGATCGCCTGCAGGCAGGAGCCGCA  
 GCCGAGGGCCCCGCCCGCTGCTGGCGCCGTGGCCTCCTATGACTACCTGGTGATCGGGGGCGGCTCG  
 GCGGGCTGGCCAGCGCGCAGGGCGGCCGAGCTGGGTGCCAGGGCCCGCTGGTGGAGAGCCACAAGC  
 TGGGTGGCACTTGCGTGAATGTTGGATGTGTACCCAAAAAGGTAATGTGGAACACAGCTGTCCACTCTGA  
 ATTCATGCATGATCATGCTGATTATGGCTTTCCAAGTTGTGAGGGTAAATTC AATTGGCGTGTATTATAAG  
 GAAAAGCGGGATGCCTATGTGAGCCGCTGAATGCCATCTATCAAAACAATCTCACCAAGTCCCATATAG  
 AAATCATCCGTGGCCATGCAGCCTTCACGAGTGATCCCAAGCCCACAATAGAGGTCAGTGGGAAAAAGTA  
 CACCGCCCCACACATCCTGATCGCCACAGGTGGTATGCCCTCCACCCCTCATGAGAGCCAGATCCCCGGT  
 GCCAGCTTAGGAATAACCAGCGATGGATTTTTTTCAGCTGGAAGAATTGCCCGGCCGAGCGTCATTGTTG  
 GTGCAGGTTACATTGCTGTGGAGATGGCAGGGATCCTGTCAGCCCTGGGTTCTAAGACATCACTGATGAT  
 ACGGCATGATAAGGTACTTAGAAGTTTTGATTCAATGATCAGCACC AACTGCACGGAGGAGCTGGAGAAC  
 GCTGGCGTGGAGGTGCTGAAGTTCTCCAGGTCAAGGAGTTAAAAAGACTTTGTCGGGCTTGGAAAGTCA  
 GCATGGTTACTGCAGTTC CCGTAGGCTACCACATGACCATGATTCCAGATGTTGACTGCCCTGCTCTG  
 GGCCATTGGGCGGGTCCCGAATAACCAAGGACCTGAGTTTAAACAAACTGGGGATTCAAACCGATGACAAG  
 GGTCAATATCATCGTAGACGAATTC CAGAATACCAACGTCAAAGGCATCTATGCAGTTGGGGATGTATGTG  
 GAAAAGCTCTTCTTACTCCAGTTGCAATAGCTGCTGGCCGAAAACCTTGCCCATCGACTTTTTTGAATATAA  
 GGAAGATTCCAAATTAGATTATAACAACATCCCAACTGTGGTCTTCAGCCACCCCCCTATTGGGACAGTG  
 GACTCACGGAAGATGAAGCCATTCATAAATATGGAATAGAAAATGTGAAGACCTATTCAACGAGCTTTA



CCCCGATGTATCACGCAGTTACCAAAAGGAAAACAAAATGTGTGATGAAAATGGTCTGTGCTAACAAGGA  
 AGAAAAGGTGGTTGGGATCCATATGCAGGGACTTGGGTGTGATGAAAATGCTGCAGGGTTTTGCTGTTGCA  
 GTGAAGATGGGAGCAACGAAGGCAGACTTTGACAACACAGTCGCCATTCACCCTACCTCTTCAGAAGAGC  
 TGGTCACACTTCGT\*

## Proteína

En azul se muestra la secuencia que codifica para el HIS *tag* y en verde la metionina inicial de la hGluR.

MRGS **HHHHHH**GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELE **M**ALLPRALSAGAGPSWRRRAARAFRGFLLLLP  
 EPAALTRALSRAMACRQEPQPQGPFPAAAGAVASYDYLVIGGGSGGLASARRAAELGARAAVVESHKLGGT  
 CVNVGCVPKKVMWNTAVHSEFMHDHADYGFPSCEGKFNWRVIKEKRDAYVSRLNAIYQNNLTKSHIEIIR  
 GHAAFTSDPKPTIEVSGKKYTAPHILIAITGGMPSTPHESQIPGASLGITSDGFFQLEELPGRSVIVGAGY  
 IAVEMAGILSALGSKTSLMIRHDKVLRFSFDSMISTNCTEELNAGVEVLKFSQVKEVKKTLGLEVSMVT  
 AVPGRLPVMTMIPDVDCLLWAI GRVPNTKDLSLNKLG IQTDDKGHIIVDEFQNTNVKGIYAVGDVCGKAL  
 LTPVAIAAGRKLAHRLFYKEDSKLDYNNIPTVVF SHPPIGTVGLTEDEAIHKYGIENVKTYSTSFPMY  
 HAVTKRKTCKVMKMCANKEEKVVG IHMQLGCDEMLQGF AVAVKMGATKADFNTVAIHPTSSEELVTL  
 R

## Propiedades de la Proteína

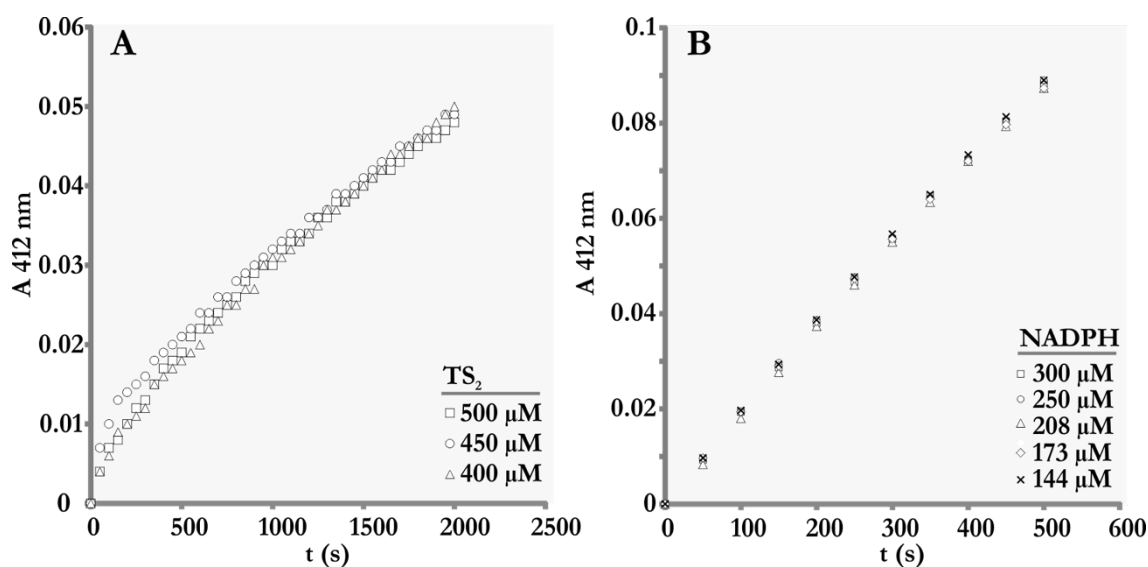
| Análisis                        | Proteína Completa |
|---------------------------------|-------------------|
| Tamaño                          | 561 aa            |
| Peso Molecular (MW)             | 60754.03 Da       |
| 1 µg                            | 16.460 pMoles     |
| Coefficiente de Extinción Molar | 47570             |
| 1 A[280]                        | 1.28 mg/ml        |
| A[280] de 1 mg/ml               | 0.78 AU           |
| Punto Isoeléctrico              | 8.23              |
| Carga a pH 7.0                  | 4.65              |

## **ANEXO II - Desarrollo y validación del ensayo de actividad TryR**

## Determinación de las concentraciones saturantes de NADPH y TS<sub>2</sub>

Debido a que la TryR utiliza dos sustratos (NADPH y TS<sub>2</sub>), era necesario determinar las concentraciones saturantes de ambos con el fin de poder establecer las constantes cinéticas de la enzima recombinante y contrastar estos valores con los reportados en la literatura.

Para esto se utilizaron diferentes concentraciones tanto de TS<sub>2</sub> (400  $\mu$ M – 500  $\mu$ M) como de NADPH (144  $\mu$ M – 300  $\mu$ M). Como se observa en la **Figura A.1 A**, una concentración de 400  $\mu$ M de TS<sub>2</sub> satura por completo a la enzima, por lo que se decidió usar esta concentración para hallar la K<sub>M</sub> para NADPH. De la misma forma, la saturación para el NADPH se alcanza a 150  $\mu$ M, por lo que es esta la concentración utilizada para calcular la K<sub>M</sub> para el TS<sub>2</sub>. (**Figura A.1 B**)



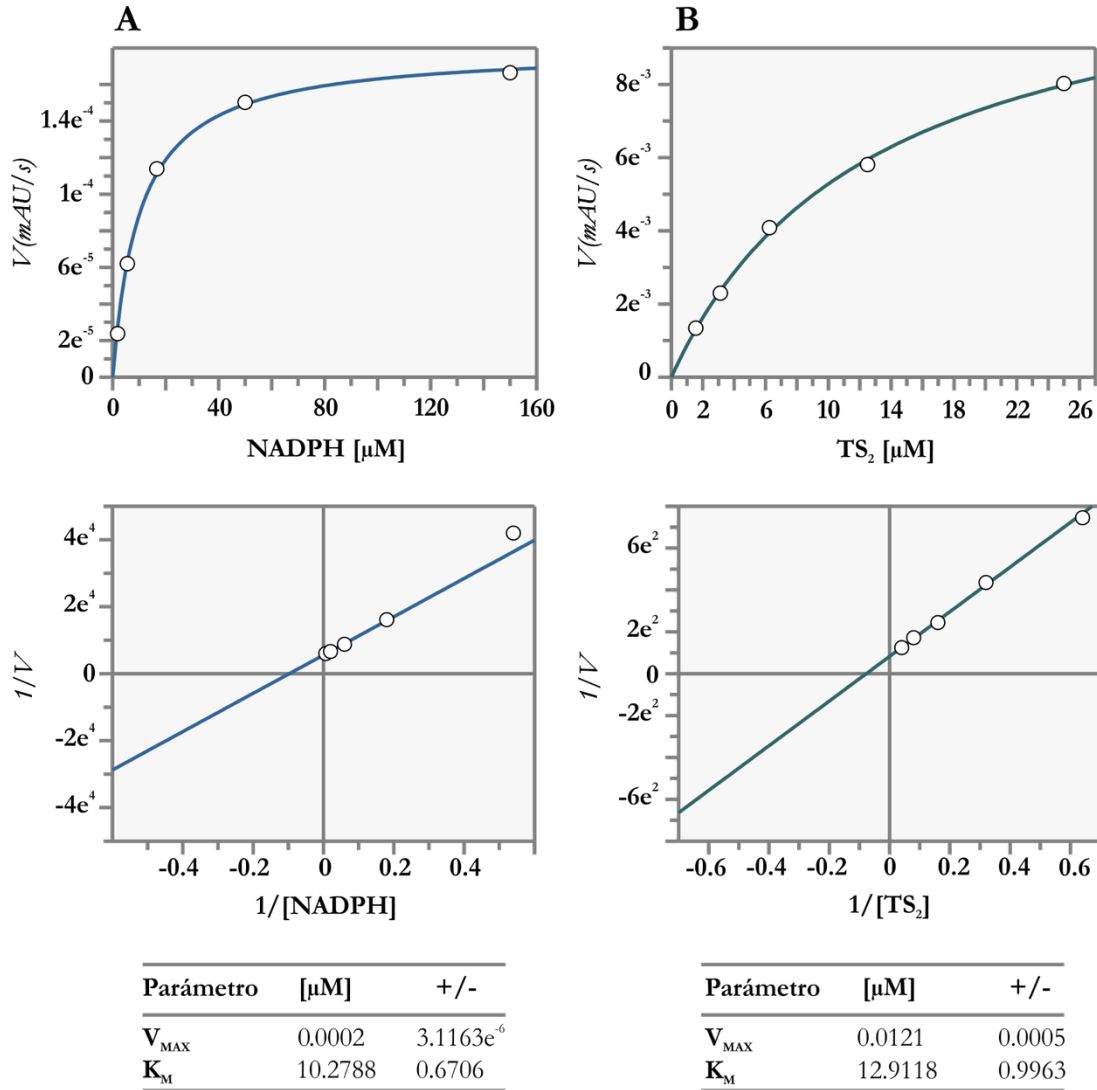
**Figura A.1** | Búsqueda de las concentraciones saturantes de los sustratos de la TryR en el ensayo de actividad. **A.** saturación de TS<sub>2</sub>. A partir de 400  $\mu$ M el TS<sub>2</sub> se encuentra en condiciones saturantes. Todas las reacciones se realizaron a una concentración de 300  $\mu$ M de NADPH **B.** A partir de 150  $\mu$ M el NADPH se encuentra en condiciones saturantes. Todas las reacciones se realizaron a una concentración de 400  $\mu$ M de TS<sub>2</sub>

## Determinación de los valores de K<sub>M</sub> para NADPH y TS<sub>2</sub>

Tras determinar las concentraciones saturantes de ambos sustratos, se realizó el ensayo para evaluar la K<sub>M</sub> de cada uno de ellos. Según los valores obtenidos por *Hamilton* en su ensayo en presencia de DTNB, la K<sub>M</sub> para TS<sub>2</sub> en la TryR toma un valor de 10  $\mu$ M (**245**). Por su parte, *Fairlamb* y colaboradores, usando el ensayo clásico de oxidación de NADPH, reportan una K<sub>M</sub> que varía entre 33 y 72  $\mu$ M (**263**). Al usar nuestro ensayo modificado con NADP<sup>+</sup>, encontramos que el valor de la K<sub>M</sub> para el TS<sub>2</sub> es de 10  $\mu$ M (**Figura 7.2 A**). El valor de K<sub>M</sub>

obtenido por nosotros confirma las diferencias manifestadas en la literatura en función del método de ensayo empleado.

De la misma forma, el valor de  $K_M$  obtenido para el NADPH es de  $13 \mu\text{M}$  (**Figura 7.2 B**), equivalente a los valores reportados generalmente para esta enzima en diferentes especies de tripanosomátidos(292). Por tanto, nuestros resultados demuestran que la adición de  $\text{NADP}^+$  al ensayo no tiene efecto alguno sobre las constantes cinéticas de la enzima.



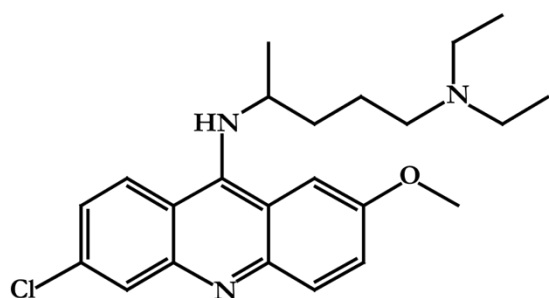
**Figura A.2** | Gráficas de velocidad inicial de la TryR recombinante de *L. infantum* usando el ensayo de actividad modificado con  $\text{NADP}^+$ . **A.** Diagramas de velocidad de reacción en función de la concentración de NADPH **B.** Idem que A para  $\text{TS}_2$ .

### Mepacrina como control de inhibición de la actividad de TryR.

Además de asegurarnos de que la adición del  $\text{NADP}^+$  en el ensayo de actividad no afecta a las constantes cinéticas de la enzima para ambos sustratos, también quisimos determinar si

podría tener algún efecto sobre la actividad de inhibidores. Para ello decidimos usar mepacrina, que es un inhibidor competitivo de la TryR ampliamente descrito (117,276,332). La mepacrina (Figura A.3 A) es un compuesto tricíclico derivado de acridina y un inhibidor competitivo selectivo de la TryR que no tiene efecto sobre la GluR humana. Esta molécula interactúa con el sitio hidrófobo de unión a espermidina que se encuentra dentro del centro activo de la enzima (116,332).

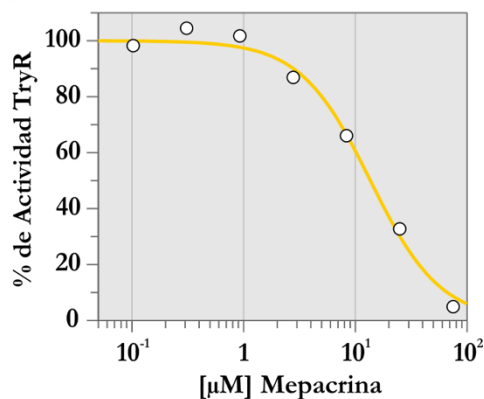
**A**



**Mepacrina**

N<sup>4</sup>-(6-Cloro-2-metoxi-9-acridinil)-  
N<sup>1</sup>.N<sup>1</sup>-dietil-1.4-pentandiamina

**B**



| Parámetro        | [μM]    | +/-    |
|------------------|---------|--------|
| CI <sub>50</sub> | 12.6310 | 1.0466 |
| Slope factor     | 1.3868  | 0.1333 |

**Figura A.3** | Mepacrina como inhibidor de la TryR. **A.** Estructura de la Mepacrina. **B.** Cálculo de CI<sub>50</sub> para la mepacrina en nuestro ensayo de actividad. El *slope factor* hace referencia a la pendiente en el punto en el cual la actividad de la TryR es el 50%.

Como se observa en la Figura A.3 B, el valor de CI<sub>50</sub> para la mepacrina en nuestro ensayo es de 12 μM. Este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud y muy cercano a los 19 μM reportados para la *K<sub>I</sub>* de la mepacrina (276). Mientras que la *K<sub>I</sub>* es la constante de disociación del complejo inhibidor-enzima, la CI<sub>50</sub> cuantifica la concentración de inhibidor necesaria para reducir a la mitad la velocidad de la reacción bajo unas condiciones específicas de ensayo. Así, la *K<sub>I</sub>* es un valor constante, mientras que la CI<sub>50</sub> es un valor relativo cuya magnitud depende de la concentración de sustrato usada en el ensayo (333). Sin embargo, si la inhibición se ajusta a los mecanismos clásicos de inhibición (competitiva, acompetitiva y no competitiva) se puede establecer una relación entre los dos valores usando las fórmulas de *Cheng-Prusoff* (334). Para un inhibidor competitivo la relación entre la *K<sub>I</sub>* y la CI<sub>50</sub> viene dada por la Ecuación 7.1.

$$IC_{50} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$$

**Ecuación A.1** | Fórmula de *Cheng-Prusoff* para un inhibidor competitivo

$$19 \mu M \left( 1 + \frac{[1 \mu M]}{30 \mu M} \right) = 19.7 \mu M$$

Sustitución en la ecuación A.1

Al reemplazar los valores de  $K_i$  ( $19 \mu M$ ), de concentración de  $TS_2$  usada en el ensayo ( $1 \mu M$ ) y de  $K_M$  determinada para  $TS_2$  ( $30 \mu M$ ), obtenemos que la  $CI_{50}$  para nuestro ensayo debería ser de  $19,7 \mu M$  ya que, como está descrito, cuando el inhibidor es competitivo y la concentración de sustrato usada en el ensayo es baja (como es nuestro caso), la  $CI_{50} \approx K_I$  **(333,334)**. Por tanto, la adición de  $NADP^+$  en el ensayo de actividad de la TryR en presencia de DTNB, además de proteger a la enzima de la inactivación por el NADPH y eliminar los problemas de variabilidad del ensayo, no afecta a la actividad catalítica de la enzima y no constituye un impedimento en la búsqueda de inhibidores.

## **ANEXO III – Publicaciones**

## Artículo 1.

# Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides.

Miguel A. Toro<sup>a</sup> Pedro A. Sánchez-Murcia<sup>b,c</sup> David Moreno<sup>a</sup>, Marta Ruiz-Santaquiteria<sup>b</sup>, Juan Fernando Alzate<sup>d</sup>, Ana Negri<sup>c</sup>, María-José Camarasa<sup>b</sup>, Federico Gago<sup>c</sup>, Sonsoles Velázquez<sup>b</sup>, Antonio Jiménez-Ruiz<sup>a</sup>

[a] Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid (España)

[b] Instituto de Química Médica, CSIC Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid (España)

[c] Departamento de Ciencias Biomédicas Unidad Asociada de I + D + I al CSIC, Universidad de Alcalá 28871 Alcalá de Henares, Madrid (España)

[d] Facultad de Medicina Universidad de Antioquia Carrera 53 # 61–30, Medellín (Colombia)

**Revista** ChemBioChem

**Editorial** Wiley-VCH

**Año** 2013

**Volumen** 14

**Páginas** 1212-1217

**DOI** 10.1002/cbic.201200744





DOI: 10.1002/cbic.201200744

# Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides

Miguel A. Toro,<sup>[a]</sup> Pedro A. Sánchez-Murcia,<sup>[b, c]</sup> David Moreno,<sup>[a]</sup> Marta Ruiz-Santaquiteria,<sup>[b]</sup> Juan Fernando Alzate,<sup>[d]</sup> Ana Negri,<sup>[c]</sup> María-José Camarasa,<sup>[b]</sup> Federico Gago,<sup>[c]</sup> Sonsoles Velázquez,<sup>[b]</sup> and Antonio Jiménez-Ruiz\*<sup>[a]</sup>

Trypanothione reductase (TryR), characteristic of trypanosomatids, is an NADPH-dependent flavoprotein oxidoreductase that maintains the dithiol of trypanothione in its reduced state (T[SH]<sub>2</sub>).<sup>[1]</sup> The cellular role of trypanothione and TryR is preserving a balanced intracellular redox state—equivalent to that of the glutathione/glutathione reductase (GR) pair in mammals.<sup>[2]</sup> TryR and GR are closely related, from both structural and mechanistic viewpoints, but their substrate specificities are mutually exclusive. Interestingly, in the three major peroxidase families identified in pathogenic trypanosomatids, T[SH]<sub>2</sub> is the sole source of reducing equivalents for defense against oxidative stress,<sup>[3]</sup> several genetic approaches have demonstrated the essential nature of TryR in these parasites.<sup>[4]</sup> For these reasons this enzyme is a very attractive target for drug development.<sup>[5]</sup>

Most of the research efforts to inhibit TryR have focused on identifying or designing molecules directed at the active site.<sup>[1b,6]</sup> The major problem faced by this classical approach is that the pocket used to accommodate oxidized trypanothione (T[S]<sub>2</sub>) is quite large and relies to a great extent on charge–charge interactions, because the substrate is made up of two molecules of glutathione (a zwitterion) joined by a positively charged spermidine (polyamine) linker.<sup>[6]</sup> Although several new TryR inhibitors have been described in the last decade,<sup>[7]</sup> no clear evidence of their mode of binding to the enzyme has been reported, with the notable exceptions of mepacrine (also

known as quinacrine)<sup>[8]</sup> and a series of 3,4-dihydroquinazolines.<sup>[9]</sup>

Because the biologically functional form of TryR is a homodimer, we sought to explore the dimerization interface of this enzyme as an alternative site that could be targeted to hamper or prevent monomer–monomer association.<sup>[10]</sup> Developing modulators of protein–protein interaction (PPI) is considered challenging because protein–protein interfaces usually lack well-defined binding pockets.<sup>[11]</sup> However, it is recognized that a significant contribution (>80%) to the binding energy is localized in small regions (“hot spots”).<sup>[12]</sup> This suggests that it might be sufficient for a developed PPI disruptor to bind with high affinity to only a small subset of key interface residues.

We have used the recently reported X-ray crystal structure of *Leishmania infantum* TryR (Li-TryR; PDB ID: 2JK6)<sup>[13]</sup> to identify some putative hot spots of dimer stabilization. We first performed a computational study on the crystal data to assess, firstly, the burial of solvent-accessible surface area (SASA) in each monomer upon dimerization,<sup>[14]</sup> and secondly, the electrostatic and van der Waals contributions to the inter-subunit interaction energy<sup>[15]</sup> (see Figures S1 and S2 in the Supporting Information).

We found that residues W81, E436, and Q439 (the latter two in an  $\alpha$ -helix from P435 to M447) provide some of the most relevant contributions to these three measured quantities. W81 is buried in a hydrophobic pocket lined by residues Y69', M70', I73', L88', P90', G209', and Y210' of the complementary monomer (Figure 1A, left); the carboxylate of E436 forms two hydrogen bonds with the backbone NH groups of S464' and A465', which contribute to the helix dipole (Figure 1A, center); and the side-chain carboxamide of Q439 hydrogen bonds to the CO of I458' and the NH of V460' (Figure 1A, right).

To validate these residues as hot spots for enzyme dimerization, W81A, E436A, and Q439A mutant enzymes were generated by site-directed mutagenesis. Native PAGE and analytical ultracentrifugation (AUC) experiments were carried out to determine the percentages of monomeric and dimeric species in wild-type (wt) and mutated forms of Li-TryR. Both assays revealed that the wt protein is almost exclusively in its dimeric form, as no band corresponding to the monomer were detected by PAGE (Figure 1B), and only about 4% of the protein was seen to sediment as the monomeric form in AUC (Figure S3). Similar results were obtained for the W81A and Q439A mutants. In contrast, a clear band corresponding to the monomeric form was observed when the E436A mutant was subjected


[a] M. A. Toro,<sup>+</sup> Dr. D. Moreno,<sup>+</sup> Prof. Dr. A. Jiménez-Ruiz  
Departamento de Biología de Sistemas  
Unidad Asociada de I+D+I al CSIC, Universidad de Alcalá  
28871 Alcalá de Henares, Madrid (Spain)  
E-mail: antonio.jimenez@uah.es

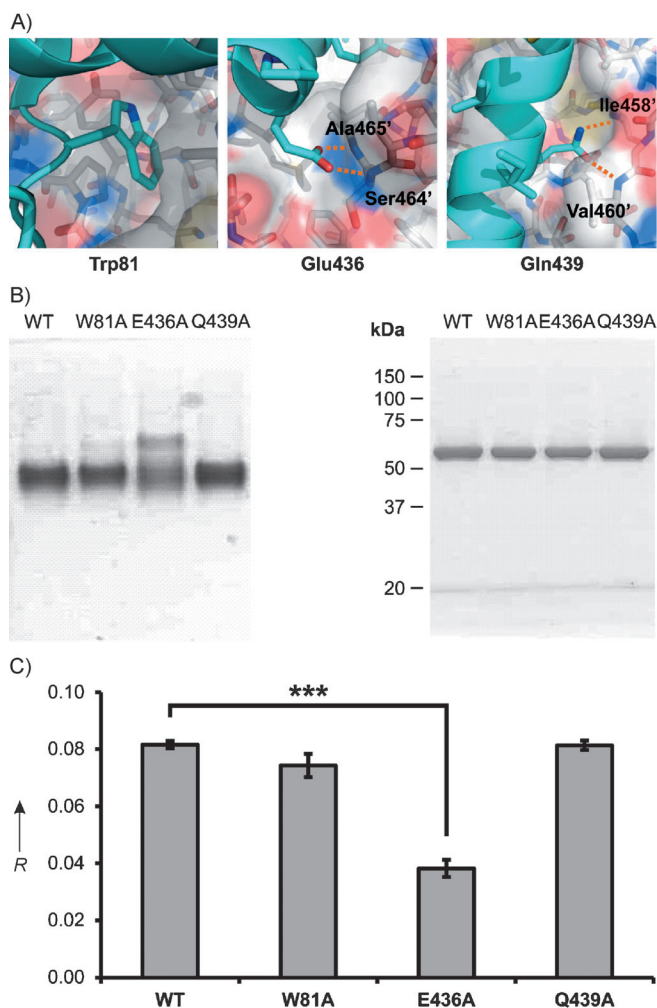
[b] P. A. Sánchez-Murcia,<sup>+</sup> M. Ruiz-Santaquiteria, Prof. Dr. M.-J. Camarasa,  
Dr. S. Velázquez  
Instituto de Química Médica, CSIC  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid (Spain)

[c] P. A. Sánchez-Murcia,<sup>+</sup> Dr. A. Negri, Prof. Dr. F. Gago  
Departamento de Ciencias Biomédicas  
Unidad Asociada de I+D+I al CSIC, Universidad de Alcalá  
28871 Alcalá de Henares, Madrid (Spain)

[d] Prof. Dr. J. F. Alzate  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina  
Universidad de Antioquia  
Carrera 53 # 61–30, Medellín (Colombia)

[†] These authors contributed equally to this work.

 Supporting information for this article is available on the WWW under  
<http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200744>.



**Figure 1.** A) Predicted hot spots at the dimerization interface of Li-TryR, selected on the basis of their contributions to the solvent-accessible surface that is buried upon dimerization, and to electrostatic and van der Waals interaction energies (see also Figures S1 and S2). One Li-TryR subunit is covered by a semitransparent van der Waals surface, and the other is shown as a cartoon (C atoms in cyan). B) Native (left) and SDS (right) PAGE of the wt enzyme and W81A, E436A, and Q439A mutants. C)  $A_{450}/A_{280}$  ratio ( $R$ ) of wt, W81A, E436A, and Q439A enzymes. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

to PAGE, and this result was corroborated by the finding of approximately 22% monomeric protein in the sedimentation velocity experiment.

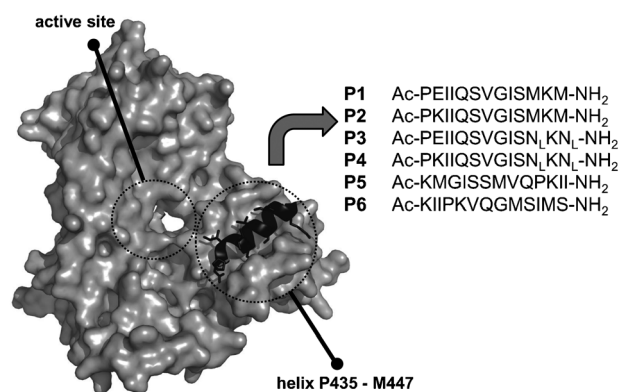
It has been reported that mutated forms of GR that are defective in dimerization fail to bind the prosthetic group, FAD.<sup>[16]</sup> Accordingly, the ratio between the absorbances at 450 nm (due to FAD) and 280 nm (due to the protein) of purified Li-TryR might also be useful to analyze the dimerization status of all mutated versions of this enzyme. The results demonstrate a significant reduction in this ratio for E436A (Figure 1C); this constitutes an additional indication of the significant displacement of the equilibrium for this mutant towards the monomeric form. However, the similar  $\alpha$ -helical content in all enzyme variants, as measured by circular dichroism (CD), supports the view that these single amino acid substitutions do not significantly effect the overall folding of the monomers (Figure S4).

Analysis of the kinetic constants of wt and variant Li-TryR showed that the catalytic activity of the E436A mutant was severely compromised (Table 1), thus confirming the high relevance of residue E436 for enzymatic proficiency. The reduced catalytic efficiency of the W81A mutant in the absence of

|   | wt   | W81A | E436A | Q439A |
|---|------|------|-------|-------|
| $K_m$ T[S] <sub>2</sub> [ $\mu$ M]                      | 20.6 | 49.3 | 192.2 | 25.3  |
| $k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]                                  | 30.2 | 16.6 | 0.8   | 40.8  |
| $k_{cat}/K_m$ [ $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] | 1.5  | 0.3  | 0.004 | 1.6   |

changes in dimerization status suggests that W81 must have a role in properly configuring the active site of Li-TryR. In contrast, the Q439A substitution was not accompanied by a significant change in enzymatic activity. The fact that  $K_m$  values for NADPH were similar for all the enzyme variants ( $(6.9 \pm 1.1) \mu$ M) indicates that the binding site for NADPH is not affected in any of the mutants.

Taken together, this preliminary work identified and validated E436 as a key amino acid for the structural stability and function of the dimer. As a consequence, the region that accommodates this residue from the complementary monomer can be regarded as a hot spot for Li-TryR dimerization, and can be seen as a potential binding site for a PPI disruptor. To prove the concept of druggability of this site, we initially designed and tested a few peptides whose sequences were directly derived from the  $\alpha$ -helix containing E436 (Figure 2).

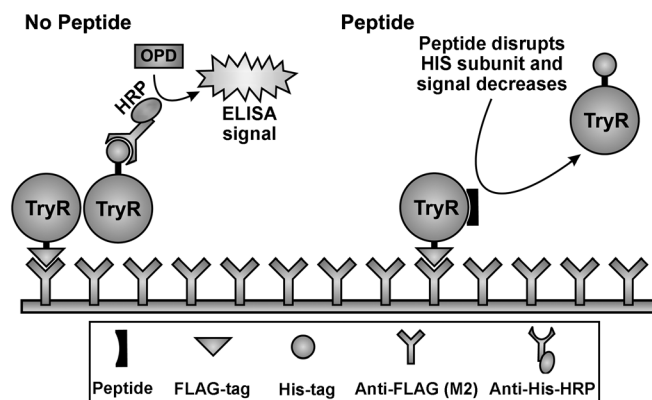


**Figure 2.** Amino acid sequences of peptides P1–P4, which were designed as mimics of  $\alpha$ -helix P435–M447 (black), and model showing them bound to a monomer of Li-TryR (gray). Peptides P5 and P6 are scrambled-sequence versions of P2. N<sub>L</sub>, norleucine.

Thus, the 13-mer peptide P1 contained residues P435–M447 of Li-TryR, but with the substitution of Ser for Cys at position 444 (Figure 2). This replacement was done to avoid the possibility of redox-dependent disulfide formation with Cys444' in the complementary monomer and the consequent lack of reversibility of binding. In P2 the glutamic acid at position 2 of the peptide (E2) was replaced by lysine (K2) in order

to assess the importance of a possible interaction with the nearby E436' of the other subunit, given that TryR is a  $C_2$ -symmetric dimer and the two  $\alpha$ -helices interact in a parallel fashion. With peptides **P3** and **P4** we evaluated the effect of replacing both methionines at the C terminus (positions 11 and 13) with the more stable norleucine ( $N_L$ ), with a view to avoiding potential oxidation problems. To rule out nonspecific effects arising from the presence of two positively charged Lys residues (possibly interacting with the active site), we designed two extra peptides, **P5** and **P6**, that contained random permutations of the amino acid sequence of **P2** (Figure 2).

The effects of peptides **P1–P6** on dimer stability was evaluated by using a highly sensitive and versatile in-house-developed ELISA (Figure 3). Briefly, two versions of wt Li-TryR (one with a His tag, one with a FLAG tag) were coexpressed in BL21(DE3) *Escherichia coli* cells. Dimers containing a His tag were purified on a nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA) matrix, and



**Figure 3.** Our in-house dimer quantitation assay. Note that even though two different dimers are purified from the Ni-NTA column (His–His, His–FLAG), only His–FLAG heterodimers are detected by the assay. OPD, *o*-phenylenediamine (substrate for HRP).

then bound to an ELISA plate that had been coated with anti-FLAG antibody. As enzyme dimers lacking a His tag are not isolated upon passage through the Ni-NTA column and those without the FLAG tag are not bound to the plate, only heterodimers (one His-TryR monomer and one FLAG-TryR monomer) are detected when using anti-His antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP). If a peptide is able to disrupt enzyme dimerization, the His-TryR monomer separates from plate-bound FLAG-TryR and the ELISA signal decreases.

Dose-dependent Li-TryR dimer dissociation was apparent upon overnight incubation with micromolar concentrations of peptides **P1–P4**, with lower  $IC_{50}$  values for **P2** (and its analogue, **P4**) than for **P1** and **P3** (Table 2, column 3; Figure S5). Our results demonstrate that replacement of E2 by K2 is advantageous for inhibition, and also that the M→ $N_L$  substitution is not detrimental. The finding that neither **P5** nor **P6** showed any significant effect on dimerization provides strong evidence of sequence specificity.

**Table 2.**  $IC_{50}$  values of peptides **P1–P4** in the Li-TryR monomer-displacement and oxidoreductase-activity assays.

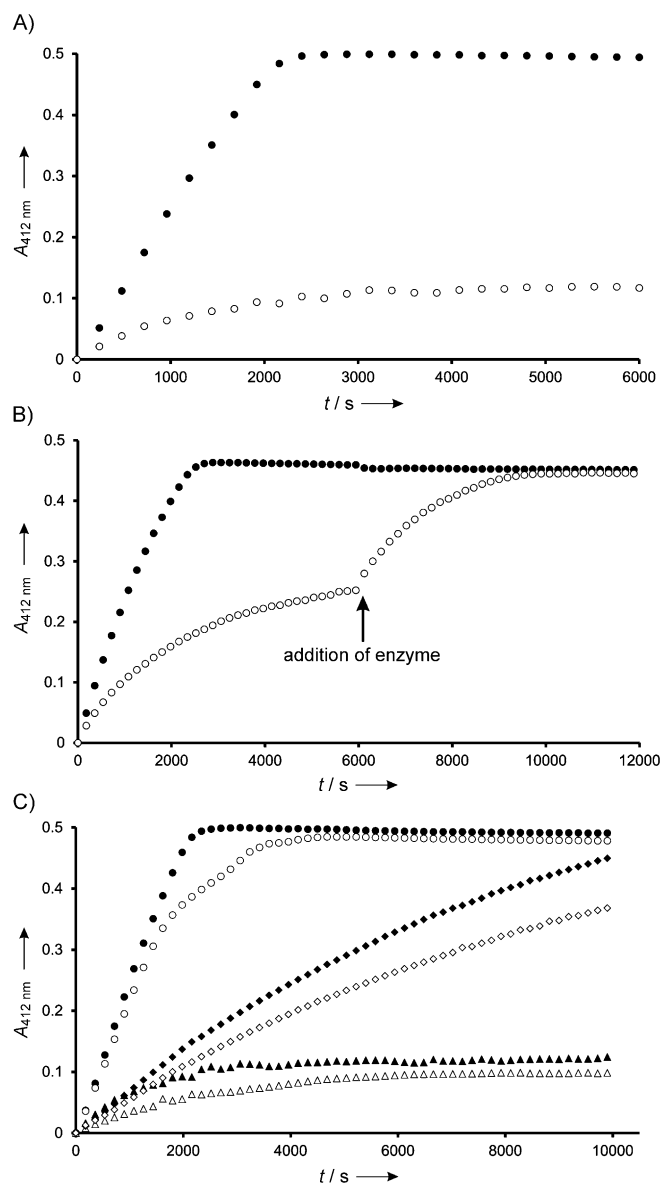
| Peptide   | Sequence   | $IC_{50}$ [ $\mu$ M] <sup>[a]</sup> | $IC_{50}$ [ $\mu$ M] <sup>[b]</sup> |
|-----------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>P1</b> | Ac-PEIQSVGISMKM-NH <sub>2</sub>                              | 40.8 ± 2.4                          | > 75                                |
| <b>P2</b> | Ac-PKIIQSVGISMKM-NH <sub>2</sub>                             | 17.9 ± 0.5                          | 1.6 ± 0.1                           |
| <b>P3</b> | Ac-PEIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub>  | 33.6 ± 3.1                          | > 75                                |
| <b>P4</b> | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | 15.7 ± 1.1                          | 1.4 ± 0.2                           |
| <b>P5</b> | Ac-KMGISSMVQPKII-NH <sub>2</sub>                             | > 75                                | > 75                                |
| <b>P6</b> | Ac-KIIPKVQGMSIMS-NH <sub>2</sub>                             | > 75                                | > 75                                |

[a] Dimer quantitation assay. [b] Enzymatic activity > 75 indicates that  $IC_{50}$  is higher than 75  $\mu$ M (maximum assayed). Results are representative of three independent experiments each performed in triplicate.  $N_L$  = norleucine.

**P2** and **P4** were also able to strongly inhibit the oxidoreductase activity of the enzyme, which was measured by using Ellman's reagent (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB; Table 2, column 4; Figure S5). The assay was designed to keep the  $T[S]_2$  concentration constant (and therefore also the enzymatic rate) until exhaustion of DTNB, at which point the reaction reaches a plateau (Figure 4A, DMSO). In the presence of **P2** (and also of **P4**, data not shown) the reaction rate diminished gradually, as indicated by the curvature of the plot of product formation over time, and the plateau appeared at a lower product concentration (Figure 4A, **P2**). This behavior was not a result of increased consumption of any of the reactants, because only addition of new enzyme (but not of NADPH,  $T[S]_2$ , or DTNB) was able to restore 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) production (Figure 4B). These observations are consistent with time-dependent inactivation of the enzyme and not with substrate depletion or other artifacts of the experimental design.

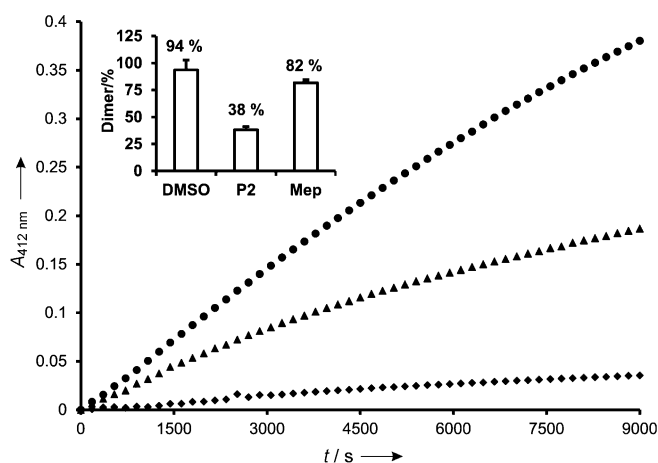
In view of the apparent discrepancies between the  $IC_{50}$  values obtained in the dimerization and enzyme activity assays (Table 2), we hypothesized that binding of the peptides to TryR could be affected by an ongoing enzymatic reaction. As functional enzyme is almost completely inactivated after 50 min (3000 s) in the presence of 25  $\mu$ M **P2** (Figure 4C) we tested whether preincubation with the peptide (for 120 min prior to initiation of the assay reaction) would result in abolition of enzyme activity. However, only a slight decrease in the initial rate of the reaction was observed, and the time for full inhibition was not reduced. It must be pointed out that a similar slight reduction in initial velocity was also observed when the enzyme was preincubated for 120 min with 1.75% DMSO or 25  $\mu$ M mepacrine (TryR competitive inhibitor). Therefore, it appears that the full inhibitory capability of the peptide at relatively short times is only realized when the enzyme is engaged in catalysis. This finding provides a plausible explanation for the finding that the  $IC_{50}$  values for **P2** and **P4** in the dimerization assay are approximately tenfold higher than those for the enzymatic assay.

Because **P2** was shown to disrupt TryR dimerization and also to act as an inhibitor, our next goal was to demonstrate that the reduced enzymatic activity was actually due to TryR dimer disruption. To this end, the standard enzymatic reduction of



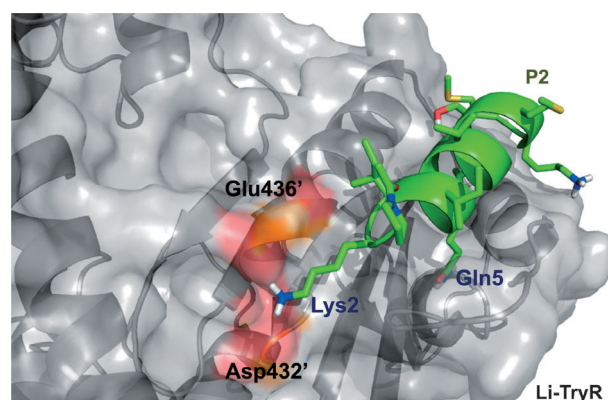
**Figure 4.** Oxidoreductase activity of Li-TryR measured as the increase in absorbance at 412 nm (reduction of DTNB coupled to T[SH]<sub>2</sub> production). A) Activity of the enzyme in the presence of either 1.75% DMSO (●) or 25  $\mu\text{M}$  P2 (○). B) Enzymatic activity in the presence of 25  $\mu\text{M}$  P2 (○) is restored upon addition of fresh enzyme at 6000 s. C) Effect of preincubation of enzyme with inhibitor. Enzymatic activity in the presence of 1.75% DMSO (circles), 25  $\mu\text{M}$  mepacrine (diamonds), or 25  $\mu\text{M}$  P2 (triangles), each without (solid symbols) and with (empty symbols) 120 min preincubation.

T[SH]<sub>2</sub> was now conducted with a His/FLAG heterodimeric version of TryR attached to the anti-Flag-coated plate described above (Figure 5). After 150 min of reaction, all reagents were washed from the wells, and the standard dimerization assay was carried out. We found that in wells showing a ~50% P2-induced decrease in enzymatic activity, the amount of dimeric enzyme was also decreased by ~50%. This result supports a mechanism for enzyme inhibition by P2 through disruption of the TryR dimer in a process that is kinetically slow but becomes accelerated when the enzyme is engaged in the catalytic cycle.



**Figure 5.** Dimerization status of TryR after catalytic activity. Three reactions with His/Flag-tagged TryR immobilized on a flag-coated plate were carried out in the presence of DMSO (●), 50  $\mu\text{M}$  P2 (▲) or 50  $\mu\text{M}$  mepacrine (◆). Inset: after 150 min reaction, plates were washed, and percentage dimeric enzyme was assessed with anti-His antibodies.

To shed additional light on the binding process and to assess the relative importance of individual peptide residues, we performed molecular dynamics (MD) simulations in explicit solvent of an Li-TryR monomer (from PDB ID: 2JK6) in complex with P2. The peptide was modeled with the corresponding helical fragment from the other monomer as a template (see the Supporting Information), and by replacing E2 with K2. The evolution of the RMSD from the initial structure of the backbone heavy atoms ( $C_{\alpha}$ , C, N, and O) over 20 ns and visual inspection of the trajectory suggested that the system had stabilized after ~1 ns (Figure S7). Analysis of the simulation results revealed that the side chain of K2 in P2 established a hydrogen-bonding interaction with the carboxylate of E436' for more than 80% of the time (Figures 6 and S8). Moreover, this basic residue also interacted occasionally with D432', an amino acid that is close to E436'. These simulated interactions provide a rationale for the higher measured affinities of P2 and P4



**Figure 6.** Snapshot showing the electrostatic basis for the strong interaction between K2 of P2 (green) and E436' (red), a key residue for the stability of Li-TryR (gray). This image was taken from an average structure obtained from the MD simulation.

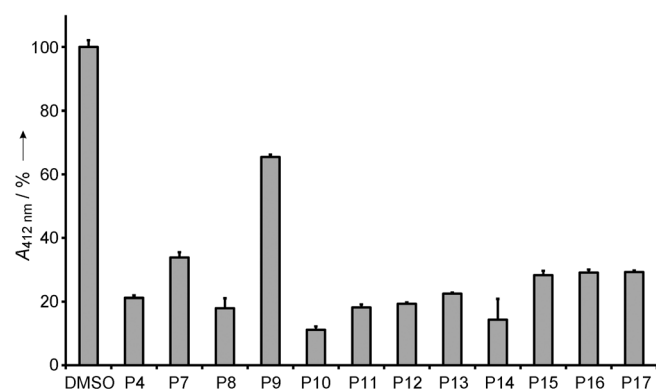
over **P1**; K2 appears to strongly anchor the N terminus of these peptides in the binding groove of the Li-TryR monomer, thereby disrupting dimer formation and inhibiting enzymatic activity.

Because the inhibitory activities displayed by **P2** were fully maintained in the less oxidation-prone **P4**, we considered the latter peptide as a suitable candidate for further analysis and optimization. We began by exploring the importance of each side chain by means of alanine scanning (peptides **P7–P17**), and we then tried to determine the minimal peptide length by designing and testing five truncated analogues (**P18–P22**; Table 3). In all these peptides, a proline at position 1 was used to limit the conformational freedom of the N terminus. The

| Table 3. Peptides containing an Ala residue in place of the original amino acid in P4 ( <b>P7–P17</b> ), and truncated peptides ( <b>P18–P22</b> ). |  |            |   |
|---|--|------------|---|
| P4 Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub>   |  |            |   |
| <b>P7</b>   | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P15</b> | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> AKN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> |
| <b>P8</b>   | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P16</b> | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> AN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub>  |
| <b>P9</b>   | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P17</b> | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KAN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> |
| <b>P10</b>  | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P18</b> | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> K-NH <sub>2</sub>                 |
| <b>P11</b>  | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P19</b> | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub>                  |
| <b>P12</b>  | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P20</b> | Ac-PKIIQSVGIS-NH <sub>2</sub>                                 |
| <b>P13</b>  | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P21</b> | Ac-PKIIQSVGI-NH <sub>2</sub>                                  |
| <b>P14</b>  | Ac-PKIIQSVGISN <sub>L</sub> KN <sub>L</sub> -NH <sub>2</sub> | <b>P22</b> | Ac-PKIIQSVG-NH <sub>2</sub>                                   |

A = Ala scanning, N<sub>L</sub> = norleucine.

effects of peptides **P7–P17** on the oxidoreductase activity of Li-TryR were compared to that of parent **P4** (Figure 7). For this purpose, only initial velocities were considered, and these were used to calculate “apparent” IC<sub>50</sub> values for the peptides under the assay conditions. Replacement by alanine had the greatest deleterious effect at position 5 (**P9**), which implies that the side chain of Q5 largely contributes to binding affinity. The K→A substitution at position 2 (**P7**) was also slightly detrimental, whereas inhibition was enhanced by the S→A change at position 6 (**P10**).



**Figure 7.** Oxidoreductase activity (absorbance at 512 nm caused by DNTB reduction after 20 min reaction) by Li-TryR in the presence of 25 μM **P7–P17** or **P4**, relative to DMSO (control).

The remaining amino acid replacements hardly affected potency (**P8** and **P11–P17**). In this regard, the unrestrained MD simulation of **P2** bound to the Li-TryR monomer revealed a stable hydrogen-bonding interaction between the Q5 side chain and the backbone of A465' (Figure S9). This alanine, I458', and V460' line a well-defined pocket (~450 Å<sup>3</sup>) into which the side chain of Q5 was buried throughout the simulation. Therefore this residue effectively acts as an anchor for the attachment of **P2** to the surface of the Li-TryR monomer, even though mutation to alanine of the corresponding residue (Q439 in the whole enzyme) did not result in any significant changes in dimerization or oxidoreductase activity. Thus, a residue that was initially identified as a possible dimerization hot spot (Figure 1A) but then turned out not to be essential for enzyme integrity appears to be highly relevant for the binding of a short peptide to the monomer. This finding clearly emphasizes the context dependence of individual side chains at the interface when designing PPI disruptors.

With regard to the minimal length that is required for inhibition, the results obtained with the truncated **P4** derivatives showed that nine amino acids were sufficient to maintain IC<sub>50</sub> values below 4 μM (**P18–P21**); the inhibitory activity was completely lost with further deletion at the C terminus (**P22**; Figure S10). Thus, the four terminal residues appear not to be essential for maintaining significant binding affinity.

Finally, and encouraged by the in vitro results presented above, peptides **P4** and **P21** were evaluated against *L. infantum* axenic amastigotes. Unfortunately, no activity against this form of the parasite was detected. This negative result might be attributable to inability of these peptides to cross the cell membrane and/or to the possibility that higher levels of enzyme inhibition are needed for significant leishmanicidal activity. Further studies for optimizing the drug-like properties of these peptides are ongoing.

In summary, we have analyzed some crucial PPIs at the dimerization interface of Li-TyrR. We identified and validated residue E436 as a hot spot for structural integrity of the dimer and catalytic activity of the enzyme. To examine whether the region that accommodates this residue in the complementary monomer can be regarded as a putative target site for inhibitor design, we tested an exploratory series of peptides: rational variants of the α-helix spanning residues P435 to M447. Our screening methods found that a peptide containing lysine in place of glutamic acid specifically at position 2 outperformed the original sequence in inhibiting both Li-TryR dimerization and oxidoreductase activity, whereas replacement of glutamine at position 5 with alanine resulted in poorer inhibition. MD simulations provided a rationale for these findings. Dimer disruption caused by this peptide is a kinetically slow process when the enzyme is idle, but is greatly accelerated during enzymatic reaction. Although studies on dimerization of other disulfide reductases have been carried out previously,<sup>[6,10,16]</sup> to the best of our knowledge this is the first time that a key functional role for E436 of Li-TryR has been revealed, and that a novel putative target site for the development of small-molecule PPI disruptors has been identified.

## Experimental Section

Complete details of the expression of wt and mutant Li-TryR, biochemical experiments, solid-phase peptide synthesis (SPPS), and molecular dynamics studies are provided in the Supporting Information.

## Acknowledgements

We thank the Spanish MEC/MICINN (Project SAF2009-13914-C02), the Comunidad de Madrid (Project BIPEDD-2-CM ref. S-2010/BMD-2457) and the Junta de Comunidades de Castilla la Mancha (Project PO110-0180-7897) for financial support. M.A.T. and P.A.S.M. are recipients of FPI predoctoral fellowships from the Spanish Government. We are grateful to Dr. Antonio Romero and Dr. Carlos Alfonso Botello (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) for their help with the CD and UAC experiments, respectively, and Kilian Gutiérrez (UAH) for his assistance in protein purification and cytotoxicity assays.

**Keywords:** dimer quantification assay • enzyme models • *Leishmania* • protein–protein interactions • trypanothione reductase

- [1] a) R. L. Krauth-Siegel, S. K. Meiering, H. Schmidt, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 539–549; b) S. Müller, E. Liebau, R. D. Walter, R. L. Krauth-Siegel, *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 320–328.
- [2] A. H. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B. T. Chait, A. Cerami, *Science* **1985**, *227*, 1485–1487.
- [3] H. Castro, A. M. Tomás, *Antioxid. Redox Signaling* **2008**, *10*, 1593–1606.
- [4] S. Krieger, W. Schwarz, M. R. Ariyanayagam, A. H. Fairlamb, R. L. Krauth-Siegel, C. Clayton, *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542–552.
- [5] a) V. Olin-Sandoval, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 1614–1630; b) R. L. Krauth-Siegel, O. Inhoff, *Parasitol. Res.* **2003**, *90 Suppl 2*, S77–S85.
- [6] R. L. Krauth-Siegel, H. Bauer, R. H. Schirmer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 698–724; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 690–715.
- [7] a) G. A. Holloway, W. N. Charman, A. H. Fairlamb, R. Brun, M. Kaiser, E. Kostewicz, P. M. Novello, J. P. Parisot, J. Richardson, I. P. Street, K. G. Watson, J. B. Baell, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2824–2833; b) J. G. A. Walton, D. C. Jones, P. Kiuru, A. J. Durie, N. J. Westwood, A. H. Fairlamb, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 321–328; c) G. Maccari, T. Jaeger, F. Moraca, M. Biava, L. Flohé, M. Botta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5255–5258; d) C. Eberle, B. S. Lauber, D. Fankhauser, M. Kaiser, R. Brun, R. L. Krauth-Siegel, F. Diederich, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 292–301; e) R. Perez-Pineiro, A. Burgos, D. C. Jones, L. C. Andrew, H. Rodriguez, M. Suarez, A. H. Fairlamb, D. S. Wishart, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1670–1680; f) S. Patterson, D. C. Jones, E. J. Shanks, J. A. Frearson, I. H. Gilbert, P. G. Wyatt, A. H. Fairlamb, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1341–1353; g) C. Eberle, J. A. Burkhard, B. Stump, M. Kaiser, R. Brun, R. L. Krauth-Siegel, F. Diederich, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2034–2044; h) J. L. Richardson, I. R. E. Nett, D. C. Jones, M. H. Abdille, I. H. Gilbert, A. H. Fairlamb, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1333–1340; i) D. Spinks, E. J. Shanks, L. A. T. Clegghorn, S. McElroy, D. Jones, D. James, A. H. Fairlamb, J. A. Frearson, P. G. Wyatt, I. H. Gilbert, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2060–2069; j) I. N. Wenzel, P. E. Wong, L. Maes, T. J. J. Müller, R. L. Krauth-Siegel, M. P. Barrett, E. Davioud-Charvet, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 339–351.
- [8] a) A. Saravanamuthu, T. J. Vickers, C. S. Bond, M. R. Peterson, W. N. Hunter, A. H. Fairlamb, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29493–29500; b) E. M. Jacoby, I. Schlichting, C. B. Lantwin, W. Kabsch, R. L. Krauth-Siegel, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1996**, *24*, 73–80.
- [9] S. Patterson, M. S. Alphey, D. C. Jones, E. J. Shanks, I. P. Street, J. A. Frearson, P. G. Wyatt, I. H. Gilbert, A. H. Fairlamb, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6514–6530.
- [10] R. H. Schirmer, J. G. Müller, R. L. Krauth-Siegel, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 153–166; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 141–154.
- [11] J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009.
- [12] R. R. Thangudu, S. H. Bryant, A. R. Panchenko, T. Madej, *J. Mol. Biol.* **2012**, *415*, 443–453.
- [13] a) P. Baiocco, G. Colotti, S. Franceschini, A. Ilari, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603–2612; b) P. Baiocco, A. Ilari, P. Ceci, S. Orsini, M. Gramiccia, T. Di Muccio, G. Colotti, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 230–233; c) A. Ilari, P. Baiocco, L. Messori, A. Fiorillo, A. Boffi, M. Gramiccia, T. Di Muccio, G. Colotti, *Amino Acids* **2012**, *42*, 803–811.
- [14] L. Cavallo, J. Kleinjung, F. Fraternali, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3364–3366.
- [15] J. Klett, A. Núñez-Salgado, H. G. Dos Santos, Á. Cortés-Cabrera, A. Perona, R. Gil-Redondo, D. Abia, F. Gago, A. Morreale, *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 3395–3408.
- [16] A. Nordhoff, U. S. Buecheler, D. Werner, R. H. Schirmer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4060–4066.

Received: November 29, 2012

Revised: March 22, 2013

Published online on June 6, 2013

## Artículo 2.

### Comparison of hydrocarbon-and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase

Pedro A. Sánchez-Murcia<sup>a,b</sup>, Marta Ruiz-Santaquiteria<sup>b</sup>, Miguel A. Toro<sup>c</sup>, Héctor de Lucio<sup>c</sup>,  
María Ángeles Jiménez<sup>d</sup>, Federico Gago<sup>a</sup>, Antonio Jiménez-Ruiz<sup>c</sup>, María-José Camarasa<sup>b</sup>,  
Sonsoles Velázquez<sup>b</sup>.

[a] Departamento de Ciencias Biomédicas, Unidad Asociada al CSIC, Universidad de Alcalá, Madrid (España).

[b] Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), Madrid (España).

[c] Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, Madrid (España).

[d] Instituto Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC), Madrid (España).

**Revista** RSC Advances  
**Editorial** Royal Society of Chemistry  
**Año** 2015  
**Volumen** 5  
**Páginas** 55784-55794  
**DOI** 10.1039/c5ra06853c





CrossMark  
 click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 55784

## Comparison of hydrocarbon-and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase†

Pedro A. Sánchez-Murcia,<sup>ab</sup> Marta Ruiz-Santaquiteria,<sup>b</sup> Miguel A. Toro,<sup>c</sup> Héctor de Lucio,<sup>c</sup> María Ángeles Jiménez,<sup>d</sup> Federico Gago,<sup>a</sup> Antonio Jiménez-Ruiz,<sup>c</sup> María-José Camarasa<sup>b</sup> and Sonsoles Velázquez<sup>\*b</sup>

All-hydrocarbon and lactam-bridged staples linking amino acid side-chains have been used to stabilize the  $\alpha$ -helical motif in short 13-mer peptides that target critical protein–protein interactions at the dimerization interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase (Li-TryR). The design of the best positions for covalent hydrocarbon closure relied on a theoretical prediction of the degree of helicity of the corresponding cyclic peptides in water. Selected ( $i, i + 4$ ) and ( $i, i + 7$ ) hydrocarbon-stapled peptides were prepared by using solid-phase synthesis protocols and optimized ring-closing metathesis reactions under microwave conditions. Structural analysis by NMR spectroscopy confirmed high helical contents in aqueous TFE solutions for both types of helix-constrained cyclic peptides. Remarkably, the ability to prevent Li-TryR dimerization was reduced in both ( $i, i + 4$ ) and ( $i, i + 7$ ) hydrocarbon stapled peptides but was retained in the corresponding ( $i, i + 4$ ) Glu–Lys lactam-bridged analogue, which also showed a higher resistance to proteolytic degradation by proteinase K relative to the linear peptide prototype. *In silico* studies indicated that the introduction of a hydrocarbon staple vs. a lactam bridge likely perturbs critical interactions required for proper binding of the peptide to the Li-TryR monomer.

Received 16th April 2015  
 Accepted 17th June 2015

DOI: 10.1039/c5ra06853c

[www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

## Introduction

Leishmaniasis is a parasitic infection caused by unicellular protozoan organisms (*Leishmania* spp.) belonging to the Trypanosomatidae family. Although this disease is seen nowadays as a global health problem,<sup>1</sup> currently available drugs are decades old and have several drawbacks including poor efficiency and bioavailability, toxicity to humans, high cost, and the emergence of drug-resistant parasitic strains.<sup>2–5</sup> Thus, there is an urgent need to find new targets and/or inhibition mechanisms against these parasites. Trypanothione reductase (TryR; EC 1.8.1.12) is a NADPH flavoenzyme unique to and absolutely essential for protozoan parasites from the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*. TryR catalyzes the reduction of trypanothione disulfide to the dithiol form.<sup>6–8</sup> The cellular role of trypanothione and TryR is preserving a balanced intracellular redox state, a task equivalent to that of the glutathione/glutathione

reductase (GR) pair in mammals.<sup>6</sup> Because of the lack of catalase and glutathione peroxidase activities, these parasites rely solely on the trypanothione system as a defense mechanism against the oxidative stress that is generated either by their own metabolism or by the host immune response.

In addition to playing a pivotal role in the parasite, another characteristic that makes TryR a potential target for antiparasitic drugs is the different substrate specificity from that of GR, the enzyme with the most similar function in humans. These facts make TryR a very attractive validated target for drug development against trypanosomatid-caused infections. Several inhibitors of TryR have been reported including those based on tricyclic antidepressants,<sup>9,10</sup> polyamine conjugates<sup>11,12</sup> and substrate analogues.<sup>9–14</sup> Most of the efforts to inhibit TryR have relied on the design of molecules directed towards the active site but with limited success. Taking advantage of the fact that the functional form of TryR is a homodimer, we have recently reported an alternative inhibition strategy aimed at disrupting the dimer interface of the enzyme by means of protein–protein interaction inhibitors<sup>15</sup> (Fig. 1). By a combination of molecular modelling and site-directed mutagenesis studies we identified and validated E436 as a key amino acid (hot spot) for the structural stability and function of the dimer. On the basis of these results and as a “proof of concept” of this novel approach we designed and tested a small library of linear peptides whose sequences were directly derived from the helical

<sup>a</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas, Unidad Asociada al CSIC, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), Madrid, Spain. E-mail: iqmsv29@iqm.csic.es; Fax: +34 91 5644853; Tel: +34 91 2587458

<sup>c</sup>Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

<sup>d</sup>Instituto Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC), Madrid, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra06853c



homodimerization domain containing E436 (residues P435-M447) of *Leishmania infantum* TryR (Li-TryR). Among the synthesized peptides, the linear PEIQSVGISMKM (1) and PEIQSVGIS-Nle-K-Nle (2) 13-mers, in which a Cys and/or the two Met residues of the wild-type peptide sequence were replaced by isosteric Ser and Nle (in order to prevent potential oxidation), stood out as promising Li-TryR dimerization inhibitors in the micromolar range (Fig. 1).<sup>15</sup>

Covalent side-chain to side-chain linkage (“stapling”) within small  $\alpha$ -helical segments derived from a protein has allowed to overcome the little or no helical character shown in solution by these oligopeptides when they are excised from their native context.<sup>16</sup> Thus, incorporation of both lactam bridges<sup>17–19</sup> and short hydrocarbon chains<sup>20,21</sup> as staples has been shown to enhance helicity, resistance to proteolysis and cell permeability. To date, numerous examples of stapled peptides with affinity for several therapeutic targets and the ability to modulate protein–protein interactions have been reported.<sup>22,23</sup>

In order to stabilize the  $\alpha$ -helical structure of the short linear prototype 2, we herein describe our initial studies on the effects of side-chain hydrocarbon stapling (peptides 5 and 8) [at either one ( $i, i + 4$ ) or two turns ( $i, i + 7$ ) of the  $\alpha$ -helix] or incorporation of a lactam bridge (peptide 11) (Fig. 1) on (i) the peptide helical conformation, (ii) the proteolytic stability, and (iii) the ability to disrupt Li-TryR dimerization. Our data show that the all-hydrocarbon stapled peptides are inactive in Li-TryR dimerization assays whereas the lactam-bridged cyclic peptide stands out as a potent inhibitor of TryR dimerization. A rationale for these significant differences was provided by analysing the results obtained from molecular dynamics (MD) simulations in explicit solvent.

## Results and discussion

### *In silico* design of stapled peptides

From available helix stabilization strategies,<sup>16,17</sup> we first selected the all-hydrocarbon stapling approach developed by Verdine and colleagues.<sup>21</sup> It is well established that for  $i, i + 4$  or  $i, i + 7$

stapling, the most stereochemically favourable cross-link to stabilise helices is through two units of (*S*)- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -pentenylglycine (3) to form  $S_{i, i+4} S(8)$ <sup>24</sup> staples or between one unit of (*R*)- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -octenylglycine (4) (figure in Table 1) and one unit of 3 to form  $R_{i, i+7} S(11)$ <sup>25</sup> staples according to the nomenclature described by Verdine *et al.*<sup>21a</sup> Since the staple position critically influences the overall degree of structure and biological activity of a given peptide,<sup>21a,26</sup> we first performed an *in silico* analysis to select the best positions for covalent  $i, i + 4$  and  $i, i + 7$  closures that would lead to a higher degree of stabilization of the helical structure in linear peptide 2 (Table 1). All the staples in peptide 2 were placed on the face opposite to that used for binding to the Li-TryR monomer so as to preserve the crucial interactions at the interface.

Table 1 highlights all possible positions in the sequence of 2 for the introduction of the non-natural  $\alpha, \alpha$ -disubstituted residues bearing the double bonds (3 and 4) which would lead to the hydrocarbon bridge after ruthenium-catalyzed ring closing metathesis (stapled peptides 5–10). There are six possible stapled peptides: 5 and 6 ( $i, i + 7$  staples) and 7–10 ( $i, i + 4$  staples).

Stapled peptides 5–10 showed increased degrees of predicted helicity per residue compared to the linear peptide 2 (Fig. 2). In addition, significant differences were found depending on the position and the length of the hydrocarbon staples.

In general, the  $i, i + 7$  stapling system was found to be more stabilizing than  $i, i + 4$  in terms of absolute helicity values. Among the possible  $i, i + 7$  staples, peptide 5 displayed the highest  $\alpha$ -helix propensity towards the N-terminus, reaching absolute values close to 50% helicity (Fig. 2, in red). On the other hand, peptide 8 with the  $i, i + 4$  staple located at the centre of the helix (Fig. 2, in purple) exhibited the highest  $\alpha$ -helix stabilization towards the C-terminus. On the basis of these findings, stapled peptides 5 and 8 (linking positions 4 and 11 and 4 and 8, respectively) were selected for synthesis and further study.

For comparative purposes, the constrained  $i, i + 4$  cyclic analogue with a lactam bridge between the side-chains of Glu-Lys residues at positions 4 and 8 [Ac-PEI(EQSVK)IS-Nle-K-Nle-NH<sub>2</sub> (11)] was also selected for study. This enabled us to compare the effects of hydrocarbon *versus* lactam linkers on helix stabilization and on Li-TryR dimerization disruption.

### Chemical synthesis

For hydrocarbon-stapled peptides, we first synthesized the required optically pure  $\alpha, \alpha$ -disubstituted amino acids (*S*)-3 and (*R*)-4. This was made from the commercially available chiral diphenyloxazinones following the procedure described by Williams and colleagues<sup>27</sup> and the modifications reported by Verdine's group.<sup>21a</sup> In brief, two consecutive asymmetric alkylations on C-3, scaffold cleavage, and final Fmoc protection of the N-terminal amino acid gave the desired quaternary amino acids (*S*)-3 and (*R*)-4 (Scheme S1, ESI†).

Target stapled peptides 5 and 8 were synthesized manually following the standard Fmoc/tBu solid-phase orthogonal protection strategy on Rink amide-MBHA polystyrene resin (Scheme 1). The appropriate  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -alkenylamino acids

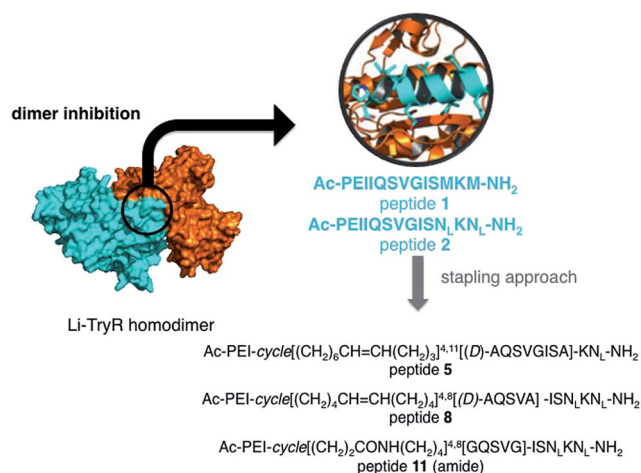
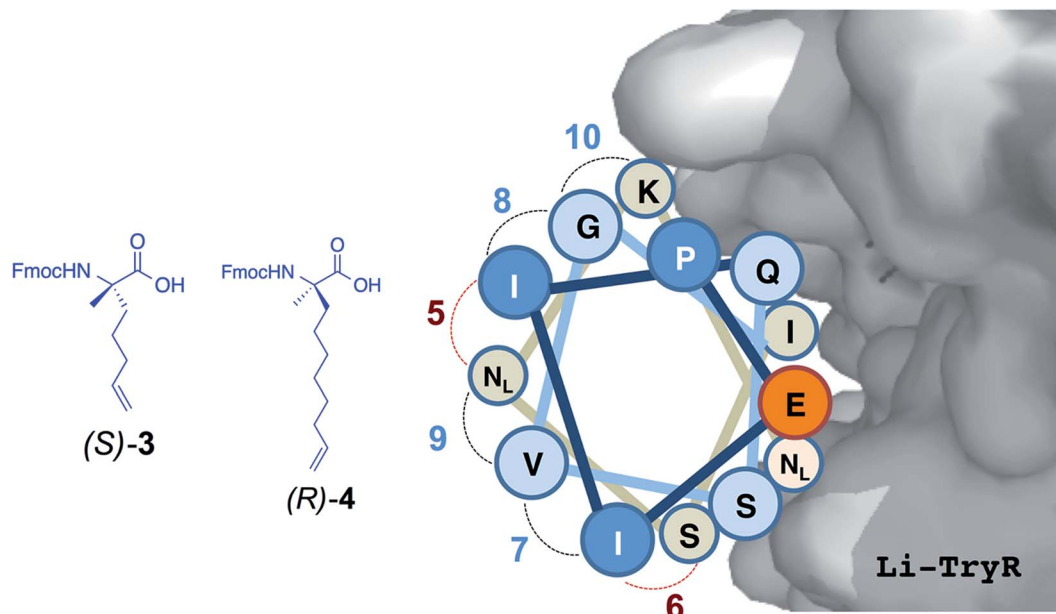


Fig. 1 Li-TryR dimer inhibition strategy and designed stapled peptides synthesized in this work. N<sub>L</sub>: norleucine.

**Table 1** Chemical structure of non-proteinogenic amino acids (*S*)-3 and (*R*)-4 and helical wheel projection of linear peptide prototype 2 onto the Li-TryR monomer showing all possible stapling positions at the non-recognition side that would lead to stapled peptides 5–10<sup>a</sup>

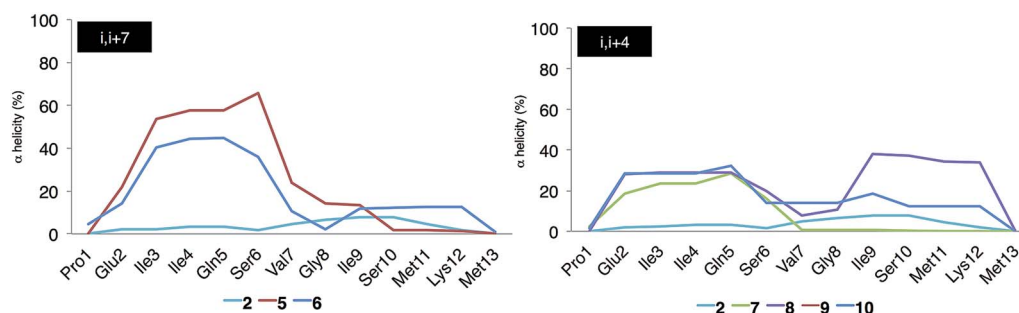


| Peptides      | Position |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                |    |                |
|---------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----------------|----|----------------|
|               | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11             | 12 | 13             |
| 1 (linear)    | P        | E | I | I | Q | S | V | G | I | S  | M              | K  | M              |
| 2 (prototype) | P        | E | I | I | Q | S | V | G | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |
| 5             | P        | E | I | 4 | Q | S | V | G | I | S  | 3              | K  | N <sub>L</sub> |
| 6             | P        | E | 4 | I | Q | S | V | G | I | 3  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |
| 7             | P        | E | 3 | I | Q | S | 3 | G | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |
| 8             | P        | E | I | 3 | Q | S | V | 3 | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |
| 9             | P        | E | I | I | Q | S | 3 | G | I | S  | 3              | K  | N <sub>L</sub> |
| 10            | P        | E | I | I | Q | S | V | 3 | I | S  | N <sub>L</sub> | 3  | N <sub>L</sub> |

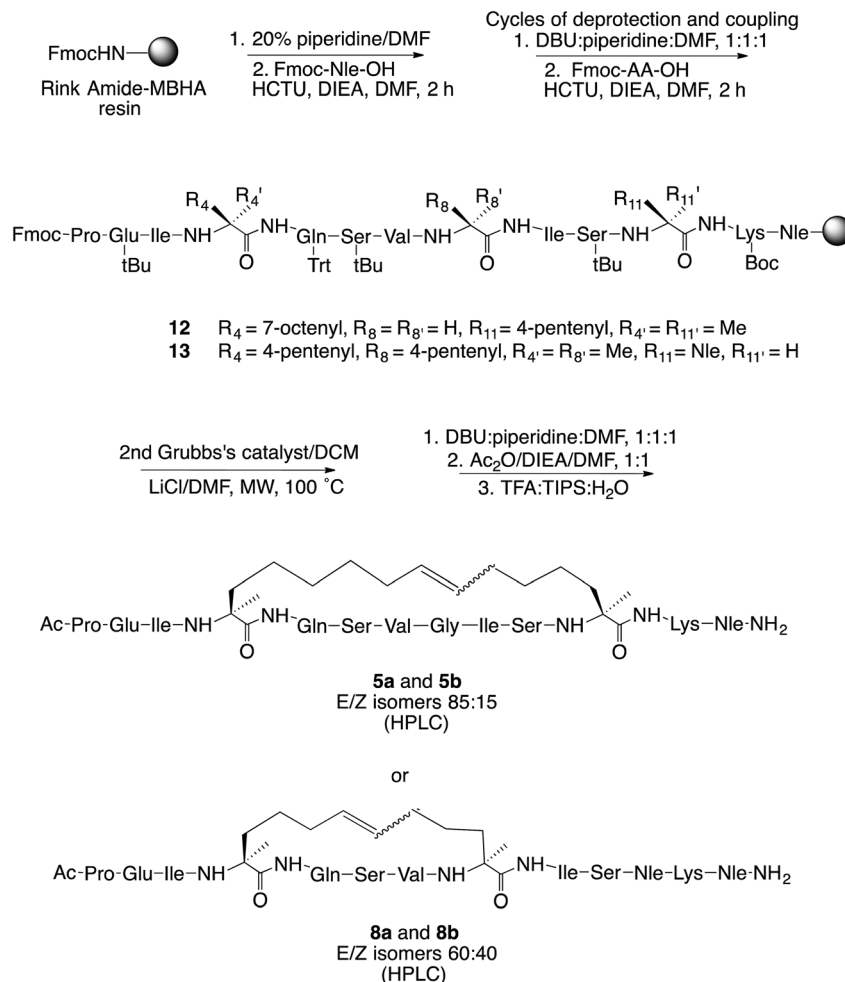
<sup>a</sup> N<sub>L</sub>: norleucine.

were introduced at the right positions of the sequence in the elongation step. Dicarba bridge formation was accomplished from the linear precursors 12 and 13 through on-resin ring-closing metathesis (RCM) using Grubb's second-generation ruthenium catalyst. The optimal microwave conditions for the

RCM reaction were 100 °C using 20 mol% of catalyst, LiCl as a chaotropic agent<sup>28</sup> and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as the solvent. Next, the N-terminus of the peptides was acetylated and cleaved from the resin under standard conditions.



**Fig. 2** Predicted  $\alpha$ -helicities per residue (%) of peptides 5–10 and 2 (prototype) calculated with the *dspp* algorithm.



Scheme 1 Synthesis of target stapled peptides 5a, b and 8a, b.

Table 2 Potency of linear peptide 2 and cyclic peptides 5a, 8a, 8a, b and 11 in the Li-TryR monomer displacement assay

| Peptide   | IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM) |
|---|------------------------------------|
| 2 (linear prototype)                                | 15.6 ± 1.4                         |
| 5a (major isomer; 4,11-hydrocarbon-stapled)         | >75                                |
| 8a (major isomer; 4,8-hydrocarbon-stapled)          | >75                                |
| 8a, b (mixture of isomers; 4,8-hydrocarbon-stapled) | >75                                |
| 11 (4,8-lactam-bridged)                             | 24.8 ± 0.4                         |
| Mepacrine (control)                                 | >75                                |

<sup>a</sup> Results are representative of three independent experiments each performed in triplicate. >75 indicates that IC<sub>50</sub> is higher than 75 μM (maximum assayed).

The crude peptides were purified on reverse phase solid-phase extraction (SPE) cartridges or semipreparative high performance liquid chromatography (HPLC) to give the desired stapled peptides 5 and 8 in 30% and 6% overall yields, respectively. Both *E* and *Z* isomers were detected by HPLC in 85 : 15 and 60 : 40 ratios for 5 and 8, respectively, and could be partially separated. The major isomers 5a and 8a very probably

corresponds to the *E* isomers since the NMR coupling constant <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> between the vinyl protons is approximately 13–15 Hz.

### Inhibition of Li-TryR dimerization

The effects on dimer stability of the (*i*, *i* + 4 or *i*, *i* + 7)-hydrocarbon stapled peptides 5a (major isomer), 8a (major isomer), 8a, b (mixture of isomers) and the (*i*, *i* + 4) lactam-bridged analogue 11, and the linear prototype peptide 2 were evaluated by using a highly sensitive and versatile in-house ELISA<sup>15</sup> (Table 2). These studies revealed that all-hydrocarbon stapled analogues 5a, 8a and 8a, b did not significantly promote disruption of the Li-TryR dimer. In contrast, the lactam-bridged analogue 11 reduced the detection of labeled Li-TryR dimer to the same extent that did their linear counterpart 2. Thus, even when the same positions are stapled (8a or 8a, b vs. 11), the nature of the covalent linkage has a deep impact on the potency of the peptides as Li-TryR dimerization disruptors.

### NMR structural studies

In order to elucidate whether the nature of the covalent linkage could have a differential effect on the structure of the all-

hydrocarbon-stapled **8** and lactam-bridged **11** peptides we examined the structural behaviour of these peptides in solution by 1D and 2D NMR spectroscopy. In particular, we selected the lactam-bridged derivative **11** and the major geometric isomer of peptide **8a** (isomer *E* according to a NMR coupling constant  $^3J_{\text{HH}}$  between the vinyl protons  $>15$  Hz). Both peptides **8a** and **11**, in the TFE-H<sub>2</sub>O solvent,<sup>29</sup> showed medium-range NOE cross-peaks characteristic of  $\alpha$ -helices, *i.e.*  $d\alpha N_{(i, i+2)}$ ,  $d\alpha N_{(i, i+3)}$ ,  $d\alpha N_{(i, i+4)}$ , and  $d\alpha\beta_{(i, i+3)}$  (Fig. 3). As an example, a detail of the <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY spectra of **8a** and **11** is shown in Fig. 3A and B. Additionally, the deviations of chemical shifts from random coil values shown by the H $\alpha$  protons ( $\Delta\delta_{\text{H}\alpha} = \delta_{\text{H}\alpha}^{\text{observed}} - \delta_{\text{H}\alpha}^{\text{random coil}}$ , ppm) are positive and large in magnitude (Fig. S1†), which are also characteristic of helices. The percentages of helix formed by peptides **8a** and **11** in 30% TFE at pH 5.5 and 25 °C are 71% and 88%, respectively, as estimated from the averaged  $\Delta\delta_{\text{H}\alpha}$  values.<sup>30</sup>

Given the large helical populations presented by stapled peptides **8a** and **11**, and to visualize their 3D structure, we next performed structure calculations from geometric constraints (distances and dihedral angles; Table S1†) derived from NMR parameters and using the CYANA program.<sup>31</sup> The ensemble of the 20 lowest target function conformers resulting for each peptide was well defined, as seen in Fig. 4, and indicated by the pairwise root mean square deviation (RMSD), which is  $0.50 \pm 0.20$  and  $0.60 \pm 0.20$  Å for the backbone atoms of peptides **8a** and **11**, respectively (Table S1†).

On the other hand, the superimposition of the two best calculated structures for cyclic peptides **8a** and **11** with the Li-

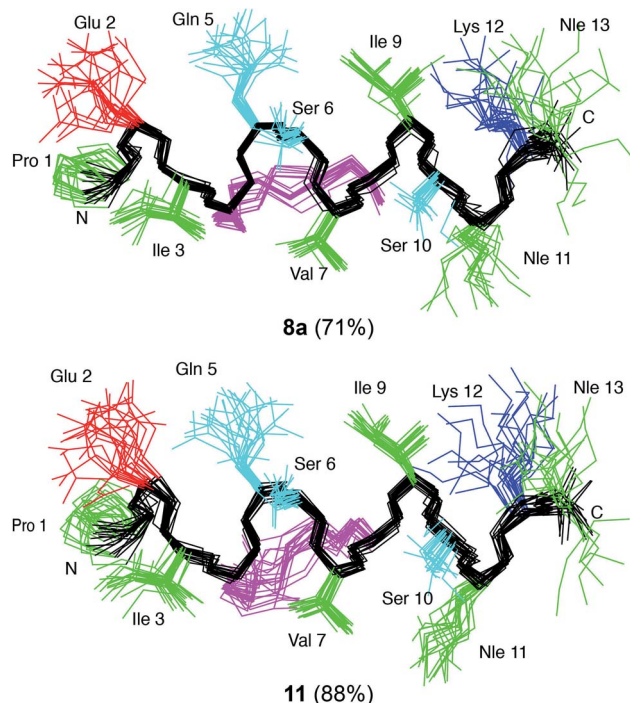


Fig. 4 Superimposition of the 20 lowest target function calculated structures for peptides **8a** and **11** and their helix population (%) in solution (in brackets). Backbone atoms are shown in black. Covalent closures are highlighted in magenta.

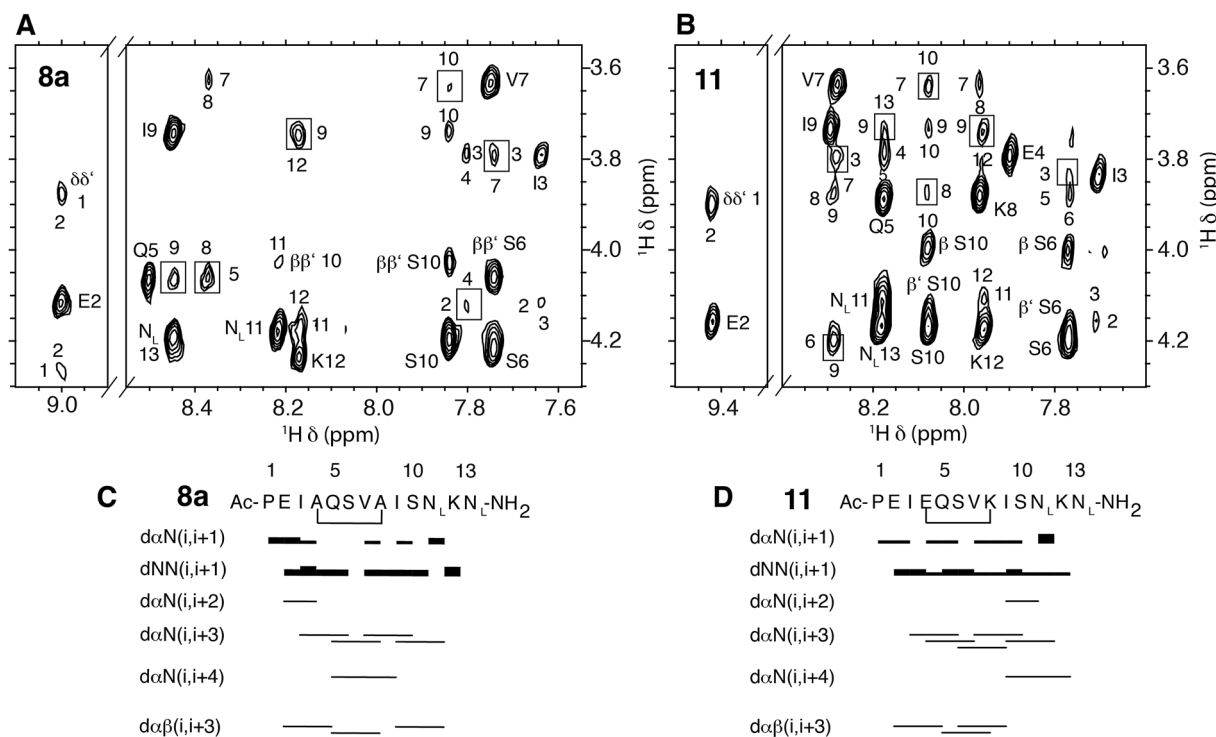


Fig. 3 Detail of the 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY spectrum of **8a** (A) and **11** (B) in 30% TFE in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9 : 1 v/v at pH 5.5 and 25 °C. The intra-residue  $\alpha N_{(i, i+1)}$  and sequential  $\alpha N_{(i, i+1)}$  NOE cross-peaks are labelled and the medium-range  $\alpha N_{(i, i+2)}$  and  $\alpha N_{(i, i+3)}$  NOE cross-peaks are also boxed. (C) NOE summary of **8a**. (D) NOE summary of **11**.

TryR  $\alpha$ -helix Pro435-Met447 in the native protein shows a correct orientation of the side chains of those residues in the interaction face with the protein (Fig. S2<sup>†</sup>). This confirms our premise that the staple is oriented on the opposite face. However, it is noteworthy that there are no relevant differences in structuring both cyclic peptides as  $\alpha$ -helices in TFE/H<sub>2</sub>O solution, and therefore, the observed variations in the activity of the peptides as dimer disruptors cannot be attributed to differences in the ability of the staples to stabilize the helical structure in solution.

### Molecular modelling

The MD simulation studies (Fig. 5) complemented the NMR solution experiments, as it is known that the conformation of a protein-bound ligand can be different from that found in solution. In this case, we considered both geometric isomers *E/Z* of all-hydrocarbon stapled peptides **5a**, **b** and **8a**, **b**, the lactam-bridged derivative **11** and the linear prototype **2** (used as a control).

We have previously shown<sup>15</sup> that the replacement of the Gln side chain at position 5, in similar 13-mer peptides, by Ala has the greatest deleterious effect on their potency as Li-TryR inhibitors. Thus, we monitored the interaction of the former residue with the Li-TryR monomer along the different MD trajectories for all the simulated peptides. As an example, Fig. 5 shows the evolution of the distances between the crucial Gln5 side chain of the peptides and the amide N(Val460) and O(Ile458) backbone atoms of Li-TryR monomer for the hydrocarbon-stapled derivative **8a**, the lactam-bridged **11** and the linear counterpart **2**. As can be observed, the introduction of the all-hydrocarbon staple in **8a** (Fig. 5, in red) perturbs the interaction of Gln5 with the Li-TryR monomer when compared with the linear peptide **2**. This is a common feature for the rest of the hydrocarbon-stapled peptides studied along the different MD simulations (data not shown). On the contrary, peptide **11** carrying an amide as the covalent bridge, keeps these interactions to a similar extent as the linear counterpart.

Calculation of the total interaction energies for these peptides, when bound to the Li-TryR monomer along the MD trajectories

(Fig. S3 and Table S2<sup>†</sup>), reveals that the introduction of the all-hydrocarbon staple in both double-bond isomers **5** and **8** results in a significant 30% decrease in the total binding energy relative to the linear peptide **2**. Regarding the amide-bridged derivative **11**, reduction in the total binding energy is much smaller (14%). These results are in consonance with the experimental IC<sub>50</sub> values shown in Table 2. Visual inspection of the representative structures of the major clusters of peptides **2**, **8a**, **b** and **11** calculated along the MD trajectories (Fig. S4<sup>†</sup>) reveals that the unsaturated all-hydrocarbon stapled **8a**, **b**, when bound to the protein, do not preserve the helicity at both N- and C-terminus, in agreement with the fraying observed in the NMR structure of **8a** (Fig. 4). Instead, in **11**, the amide bridge is compatible with a good orientation of Gln5. Thus, the binding differences observed along the MD trajectories can be attributed to the hydrophobic nature of the hydrocarbon linker. Hydrocarbon stapling technology is generally considered as an effective tool to increase the affinity of  $\alpha$ -helical peptides for their targets. However, there are reported examples demonstrating that disruption of stabilizing intramolecular interactions between side chains<sup>32</sup> or reduction of the flexibility in the stapled peptide<sup>33</sup> can prevent adoption of the conformation needed for efficient binding to their target relative to the unstapled peptide. Thus, our studies complement these previous observations that peptide stapling with a view to increasing helicity does not necessarily result in enhanced binding affinity for the target protein.

### Proteolytic stability

Cleavage by proteases is one of the main pathways for inactivation of peptides in a biological setting. Because proteases bind to their substrates in an extended rather than in a helical conformation, increasing or maintaining a helical conformation is expected to confer proteolytic stability. To determine the influence of lactam-bridged stabilization on proteolytic stability of the peptides, we compared the susceptibilities of the linear prototype peptide **2** and the active lactam-bridged analogue **11** towards degradation by proteinase K, a promiscuous serine protease. The half-live for the lactam-bridged analogue **11** was significantly increased, with calculated  $t_{1/2}$  values of 316 min compared to 23 min for the linear peptide **2**.<sup>34</sup> This 14-fold improvement could be due to the increased  $\alpha$ -helical character of the cyclic analogue and/or to the presence of the bridge itself, which would be expected to sterically affect the access to protease-sensitive peptide bonds. This result is consistent with previous findings for helix-constrained peptides<sup>35</sup> and makes peptide **11** a new hit that retains the inhibitory potency shown by the linear prototype but it is endowed with improved pharmacokinetic properties. As an illustrative example of all-hydrocarbon stapling, similar proteolytic stability studies with hydrocarbon-stapled analogue **5a** revealed comparable improvement in stability compared to the lactam-bridged analogue **11** ( $t_{1/2}$  values of 286 min vs. 316 min, respectively).

## Conclusions

We have compared two different strategies for covalently linking amino acid side-chains in a short linear peptide (13-mer)

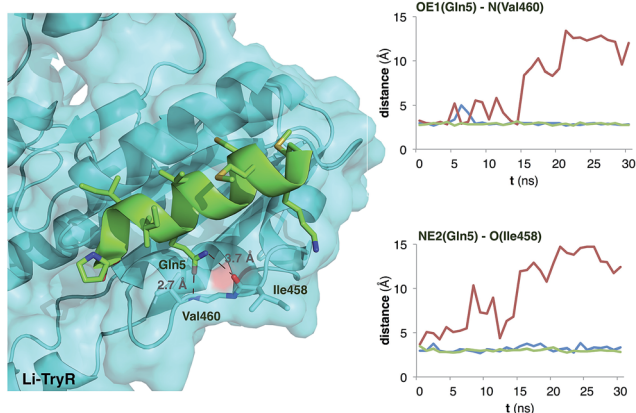


Fig. 5 Evolution of distances (Å) between the Gln5 side chain (carbon atoms coloured in green) of peptide **2** (green), **8a** (red) and **11** (blue) and the Li-TryR monomer (carbon atoms coloured in blue) along their respective MD trajectories.

that targets a hotspot at the dimerization interface of Li-TryR. A series of rationally designed ( $i, i + 4$ ) and ( $i, i + 7$ ) hydrocarbon stapled derivatives linking amino acids at positions 4 and 8 (peptide **5**) or 4 and 10 (peptide **8**), respectively, and a lactam-bridged analogue of **8** (peptide **11**) were investigated. Although the all-hydrocarbon stapling approach has been reported as successful in many published examples, in our case the hydrocarbon-stapled analogues were not able to disrupt the dimerization process of the enzyme whereas the lactam-bridged analogue **11** maintained the potency of the native linear peptide **2**. Thus, our biological results reveal that the nature of the covalent linker plays a major role in the peptide's ability to prevent Li-TryR dimerization. Structural NMR studies in solution showed that both hydrocarbon and lactam-bridged peptides **8** and **11** display a high  $\alpha$ -helical content in TFE-water mixtures. On the other hand, MD simulations of the linear and cyclic analogues bound on the surface of a Li-TryR monomer indicated that the lactam-bridged peptide **11** could maintain the right orientation of the essential Gln5 side-chain better than the hydrocarbon stapled analogue **8**. Thus, our studies represent an example of how the nature of the covalent linkage (hydrocarbon vs. lactam) may perturb critical interactions required for proper binding to the protein. These findings may be taken into account when designing helix-constrained peptides. Interestingly, the lactam-stabilized analogue **11** not only affords the spatial arrangement of the critical residues in the correct conformation for activity but also provides higher proteolytic stability (14-fold) in comparison to its linear peptide counterpart.

## Experimental

### Chemistry

Unless otherwise noted, analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. DMF and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  were dried using activated molecular sieves. Water sensitive reactions were carried out under Ar atmosphere. Chiral diphenyloxazinones, Grubb's second-generation ruthenium catalyst, HCTU, DIEA, piperidine, sodium hexamethyldisilylamide, lithium hexamethyldisilylamide and  $\text{Ac}_2\text{O}$  were purchased from Aldrich (Germany), and TFA from Fluka (Germany). Peptide Ac-PEI(EQSVK)IS-Nle-K-Nle-NH<sub>2</sub> (**11**) cyclized through an amide bond between E4 and K8 was purchased from Peptide Protein Research (UK). The pure product was analyzed by HPLC and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Fmoc-protected amino acids were purchased from Fluka, Novabiochem (Merck, Germany) and Iris Biotech (Germany). Fmoc-protected Rink Amide MBHA resin (0.47 mmol  $\text{g}^{-1}$  loading) was purchased from GS Biochem (China). All amino acids used were of the L-configuration. Linear precursor peptides **12** and **13** were synthesized manually on a 20-positions manifold (Omega) in a 20 mL polypropylene syringe (Dubelcco) equipped with a porous polyethylene filter following SPPS protocols. The coupling and RCM reactions were carried out on solid phase using microwave radiation in a Biotage Initiator reactor in a 5 mL vial. The rest of the SPPS reactions were stirred using an IKA-100 orbital shaker.

After cleavage, the acidic crudes were sedimented in  $\text{Et}_2\text{O}$  on a Hettlich Universal 320R centrifuge at 5000 rpm. All the crude and samples were lyophilized using mixtures  $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN}$  on a Telstar 8-80 instrument. The monitoring of the reactions was also performed by HPLC/MS through a Waters 12695 HPLC connected to a Waters Micromass ZQ spectrometer. Peptides were purified by reverse-phase flash chromatography using C-18 derivatized silica cartridges (C18 Discovery SPE, Aldrich) in a manifold system or by semipreparative HPLC on a Waters 600 apparatus using an ACE 5 C18-300 (10  $\times$  250 mm) column at a flow rate of 6 mL  $\text{min}^{-1}$  and a Waters 2487 detector, monitored at 214 nm. Mixtures of  $\text{CH}_3\text{CN}$  (solvent A) and  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.05% TFA (solvent B) were used a mobile phase. The purity of the synthesized peptides was checked by an HPLC system (Waters 600 or an Agilent equipment) using in all cases a Sunfire C18 column (4.6 mm  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) and the same solvents as the mobile phase (1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  flow). Peak detection was carried out at 214 and 254 nm. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained in an Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS mass spectrometer using 1% formic acid MeOH or MeOH- $\text{CH}_3\text{CN}$  mixtures.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded in general in  $\text{CDCl}_3$ , acetone- $d_6$  or DMSO- $d_6$  on a Varian INOVA-400 (400 & 100 MHz), a Varian MERCURY-400 (400 & 100 MHz), a Varian UNITY-500 (500 & 125 MHz) or in a Bruker Avance 600 (600.13 & 150.03 MHz) spectrometer using TMS or DSS as the internal reference. The latter was equipped with a TXI cryoprobe. NMR experiments of helix-constrained analogues **5a**, **8a** and **11** were recorded at 1–2 mM concentration in 30% TFE/ $\text{H}_2\text{O}$  solution.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts ( $\delta$ ) assignment of the former peptides was performed following the standard sequential assignment method using the SPARKY software.<sup>36</sup> Optical rotation measurements were performed in a Perkin Elmer 241 MC using a 1 mL cell at 589 nm (sodium D-line).

### Synthetic procedures

**Peptide elongation.** MBHA-Rink Amide resin (1 equiv) previously swollen in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (4  $\times$  0.5 min) was treated with a solution of piperidine : DBU : DMF, 1 : 1 : 48 (1  $\times$  1 min) and (3  $\times$  10 min) (incomplete Fmoc deprotection was observed with the standard 20% piperidine in DMF) and the resin was drained and washed with  $\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$  (4  $\times$  0.5 min). Then, a solution of the corresponding N-Fmoc-protected amino acid (1.2 equiv), HCTU (1.2 equiv) and DIEA (2.4 equiv) in anhydrous DMF (0.5–1.0 mL) was added over the swollen peptidil-resin (1.0 equiv) in anhydrous DMF in a microwave vial (5–10 mL). The coupling reaction was heated at 40  $^\circ\text{C}$  using microwave radiation for 10 min. Each coupling step was repeated 3 times using freshly prepared Fmoc-amino acid/coupling reagent mixtures. After complete couplings, the resin was drained and washed with  $\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4  $\times$  0.5 min). Coupling reactions to primary and secondary amines were monitored by the ninhydrin and the chloranil tests, respectively.

**Ring closing metathesis (RCM) reaction.** To the peptidyl-resins **12** and **13** (0.05–0.07 mmol) swollen in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) in a microwave vial (5–10 mL) second generation

Grubb's catalyst (0.2 equiv) was added and the vial was sealed and gently bubbled with argon. Then, the reaction was heated at 40 °C using microwave radiation for 30–150 min. The resin was then filtered and washed successively with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Residual ruthenium impurities were removed by stirring the resin bound peptide with a solution of DMSO (50 equiv relative to the catalyst) in DMF for 12 h.<sup>37</sup> Finally, the resin was washed with DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (3 × 0.5 min).

**Acetylation and cleavage procedure.** The cyclic olefinic peptidil-resins, previously swollen, were treated with 2 mL of 20% piperidine in DMF (1 × 1 min) and (3 × 10 min) and washed with DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (4 × 0.5 min). Then, a mixture of acetic anhydride/DIEA/DMF (2 mL, 1 : 1 : 1) was added (1 × 1 min) and (4 × 10 min) and washed with DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF (4 × 0.5 min). The cyclic resin-bound peptides were then cleaved from the resin by treatment with an acidolytic mixture of TFA : TIPS : H<sub>2</sub>O, 90 : 5 : 5 (6 mL) for 4 h at room temperature. The filtrates were precipitated from cold diethylether (50 mL), centrifuged at 5000 rpm (3 × 10 min) and lyophilized. The cleaved products were purified by reverse phase chromatography using SPE cartridges or semipreparative HPLC.

*Ac-Pro-Glu-Ile-cycle[(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sup>3,11</sup>[(D)-Ala-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Ala]-Lys-Nle-NH<sub>2</sub> (5a, b).* After elongation of the peptide starting from 0.05 mmol of Rink amide resin, the metathesis reaction was carried out for 30 min following the general protocol under microwave conditions. Then, the cyclic peptide was *N*-acetylated and cleaved from the resin. The crude was purified by reverse phase chromatography using SPE cartridges to give the cyclic peptide **5a, b** (23.7 mg, 30% overall yield) as a partially solved mixture of *E/Z* isomers (85/15) in three fractions: major isomer (12.0 mg), minor isomer (1.0 mg) and mixture (10.7 mg). HPLC (waters, 5% to 100% of water in 30 min): 4.06 min (**5a**, major isomer, 92% analytical purity) and 3.89 min (**5b**, minor isomer). Major isomer **5a**: HRMS (ESI, +) *m/z*: calculated for C<sub>71</sub>H<sub>122</sub>N<sub>16</sub>O<sub>19</sub> 1502.9017; found 752.4580 [(M + 2H)/2]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, 30% TFA D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O, 1 : 9) and <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, 30% TFA D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O, 1 : 9) in Table S3 (ESI<sup>†</sup>).

*Ac-Pro-Glu-Ile-cycle[(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>3,8</sup>[(D)-Ala-Gln-Ser-Val-Ala]-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH<sub>2</sub> (8a, b).* After elongation of the peptide starting from 0.07 mmol of Rink amide resin, the metathesis reaction was carried out for 150 min following the general protocol under microwave conditions. After *N*-acetylation and cleavage from the resin, the crude was purified by semipreparative HPLC (waters, 3% to 30% of water, linear gradient in 27 min) to yield the cyclic derivative **8a, b** (7.8 mg, 6% overall yield) as a partially solved mixture of *E/Z* isomers (60 : 40) in two fractions: major isomer (2.1 mg) and mixture (5.7 mg). HPLC (Agilent, 10% to 100% of water in 10 min): 6.68 min (**8a**, major isomer, 90% analytical purity) and 6.49 min (**8b**, minor isomer). Major isomer **8a**: HRMS (ESI, +) *m/z*: calculated for C<sub>72</sub>H<sub>124</sub>N<sub>16</sub>O<sub>19</sub> 1516.9208; found 759.4669 [(M + 2H)/2]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, 30% TFA D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O, 1 : 9) and <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, 30% TFA D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O, 1 : 9) in Table S4 (ESI<sup>†</sup>).

*Ac-Pro-Glu-Ile-cycle[(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>3,8</sup>[Glu-Gln-Ser-Val-Lys]-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH<sub>2</sub> (11).* This peptide, cyclized through an amide bond between E4 and K8, was purchased from Peptide

Protein Research (UK). The pure product was analyzed by HPLC and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). HPLC (Agilent, 10% to 100% of water in 10 min): 5.98 min, 95% analytical purity. HRMS (ESI, +) *m/z*: calculated for C<sub>69</sub>H<sub>119</sub>N<sub>17</sub>O<sub>20</sub> 1505.8823; found 1506.8900 [M + H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, 30% TFA D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O, 1 : 9) and <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, 30% TFA D<sub>2</sub>O : H<sub>2</sub>O, 1 : 9) in Table S5 (ESI<sup>†</sup>).

**Protease susceptibility assays.** Stock solutions of proteinase K were prepared in tris-buffered saline (TBS buffer) (50 μg mL<sup>-1</sup> based on weight to volume). Stock solutions of the linear peptide **2** and amide-bridge cyclic analogue **11** (100 μM) were prepared using 10% DMSO in TBS buffer (pH 7.6, Aldrich). For the proteolysis reaction, the former peptide stock solutions (200 μL) were mixed with TBS (120 μL). Then, proteinase K stock solution (80 μL) was added (final concentration enzyme 10 μg mL<sup>-1</sup>), the solution mixed, and finally allowed to proceed at room temperature with orbital shaking. Then, the enzymatic reaction was quenched (50 μL) at the desired time point (0, 5, 15, 30, 60, 180 and 300 min for linear peptide **2** and 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 min and 24 h for cyclic analogue **11**) by addition of 1% TFA in water/acetonitrile 1 : 1 (100 μL). 30 μL of the resulting quenched reaction was injected onto an HPLC-MS (through a HPLC-waters 12695 connected to a Waters Micro-mass ZQ spectrometer), and the amount of starting peptide present was quantified by mass integration of the peak at 214 nm. Duplicate or triplicate reactions were run for each time point reported and half-lives were determined by fitting time dependent peptide concentration to an exponential decay using GraphPad Prism.

**NMR structural study of peptides 8a and 11.** Due to poor water-solubility, samples of peptides **8a** and **11** were prepared at a 1–2 mM concentration in a solution of deuterated TFE/H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9 : 1 30 : 63 : 7 in volume at pH 5.5. This pH was selected because amide NH signals are more intense and sharper at pH 5.5 than at pH 7.0, and the pK<sub>a</sub> values for the charged side chains in these peptides (Glu & Lys) lie out of this pH range. Hence, peptide conformation will be the same within this pH range. 1D <sup>1</sup>H spectra, 2D homonuclear (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY, 60 ms <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-TOCSY, and 150 ms <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY) spectra, and 2D heteronuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC spectra at natural <sup>13</sup>C abundance were acquired as previously described<sup>38</sup> using a Bruker AV-600 spectrometer operating at a <sup>1</sup>H frequency of 600.13 MHz and equipped with a cryoprobe. Data were processed using the TOPSPIN program.<sup>39</sup> <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts (δ) were assigned following the standard sequential assignment method<sup>40</sup> using the SPARKY software.<sup>36</sup>

Distance constraints for structure calculation were derived from 2D NOESY spectra. The automatic integration subroutine of the Sparky program<sup>36</sup> was used to integrate the NOE cross-peaks. Dihedral angle restraints for φ and ψ angles were derived from <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>Cα and <sup>13</sup>Cβ chemical shifts using the TALOS program.<sup>41</sup> Since TALOS does not include non-natural residues, Nle and the hydrocarbon staple's residues were considered as Lys for this program. Structure calculations were performed using the program CYANA 2.1.<sup>42</sup> First, the non-natural residue Nle and those required for the covalent closure in peptide **8a** (amino acid (S)-3) and **11** (Glu and Lys of the amide bridge) were

generated in the format required for the CYANA library. Then, the standard iterative protocol for automated NOE assignment was run using as input the list of integrated NOE cross-peaks and the full list of chemical shifts, and as additional restraints, the TALOS-derived  $\phi$ ,  $\psi$  dihedral angle ranges, and the upper and lower limit restraints required to link residues at positions 4 and 8. The iterative protocol consists of seven cycles of combined automated NOE assignment and structure calculation of 100 conformers per cycle, and a final step of standard annealing calculation of 100 conformers.<sup>43</sup> The ensemble of the 20 lowest target function conformers resulting from were examined and visualised with MOLMOL<sup>44</sup> and PyMOL.

**Molecular dynamics (MD) simulations.** Models for all possible stapled peptides 5–10 analyzed in Table 1 were built using the Cartesian coordinates of the  $\alpha$ -helix formed by residues Pro435–Met447 of monomer B of Li-TryR (PDB entry 2JK6) by introducing the all-carbon staple the *Z* isomer of the olefin in the appropriate positions. In all cases, N- and C-terminal were defined as acetyl carbamate and carboxamide, respectively. All the systems were simulated in the same conditions as described previously.<sup>15</sup> Peptides 5–10 were introduced in a box of TIP3P waters using the tool *tleap*, integrated in the suite of programs AMBER 12.0.<sup>45</sup> To do this, it was previously necessary to calculate the partial charges and force field parameters for the non-proteinogenic residues (*S*)-3, (*R*)-4, and norleucine (Nle). The cut-off distance for the nonbonded interactions was 12 Å and periodic boundary conditions were used. Electrostatic interactions were treated using the smooth particle mesh Ewald (PME) method with a grid spacing of 1 Å. The SHAKE algorithm was applied to all bonds involving hydrogen atoms and an integration step of 2.0 fs was used throughout. The system was progressively relaxed by energy minimizations, heated to 300 K, and further simulated for a total time of 100 ns without any restraints, as described previously.<sup>15</sup> As a hypothesis, in all-hydrocarbon stapled peptides the *Z* isomer of the olefin bridge was used. All peptides were simulated with N- and C-termini protected as acetyl and carboxamide, respectively. The average degree of theoretical helicity per residue in 5–10 was assessed with the DSSP<sup>46</sup> algorithm along the course of 100 ns MD simulations at 300 K. The linear prototype 2 was simulated under the same conditions for comparative purposes.

To build the peptide : Li-TryR complexes, the corresponding peptide was overlaid onto the Pro435–Met447  $\alpha$ -helix of monomer B in the crystal structure of the enzyme. Then, a 30 ns unrestrained MD simulation was performed for each system following the general protocol. The total and per-residue peptide–protein binding energies (kcal mol<sup>-1</sup>) were calculated by means of the fast and versatile program MM-ISMSA<sup>47</sup> using the snapshots collected during the last 20 ns of the respective MD simulations.

**Dimer quantitation assay.** The stability of the Li-TryR dimeric form in the presence of cyclic peptides 5a, 8a and 11 and linear precursors 1 and 2 was evaluated using the novel Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) recently developed in our laboratory.<sup>15</sup> Briefly a dual (HIS/FLAG) tagged Li-TryR (400 nM) was incubated in a dimerization buffer (200  $\mu$ L 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0) for 16 h at 37 °C with

agitation and in a humid atmosphere in the presence of different peptide concentration (10 to 90  $\mu$ M). Next the plates were washed ten times with TTBS (Tween 0.1%, 138 mM NaCl, 2 mM Tris pH 7.6) and incubated with diluted monoclonal  $\alpha$ -HIS HRP conjugated antibody (200  $\mu$ L, Abcam, Cambridge, UK) in BSA (5%) in TTBS for 1 h at room temperature. The plates were washed once again as previously described and 1,2-phenylene-diamine dihydrochloride (OPD) substrate (100  $\mu$ L, Dako, Glostrup, Denmark) prepared according to manufacturer's instructions was added. The enzymatic reaction was stopped after 10 minutes with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100  $\mu$ L, 0.5 M) and the absorbances were measured at 490 nm in a VERSAmix microplate reader (Molecular Devices, California, USA). All the assays were conducted in triplicate in at least three independent experiments. Data were analyzed using a non-linear regression model with the Graft6 software (Erithacus, Horley, Surrey, UK).

## Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## Abbreviations

|         |  |
|---------|--|
| DSSP    | Define secondary structure of proteins algorithm   |
| ELISA   | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay                  |
| Li-TryR | <i>Leishmania infantum</i> trypanothione reductase |
| MD      | Molecular dynamics                                 |
| RCM     | Ring-closing metathesis                            |
| RMSD    | Root mean square deviation                         |
| SPE     | Solid-phase extraction                             |
| SPPS    | Solid phase peptide synthesis.                     |

## Acknowledgements

PASM, MAT and HL thank the Spanish MEC/MICINN for their FPI fellowships. Financial support from the Spanish MINECO (Projects SAF2012-39760-C02 and CTQ2011-22514), Comunidad de Madrid (S-2010/BMD-2457; BIPEDD-2) and Junta de Comunidades de Castilla la Mancha (Project POII10-0180-7897) is gratefully acknowledged.

## Notes and references

- WHO, World Health Organization, 2015, available in <http://www.who.int/lesihmaniasis/en/>, accessed May 2015.
- (a) N. Singh, M. Kumar and R. K. Singh, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2012, 5, 485; (b) H. Hussain, A. Al-Harrasi, A. Al-Rawahi, I. R. Green and S. Gibbons, *Chem. Rev.*, 2014, 114, 10369.
- M. Zucca, S. Scutera and D. Savoia, *Curr. Med. Chem.*, 2013, 20, 502.
- K. Ait-Oudhia, E. Gazanion, B. Vergnes, B. Oury and D. Sereno, *Parasitol. Res.*, 2011, 109, 1225.



- 5 T. T. H. Pham, P. M. Loiseau and G. Barratt, *Int. J. Pharm.*, 2013, **454**, 539.
- 6 A. H. Fairlamb, P. Blackburn, P. Ulrich, B. T. Chait and A. Cerami, *Science*, 1985, **227**, 1485.
- 7 R. L. Krauth-Siegel, H. Bauer and R. H. Schirmer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 690.
- 8 See for example, L. S. C. Bernades, C. L. Zani and I. Carvalho, *Curr. Med. Chem.*, 2013, **20**, 2673, and references therein.
- 9 See for example: (a) T. J. Benson, J. H. Mckie, J. Garforth, A. Borges, A. H. Fairlamb and K. T. Douglas, *Biochem. J.*, 1992, **286**, 9; (b) C. Chan, H. Yin, J. Garforth, J. H. McKie, R. Jaouhari, P. Speers, K. T. Douglas, P. J. Rock, V. Yardley, S. L. Croft and A. H. Fairlamb, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 148; (c) M. O. F. Khan, S. E. Austin, C. Chan, H. Yin, D. Marks, S. N. Vaghjiani, H. Kendrick, V. Yardley, S. L. Croft and K. T. Douglas, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3148.
- 10 See also for example: (a) J. L. Richardson, I. R. E. Nett, D. C. Jones, M. H. Abdile, I. H. Gilbert, A. H. Fairlamb, S. Patterson, D. C. Jones, E. J. Shanks, J. A. Frearson and P. G. Wyatt, *ChemMedChem*, 2009, **4**, 1333; (b) S. K. Venkatesan and D. V. K. Dubey, *Sci. World J.*, 2012, 1.
- 11 See for example: (a) M. C. O'Sullivan, Q. B. Zhou, Z. Li, T. B. Durham, D. Rattendi, S. Lane and C. J. Bacchi, *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, **5**, 2145–2155; (b) B. Bonnet, D. Soullez, S. Girault, L. Maes, V. Landry, E. Davioud-Charvet and C. Sergheraert, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **8**, 95.
- 12 (a) M. R. Ariyanayagam, S. L. Oza, A. Mehlert and A. H. Fairlamb, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 27612; (b) M. J. Dixon, R. I. Maurer, C. Biggi, J. Oyarzabal, J. W. Essex and M. Bradley, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 4513.
- 13 (a) A. Tromelin, M. Moutiez, D. Meziane-Cherif, M. Aumercier, A. Tartar and C. Sergheraert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 1971; (b) E. A. Garrard, E. C. Borman, B. N. Cook, E. J. Pike and D. G. Alberg, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 3639.
- 14 (a) S. Patterson, M. S. Alphey, D. C. Jones, E. J. Shanks, I. P. Street, J. A. Frearson, P. G. Wyatt, I. H. Gilbert and A. H. Fairlamb, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 6514; (b) M. H. Duyzend, C. T. Clark, S. L. Simmons, W. B. Johnson, A. M. Larson, A. M. Leconte, A. W. Wills, M. Ginder-Vogel, A. K. Wihelm, J. A. Czechowicz and D. G. Alberg, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2012, **27**, 784.
- 15 M. A. Toro, P. A. Sánchez-Murcia, D. Moreno, M. Ruiz-Santaquiteria, J. F. Alzate, A. Negri, M. J. Camarasa, F. Gago, S. Velázquez and A. Jiménez-Ruiz, *ChemBioChem*, 2013, **14**, 1212.
- 16 See for example reviews: (a) L. K. Henchey, A. L. Jochim and P. S. Arora, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 692; (b) A. Grauer and B. König, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 5099; (c) R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijtzter and J. Kemmink, *ChemBioChem*, 2011, **12**, 1626; (d) V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy and A. J. Wilson, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 161; (e) T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness and D. P. Fairlie, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 13020.
- 17 See for example review: J. W. Taylor, *Biopolymers*, 2002, **66**, 49.
- 18 See for example: (a) J. C. Phelan, N. J. Skelton, A. C. Braidsted and R. S. McDowell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 455; (b) S. G. Yao, M. A. Smith-White, E. K. Potter and R. S. Norton, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2310; (c) N. E. Shepherd, H. N. Hoang, V. S. Desai, E. Letoize, P. R. Young and D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 13284.
- 19 See for example: (a) M. I. García-Aranda, Y. Mirassou, B. Gautier, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M. T. García-López, M. A. Jiménez, R. González-Muñiz and M. J. Pérez de Vega, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 7526; (b) K. K. Khoo, M. J. Wilson, B. J. Smith, M. Zhang, J. Gulyas, D. Yoshikami, J. E. Rivier, G. Bulaj and R. S. Norton, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 7558; (c) M. I. García-Aranda, S. González-López, C. M. Santiveri, N. Gagey-Eilstein, M. Reille-Seroussi, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M. T. García-López, M. A. Jiménez, R. González-Muñiz and M. J. Pérez de Vega, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 1896.
- 20 See recent reviews: (a) A. Brik, *Adv. Synth. Catal.*, 2008, **350**, 1661; (b) M. J. Pérez de Vega, M. I. García-Aranda and R. González-Muñiz, *Med. Res. Rev.*, 2011, **31**, 677; (c) G. L. Verdine and G. J. Hilinski, *Methods Enzymol.*, 2012, **503**, 3–33; (d) R. Dharanipragada, *Future Med. Chem.*, 2013, **5**, 831; (e) L. D. Walensky and G. H. Bird, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 6275.
- 21 See for example: (a) C. E. Schafmeister, J. Po and G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 5891; (b) H. E. Blackwell and R. H. Grubbs, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 3281; (c) P. S. Kutchukian, J. S. Yang, G. L. Verdine and E. I. Shakhnovich, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 4622.
- 22 (a) F. Bernal, A. F. Tyler, S. J. Korsmeyer, L. D. Walensky and G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2456; (b) F. Bernal, M. Wade, M. Godes, T. N. Davis, D. G. Whitehead, A. L. Kung, G. M. Wahl and L. D. Walensky, *Cancer Cell*, 2010, 411; (c) L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher, T. J. Malia, S. Barbuto, R. Wright, G. Wagner, G. L. Verdine and S. J. Korsmeyer, *Science*, 2004, **305**, 1466; (d) L. D. Walensky, K. Pitter, J. Morash, K. J. Oh, S. Barbuto, J. Fisher, E. Smith, G. L. Verdine and S. J. Korsmeyer, *Mol. Cell*, 2006, **24**, 199; (e) N. N. Danial, L. D. Walensky and C.-Y. Zhang, *et al.*, *Nat. Med.*, 2008, **14**, 144.
- 23 (a) R. E. Moellering, M. Cornejo, T. N. Davis, C. Del Bianco, J. C. Aster, S. C. Blacklow, A. L. Kung, D. G. Gilliland, G. L. Verdine and J. E. Bradner, *Nature*, 2009, **462**, 182; (b) G. H. Bird, N. Madani, A. F. Perry, A. M. Princiotta, J. G. Supko, X. He, E. Gavathiotis, J. G. Sodroski and L. D. Walensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 14093; (c) T.-L. Sun, Y. Sun, C.-C. Lee and H. W. Huang, *Biophys. J.*, 2013, **104**, 1923; (d) Y.-Q. Long, S.-X. Huang and Z. Zawahir, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 5601; (e) H.-K. Cui, J. Qing, Y. Guo, Y.-J. Wang, L. J. Cui, T.-H. He, L. Zhang and L. Liu, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 3547.
- 24 The nomenclature  $S_{i, i+4}S(8)$  refers to a 8-carbon tether with S-configuration at both  $i, i + 4$  positions.

- 25 The nomenclature  $R_{i, i+7}S(11)$  refers to a 11-carbon tether with  $R$ -configuration at  $i, i + 4$  position and  $S$ -configuration at  $i, i + 7$  position.
- 26 Y. W. Kim and G. L. Verdine, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **19**, 2533.
- 27 R. M. Williams and M. N. Im, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 9276.
- 28 A. J. Robinson, J. Elaridi, B. J. Van Lierop, S. Mujcinovic and W. R. Jackson, *J. Pep. Sci.*, 2007, **13**, 280.
- 29 The spectra of peptides **8a** and **11** could not be carried out in absence of TFE due to poor water-solubility of the peptides. It should be noted that TFE is not a general  $\alpha$ -helix-inducer, as generally believed (see reference: M. Buck, *Q. Rev. Biophys.*, 1998, **31**, 297). Indeed, it has been shown to stabilise non-helical structures, such as  $\beta$ -hairpins (see reference: C. M. Santiveri, D. Pantoja-Uceda, M. Rico and M. A. Jiménez, *Biopolymers*, 2005, 79150).
- 30 (a) R. Vila, I. Ponte, P. Suau, M. A. Jiménez and M. Rico, *Protein Sci.*, 2000, **9**, 627; (b) M. A. Jiménez, A. C. Barrachi-Saccilotto, E. Valdivia, M. Maqueda and M. Rico, *J. Pept. Sci.*, 2005, **11**, 29.
- 31 P. Güntert, Automated NMR protein structure calculation with CYANA, *Methods Mol. Biol.*, 2004, **278**, 353.
- 32 T. Okamoto, K. Zobel, A. Fedorova, C. Quan, H. Yang, W. J. Fairbrother, D. C. S. Huang, B. J. Smith, K. Deshayes and P. E. Czabotar, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 297.
- 33 D. J. Derksen, J. L. Stymiest and J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14252.
- 34 During the proteolytic stability studies, opening of the lactam-bridge of analogue **11** was not detected by HPLC-MS. This points to the stability of the amide bridge under these conditions.
- 35 See for example: (a) N. E. Shepherd, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 2687; (b) E. N. Murgae, G. Gao, A. Bisello and J. Ahn, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 6421; (c) T. Rao, G. Ruiz-Gomez, T. A. Hill, H. N. Hoang, D. P. Fairlie and J. M. Mason, *PLoS One*, 2013, **8**, e59415.
- 36 T. D. Goddard and D. G. Kneller, *SPARKY 3*, University of California, San Francisco.
- 37 (a) J. L. Stymiest, B. F. Mitchell, S. Wong and J. C. Vederas, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 47; (b) J. L. Stymiest, B. F. Mitchell, S. Wong and J. C. Vederas, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 7799.
- 38 C. M. Santiveri, D. Pantoja-Uceda, M. Rico and M. A. Jiménez, *Biopolymers*, 2005, **79**, 150.
- 39 *NMR data and processing software*, Bruker Biospin, Kalsruhe, Germany.
- 40 K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic acids*, John Wiley & Sons, New York, 1986.
- 41 G. Cornilescu, F. Delaglio and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, 1999, **13**, 289.
- 42 P. Güntert, C. Mumenthaler and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 1997, **273**, 283.
- 43 P. Güntert, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2004, **43**, 105.
- 44 R. Koradi, M. Billeter and K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 51.
- 45 D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A. W. Goetz, I. Kolossvary, 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, *Amber 12*, 2012.
- 46 C. Sander and W. Kabsch, *Biopolymers*, 1983, **22**, 2577.
- 47 J. Klett, A. Núñez-Salgado, H. G. Dos Santos, A. Cortés-Cabrera, A. Perona, R. Gil-Redondo, D. Abia, F. Gago and A. Morreale, *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, **8**, 3395.

### Artículo 3.

## Novel Heteroaryl Selenocyanates and Diselenides as Potent Antileishmanial Agents

Ylenia Baquedano<sup>a,b</sup>, Verónica Alcolea<sup>a,b</sup>, Miguel Ángel Toro<sup>c</sup>, Killian Jesús Gutiérrez<sup>c</sup>, Paul Nguewa<sup>b</sup>, María Font<sup>a,b</sup>, Esther Moreno<sup>a,b</sup>, Socorro Espuelas<sup>b</sup>, Antonio Jiménez-Ruiz<sup>c</sup>, Juan Antonio Palop<sup>a,b</sup>, Daniel Plano<sup>a,b</sup>, Carmen Sanmartín<sup>a,b</sup>

[a] Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica e Instituto de Salud Tropical. Pamplona (España).

[b] Universidad de Navarra, Pamplona (España).

[c] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Madrid (España).

**Revista** Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy  
**Editorial** American Society for Microbiology  
**Año** 2016  
**Volumen** 60  
**Numero** 6  
**Paginas** 3802-3812  
**DOI** 10.1128/AAC.02529-15.



**AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY**

# Novel Heteroaryl Selenocyanates and Diselenides as Potent Antileishmanial Agents

Ylenia Baquedano,<sup>a,b</sup> Verónica Alcolea,<sup>a,b</sup> Miguel Ángel Toro,<sup>c</sup> Killian Jesús Gutiérrez,<sup>c</sup> Paul Nguewa,<sup>b</sup> María Font,<sup>a,b</sup> Esther Moreno,<sup>a,b</sup> Socorro Espuelas,<sup>b</sup> Antonio Jiménez-Ruiz,<sup>c</sup> Juan Antonio Palop,<sup>a,b</sup> Daniel Plano,<sup>a,b</sup> Carmen Sanmartín<sup>a,b</sup>

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica<sup>a</sup> and Instituto de Salud Tropical,<sup>b</sup> University of Navarra, Pamplona, Spain; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain<sup>c</sup>

**A series of new selenocyanates and diselenides bearing interesting bioactive scaffolds (quinoline, quinoxaline, acridine, chromene, furane, isosazole, etc.) was synthesized, and their *in vitro* leishmanicidal activities against *Leishmania infantum* amastigotes along with their cytotoxicities in human THP-1 cells were determined. Interestingly, most tested compounds were active in the low micromolar range and led us to identify four lead compounds (1h, 2d, 2e, and 2f) with 50% effective dose (ED<sub>50</sub>) values ranging from 0.45 to 1.27 μM and selectivity indexes of >25 for all of them, much higher than those observed for the reference drugs. These active derivatives were evaluated against infected macrophages, and in order to gain preliminary knowledge about their possible mechanism of action, the inhibition of trypanothione reductase (TryR) was measured. Among these novel structures, compounds 1h (3,5-dimethyl-4-isoxazolyl selenocyanate) and 2d [3,3'-(diselenodiyldimethanediyl)bis(2-bromothiophene)] exhibited good association between TryR inhibitory activity and antileishmanial potency, pointing to 1h, for its excellent theoretical ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) properties, as the most promising lead molecule for leishmanicidal drug design.**

Leishmaniasis is an infectious poverty-associated disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. In fact, this term includes a wide spectrum of vector-borne diseases with great epidemiological and clinical diversity. Even though exact statistical data are lacking (1, 2), within the 350 million people that live in areas where leishmaniasis is endemic, approximately 12 million people get infected per year. There are three major clinical types: cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), and visceral leishmaniasis (VL; also known as kala-azar), which differ in their immunopathologies and degrees of morbidity and mortality (3). Among the different manifestations, VL is the most severe form, with nearly 200,000 to 400,000 new cases, causing more than 20,000 deaths, per year. Left untreated, it is usually fatal within 2 years.

The efficacy of the different drugs available seems to vary according to the *Leishmania* species, and the current chemotherapy is far from being satisfactory. Furthermore, they present several problems, including toxicity, many adverse side effects, and high costs. The most relevant problem is related to the fact that many of these drugs were developed many years ago, and currently, there are resistant strains (4).

Since their discovery in the 1940s, the toxic pentavalent antimony [Sb(V)] compounds have been the mainstay of treatment against all forms of leishmaniasis through parenteral administration, and their efficacy is progressively decreasing owing to the development of resistance (5). For this reason, in the last decades several drugs, such as amphotericin B and miltefosine (6), paromomycin and pentamidine (7), sitamaquine (8), and edelfosine (9), have been used in the treatment of leishmaniasis. Nevertheless, their high cost and therapeutic complications limit their use. Nowadays, several other drugs based on natural products show promising antileishmanial activity, but despite significant progress, an ideal drug is still awaited (10).

The development of new antiparasitic drugs has not been much of a priority for the pharmaceutical industry because many of the parasitic diseases occur in poor countries where the populations cannot afford to pay a high price for the drugs. Thus, al-

though important initiatives, such as the Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), are attracting more interest in these neglected pathologies, an investment in drug development against parasitic diseases is needed.

The incorporation of different functionalities bearing the Se atom (i.e., methylseleno, selenocyanate, and diselenide) onto organic scaffolds can be considered a promising rational design to achieve potent and selective cytotoxic compounds (11). Several reports have shown vast and miscellaneous types of structures applying this approach, resulting in very promising antitumoral compounds in preclinical models (12, 13). Recently, our research group has been using this rational design in order to obtain new derivatives with potent and selective antileishmanicidal activity. Continuing with these efforts, herein we have designed novel Se compounds which gather two different chemical entities: the selenium entity on its selenocyanate and diselenide forms; and different carbo- and heterocyclic entities with proven leishmanicidal activity. Below in this section, a brief description with several reported data that supports the selection for each of these subunits can be found.

During the last years, various reports have shown recognition of an increase in plasma selenium levels as a new defensive strategy

Received 5 November 2015 Returned for modification 8 January 2016

Accepted 6 April 2016

Accepted manuscript posted online 11 April 2016

Citation Baquedano Y, Alcolea V, Toro MÁ, Gutiérrez KJ, Nguewa P, Font M, Moreno E, Espuelas S, Jiménez-Ruiz A, Palop JA, Plano D, Sanmartín C. 2016. Novel heteroaryl selenocyanates and diselenides as potent antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3802–3812. doi:10.1128/AAC.02529-15.

Address correspondence to Carmen Sanmartín, sanmartin@unav.es.

Y.B. and V.A. have contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02529-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

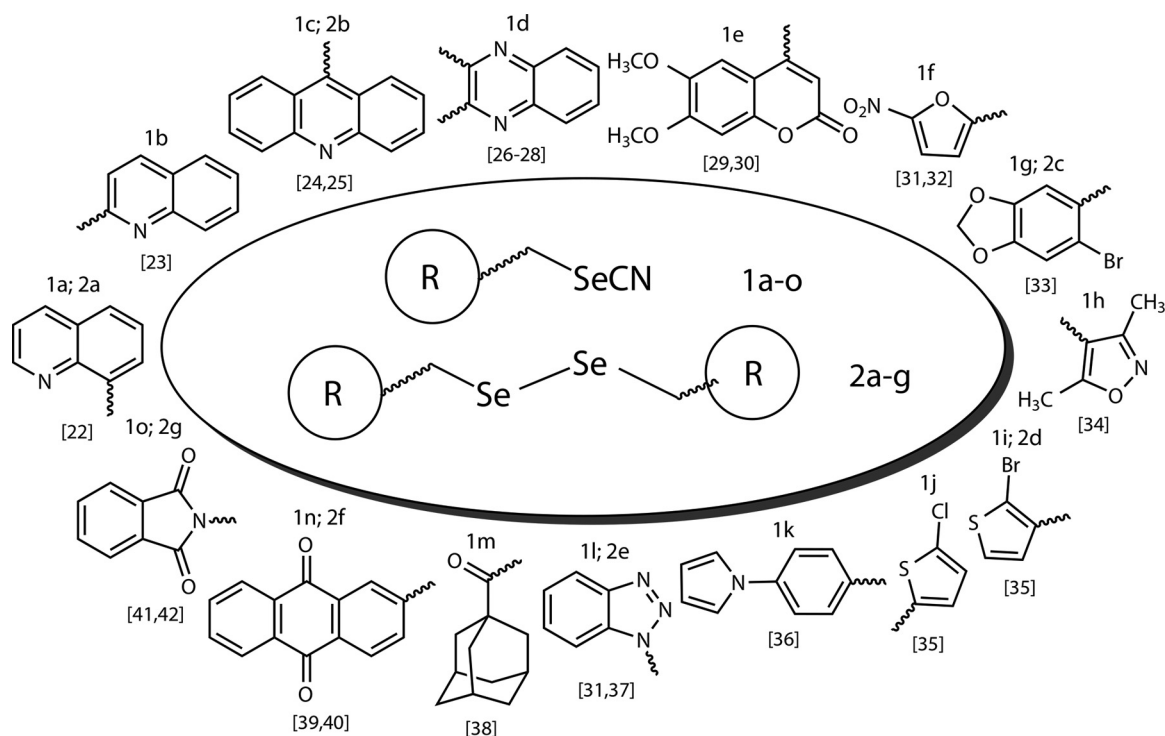


FIG 1 General structure of new pharmacophoric Se compounds.

against *Leishmania* infection (14, 15). The choice of the chemical form for the selenium derivatives can modulate the level of this element on the basis of several metabolic routes (16). The mechanism of action for selenium is unknown, though some enzymatic pathways, such as mitochondrial peroxiredoxins (17), selenophosphate synthetases (18), or ascorbate peroxidases (19), could be implicated. On the other hand, the incorporation of selenium into novel nanomaterials has demonstrated effectiveness in the treatment of leishmaniasis (20). We have reported (21–24) new selenium compounds with potent *in vitro* antiparasitic activity against *Leishmania infantum* and *Leishmania major*, and selectivity indexes higher than those observed for the reference drugs miltefosine, edelfosine, and paromomycin. Additionally, some of them induced nitric oxide production and alterations in gene expression profiling related to proliferation (PCNA), treatment resistance (ABC-transporter and  $\alpha$ -tubulin), and virulence (QDPR) (23). Among the various antileishmanial scaffolds containing selenium earlier reported by us, selenocyanate and diselenide showed promising activity against *Leishmania* parasites (24).

We have paid special attention to quinoline, which constitutes the central nucleus of sitamaquine (25, 26), acridine (27, 28), quinoxaline (29–31), and coumarins (32, 33). On the other hand, nitrofurans (34, 35), the most relevant registered as nifurtimox, and derivatives of the benzodioxol core (36) have been selected. In addition, substituted five-membered heterocyclic rings such as isoxazol (37) and thiophenyl (38) or pyrrol (39) have been tested as leishmanicidal agents. Furthermore, related to heterocycles derivatives, some fused aryl azo and triazo molecules have been described (34, 40). Finally, some carbocycles, such as ones with an adamantane ring (41) or anthraquinone structure (42, 43), have been described.

Among the potential molecular targets for the treatment of

leishmaniasis, trypanothione reductase (TryR) is considered an ideal enzyme, since it is involved in the unique thiol-based metabolism observed in the *Trypanosomatidae* family and is a validated target in the search for drugs against members of this family. TryR catalyzes the reduction of trypanothione disulfide to trypanothione (44). Therefore, during recent years a great number of inhibitors of this key enzyme have been reported (45–47). Based on the chemical analogy of sulfur and selenium, we decided to explore the relevance of this trace element to generate new TryR inhibitors.

In summary, as a continuation of an ongoing program aiming to find new structural leaders with potential leishmanicidal activity, we have constructed a new class of selenium derivatives. They were designed by incorporating selenocyanate or diselenide moieties onto other bioactive carbo- or heterocycles selected on the basis of the above-mentioned findings. In this work, we present the synthesis of 23 new Se compounds (Fig. 1) and their leishmanicidal activities against the amastigote form of *L. infantum*. In parallel, the cytotoxicities of these newly synthesized molecules were assessed. Moreover, the leishmanicidal activities of the most active compounds were evaluated in *L. infantum*-infected macrophages. Finally, in order to elucidate a preliminary mechanism of action, their inhibitory activities against trypanothione reductase were determined.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemistry.** Melting points (mp) were determined with a Mettler FP82+FP80 apparatus (Greifensee, Switzerland) and are not corrected. The  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker 400 Ultrashield spectrometer (Rheinstetten, Germany) using TMS (tetramethylsilane) as the internal standard. The infrared (IR) spectra were obtained on a Thermo Nicolet FT-IR Nexus spec-

trophotometer with KBr pellets. Mass spectrometry was carried out on an ICP-MS (inductively induced plasma mass spectrometer), Agilent system MSD/DS 5973N (G2577A). Elemental microanalyses were carried out on vacuum-dried samples using a LECO CHN-900 elemental analyzer. Silica gel 60 (0.040 to 0.063 mm) 1.09385.2500 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used for column chromatography, and Alugram SIL G/UV<sub>254</sub> (layer: 0.2 mm) (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) was used for thin-layer chromatography (TLC). Chemicals were purchased from E. Merck (Darmstadt, Germany), Scharlau (F.E.R.O.S.A., Barcelona, Spain), Panreac Química S.A. (Montcada i Reixac, Barcelona, Spain), Sigma-Aldrich Química, S.A. (Alcobendas, Madrid, Spain), Acros Organics (Janssen Pharmaceuticaaan 3a, Geel, Belgium) and Lancaster (Bischheim-Strasbourg, France).

**General procedure for the synthesis of compounds 1a to 1o.** The synthesis of compounds 1a to 1o was carried out according to the procedure described in the literature (48–50), with a few modifications. Briefly, KSeCN (4 mmol) was added to a solution of the appropriate haly derivative (4 mmol) in acetone (50 ml) and the mixture was heated under reflux for 2 to 4 h. The resulting precipitate (KBr) was filtered off. The filtrate was evaporated under vacuum and the residue was treated with water (2 × 50 ml) and dried. The target compounds were obtained with a high degree of purity.

**(Quinolin-8-yl)methyl selenocyanate (1a).** Compound 1a was from 8-bromomethylquinoline and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Brown solid. Yield: 71.5%. mp: 49.5 to 50.5°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,138 (s, C≡N); 1,593 (f, C=N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se); 7.58 to 7.63 (m, 2H, H<sub>6</sub> + H<sub>7</sub>); 7.88 (m, 1H, H<sub>3</sub>); 7.97 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J*<sub>5-6</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>5-7</sub> = 1.6 Hz); 8.44 (dd, 1H, H<sub>4</sub>, *J*<sub>4-3</sub> = 8.4 Hz, *J*<sub>4-2</sub> = 2.2 Hz); 8.94 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, *J*<sub>2-3</sub> = 4.3 Hz, *J*<sub>2-4</sub> = 2.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 29.5 (CH<sub>2</sub>-Se); 106.1 (CN); 123.6 (C<sub>3</sub>); 127.3 (C<sub>7</sub>); 129.5 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 131.7 (C<sub>8</sub>); 136.0 (C<sub>2</sub>); 138.1 (C<sub>4</sub>); 146.9 (C<sub>2</sub>); 151.4 (C<sub>10</sub>). MS (*m/z* [percent abundance]): 222 (58); 158 (35); 142 (100); 130 (13); 115 (18); 89 (8); 63 (6). Elemental analysis for C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Se, calculated/found (percent): C, 53.44/53.35; H, 3.33/3.49; N, 11.33/11.06.

**(Quinolin-2-yl)methyl selenocyanate (1b).** Compound 1b was from 2-chloromethylquinoline hydrochloride and potassium selenocyanate. First, quinoline hydrochloride was treated with an aqueous solution of NaOH (1 N) in water-methanol (40:20) for 15 min in order to obtain 2-chloromethylquinoline. The white powder obtained was washed with water (4 × 25 ml) and dried. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Brown solid. Yield: 27.5%. mp: 83 to 84°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,142 (m, C≡N); 1,591 (m, C=N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.73 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>); 7.62 (t, 2H, H<sub>6</sub> + H<sub>7</sub>, *J*<sub>6-5</sub> = *J*<sub>7-8</sub> = 11.0 Hz); 7.79 (d, 1H, H<sub>3</sub>, *J*<sub>3-4</sub> = 9.4 Hz); 7.98 (dd, 2H, H<sub>5</sub> + H<sub>8</sub>, *J*<sub>5-6</sub> = *J*<sub>8-7</sub> = 11.0 Hz, *J*<sub>5-7</sub> = *J*<sub>8-6</sub> = 9.4 Hz); 8.41 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J*<sub>4-3</sub> = 9.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 35.8 (CH<sub>2</sub>-Se); 105.9 (CN); 122.6 (C<sub>3</sub>); 127.3 (C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>); 129.0 (C<sub>6</sub>, C<sub>9</sub>); 131.7 (C<sub>8</sub>); 138.2 (C<sub>4</sub>); 147.8 (C<sub>10</sub>); 158.0 (C<sub>2</sub>). MS (*m/z* [percent abundance]): 248 (25); 142 (100); 115 (35); 89 (8); 63 (5); 51 (4). Elemental analysis for C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Se, calculated/found (percent): C, 53.44/53.52; H, 3.33/3.62; N, 11.33/11.10.

**Acridin-9-ylmethyl selenocyanate (1c).** Compound 1c was from 9-(bromomethyl)acridine and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Yellow solid. Yield: 92.3%. mp: 137 to 138°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,145 (m, C≡N); 1,625 (d, C=N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 5.47 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se); 7.69 (t, 2H, H<sub>2</sub> + H<sub>7</sub>, *J*<sub>2-1</sub> = *J*<sub>7-8</sub> = 9.3 Hz); 7.87 (t, 2H, H<sub>3</sub> + H<sub>6</sub>, *J*<sub>3-4</sub> = *J*<sub>6-5</sub> = 9.1 Hz); 8.19 (d, 2H, H<sub>4</sub> + H<sub>5</sub>, *J*<sub>4-3</sub> = *J*<sub>5-6</sub> = 9.1 Hz); 8.58 (d, 2H, H<sub>1</sub> + H<sub>8</sub>, *J*<sub>1-2</sub> = *J*<sub>8-7</sub> = 9.3 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 24.4 (CH<sub>2</sub>-Se); 104.0 (CN); 124.9 (C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>); 125.3 (C<sub>1</sub>, C<sub>11</sub>); 127.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>10</sub>); 130.7 (C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>); 132.2 (C<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>); 142.1 (C<sub>13</sub>); 149.4 (C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>). MS (*m/z* [percent abundance]): 204 (12); 193 (100); 177 (5); 165 (9); 87 (7); 63 (4). Elemental analysis for C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Se, calculated/found (percent): C, 60.60/60.74; H, 3.36/3.36; N, 9.42/9.13.

**Quinoxalin-2,3-diylmethanediyl bis-selenocyanate (1d).** Compound 1d was from 2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline and potassium

selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Brown solid. Yield: 46.5%. mp: 153 to 154°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,153 (s, C≡N); 1,608 (m, C=N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.91 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Se); 7.87 to 7.89 (m, 2H, H<sub>6</sub> + H<sub>7</sub>); 8.06 to 8.08 (m, 2H, H<sub>5</sub> + H<sub>8</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 32.3 (CH<sub>2</sub>-Se); 105.0 (CN); 129.9 (C<sub>6</sub>, C<sub>9</sub>); 132.2 (C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>); 141.3 (C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>); 151.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>). MS (*m/z* [abundance]): 262 (100); 235 (44); 156 (72); 129 (27); 102 (21); 76 (20). Elemental analysis for C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Se<sub>2</sub>, calculated/found (percent): C, 39.34/39.16; H, 2.18/2.17; N, 15.30/15.06.

**(6,7-Dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl selenocyanate (1e).** Compound 1e was from 6,7-dimethoxy-4-bromomethyl-2H-chromen-2-one and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Yellow solid. Yield: 28.1%. mp: 197 to 199°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,150 (m, C≡N); 1,709 (s, C=O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.42 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se); 6.33 (s, 1H, CH-CO); 7.10 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.43 (s, 1H, H<sub>8</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 29.5 (CH<sub>2</sub>-Se); 56.3 (OCH<sub>3</sub>); 58.7 (OCH<sub>3</sub>); 100.1 (C<sub>9</sub>); 102.7 (CN); 107.8 (C<sub>6</sub>); 110.0 (C<sub>3</sub>); 114.6 (C<sub>5</sub>); 147.2 (C<sub>10</sub>); 150.3 (C<sub>7</sub>); 152.2 (C<sub>8</sub>); 154.1 (C<sub>4</sub>); 161.5 (CO). MS (*m/z* [abundance]): 325 (59); 219 (73); 191 (100); 163 (12); 147 (25); 119 (7); 69 (8). Elemental analysis for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>Se, calculated/found (percent): C, 48.15/48.02; H, 3.40/3.40; N, 4.32/4.20.

**(5-Nitrofur-2-yl)methyl selenocyanate (1f).** Compound 1f was from 5-nitro-2-bromomethylfuran and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Yellow solid. Yield: 42%. mp: 87 to 88°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,152 (m, C≡N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se); 6.80 (d, 1H, H<sub>3</sub>, *J*<sub>3-4</sub> = 7.8 Hz); 7.70 (d, 1H, H<sub>4</sub>, *J*<sub>4-3</sub> = 7.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 23.0 (CH<sub>2</sub>-Se); 101.1 (CN); 109.4 (C<sub>3</sub>); 111.2 (C<sub>4</sub>); 150.0 (C<sub>5</sub>); 156.3 (C<sub>2</sub>). MS (*m/z* [abundance]): 126 (100); 113 (85). Elemental analysis for C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Se, calculated/found (percent): C, 31.17/31.28; H, 1.73/2.02; N, 12.12/11.72.

**(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)methyl selenocyanate (1g).** Compound 1g was from 5-bromo-6-(bromomethyl)-1,3-benzodioxole and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). White solid. Yield: 78.6%. mp: 110 to 111°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2150 (s, C≡N); 1033 (s, C-Br). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.36 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se); 6.10 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O); 7.11 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.27 (s, 1H, H<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 34.3 (CH<sub>2</sub>-Se); 103.5 (O-CH<sub>2</sub>-O); 105.9 (CN); 111.3 (C<sub>6</sub>); 113.8 (C<sub>4</sub>); 115.1 (C<sub>3</sub>); 130.6 (C<sub>5</sub>); 148.2 (C<sub>2</sub>); 149.4 (C<sub>1</sub>). MS (*m/z* [abundance]): 213 (100); 157 (7); 75 (19); 50 (15). Elemental analysis for C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>2</sub>Se, calculated/found (percent): C, 33.86/34.02; H, 1.88/2.05; N, 4.39/4.13.

**3,5-Dimethyl-4-isoxazolyl selenocyanate (1h).** Compound 1h was from 4-chloromethyl-3,5-dimethylisoxazole and potassium selenocyanate. The brown oil obtained after washed with water was extracted with dichloromethane (3 × 50 ml). The organic layer was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The dichloromethane was removed under vacuum, and the residue was treated with ethyl ether (3 × 25 ml); a clear brown powder was obtained. Yield: 21.3%. mp: 69 to 70°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,143 (s, C≡N); 1,628 (s, C=N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>); 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>); 4.19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 10.6 (C<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 11.8 (C<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>); 21.4 (-CH<sub>2</sub>-Se-); 105.9 (C<sub>4</sub>); 112.3 (CN); 159.9 (C<sub>3</sub>); 168.2 (C<sub>5</sub>). MS (*m/z* [abundance]): 156 (4); 110 (100); 68 (89); 52 (5); 43 (45). Elemental analysis for C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OSe, calculated/found (percent): C, 39.08/39.14; H, 3.75/3.88; N, 13.02/12.89.

**(2-Bromothiophene-3-yl)methyl selenocyanate (1i).** Compound 1i was from 2-bromo-3-bromomethylthiophene and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether (2 × 50 ml). Brown solid. Yield: 88%. mp: 53 to 55°C. IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2,148 (m, C≡N). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.27 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Se); 7.09 (d, 1H, H<sub>2</sub>, *J*<sub>1-2</sub> = 5.7 Hz); 7.63 (d, 1H, H<sub>1</sub>, *J*<sub>2-1</sub> = 5.7 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 26.5 (CH<sub>2</sub>); 105.3 (CN); 112.5 (C<sub>2</sub>); 128.4 (C<sub>3</sub>); 129.7 (C<sub>4</sub>); 138.3 (C<sub>3</sub>). MS (*m/z* [abundance]): 281 (M<sup>+</sup>, 3); 175 (100). Elemental

analysis for  $C_6H_4BrNSe$ , calculated/found (percent): C, 25.62/25.44; H, 1.42/1.38; N, 4.98/4.59.

**(2-Chlorothiophene-5-yl)methyl selenocyanate (1j).** Compound 1j was from 5-bromo-2-chloro-methylthiophene and potassium selenocyanate. The brown oil obtained after washed with water was extracted with ethyl ether ( $3 \times 50$  ml). The organic layer was washed with water ( $3 \times 50$  ml) and dried with  $Na_2SO_4$ . The ethyl ether was removed under vacuum, and a brown solid was obtained. Brown solid. Yield: 60%. mp: 37 to 39°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2,149 (m,  $C\equiv N$ ).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4.52 (s, 2H,  $CH_2$ -Se); 6.98 (d, 1H,  $H_3$ ,  $J_{3-4} = 7.8$  Hz); 7.00 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J_{4-3} = 7.8$  Hz).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 28.6 ( $CH_2$ ); 106.5 (CN); 127.5 ( $C_4$ ); 128.4 ( $C_5$ ); 129.3 ( $C_2$ ); 141.4 ( $C_6$ ). MS ( $m/z$  [abundance]): 131 (100); 95 (7); 87 (5); 69 (5); 45 (5). Elemental analysis for  $C_6H_4ClNSe$ , calculated/found (percent): C, 30.44/30.04; H, 1.69/1.82; N, 5.92/5.80.

**4-(1H-Pyrrol-1-yl)benzyl selenocyanate (1k).** Compound 1k was from 1-[4-(bromomethyl)phenyl]-1H-pyrrole and potassium selenocyanate. The solid obtained after the treatment with water was solved in THF (tetrahydrofuran), and the insoluble fraction was rejected. The THF was removed under vacuum, and the residue was washed with water ( $3 \times 25$  ml) and with hexane ( $3 \times 25$  ml). Brown solid. Yield: 73.3%. mp: 154 to 155°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2,145 (m,  $C\equiv N$ ).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4.35 (s, 2H,  $CH_2$ -Se); 6.27 (t, 2H,  $H_3 + H_4$ ,  $J_{3-2} = J_{4-5} = 8.5$  Hz); 7.38 (t, 2H,  $H_2 + H_5$ ,  $J_{2-3} = J_{5-4} = 8.5$  Hz); 7.45 (d, 2H,  $H_3' + H_5'$ ,  $J_{3'-2'} = J_{5'-4'} = 8.5$  Hz); 7.58 (d, 2H,  $H_2' + H_6'$ ,  $J_{2'-3'} = J_{6'-5'} = 8.5$  Hz).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 33.1 ( $-CH_2$ -Se-); 105.8 (CN); 111.5 ( $C_3$ ,  $C_4$ ); 119.8 ( $C_2$ ,  $C_5$ ); 120.1 ( $C_2'$ ,  $C_6'$ ); 131.1 ( $C_3'$ ,  $C_5'$ ); 136.1 ( $C_4'$ ); 140.2 ( $C_1'$ ). MS ( $m/z$  [abundance]): 262 ( $M + 1^+$ , 3); 156 (100); 128 (17); 89 (8); 78 (4). Elemental analysis for  $C_{12}H_{10}N_2Se$ , calculated/found (percent): C, 55.18/55.59; H, 3.86/4.01; N, 10.73/10.07.

**1H-Benzotriazol-1-ylmethyl selenocyanate (1l).** Compound 1l was from 1-chloromethyl-1H-benzotriazole and potassium selenocyanate. The orange oil obtained after washed with water was extracted with dichloromethane ( $3 \times 50$  ml). The organic phase was washed with water ( $3 \times 20$  ml) and dried over  $Na_2SO_4$ . The dichloromethane was removed under vacuum, and the residue was recrystallized from ethanol to give an orange solid. Yield: 19.7%. mp: 158 to 160°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2,151 (m,  $C\equiv N$ ).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.51 (s, 2H,  $CH_2$ -Se); 7.49 (t, 1H,  $H_2$ ,  $J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $J_{2-3} = 7.6$  Hz); 7.66 (t, 1H,  $H_3$ ,  $J_{3-4} = 7.5$  Hz,  $J_{3-2} = 7.6$  Hz); 8.02 (d, 1H,  $H_1$ ,  $J_{1-2} = 7.5$  Hz); 8.12 (d, 1H,  $H_4$ ,  $J_{4-3} = 7.5$  Hz).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 45.4 ( $CH_2$ ); 105.3 (CN); 112.3 ( $C_8$ ); 120.4 ( $C_5$ ); 125.6 ( $C_6$ ); 128.8 ( $C_7$ ); 132.9 ( $C_9$ ); 146.41 ( $C_4$ ). MS ( $m/z$  [abundance]): 132 (62); 77 (100). Elemental analysis for  $C_8H_6N_4Se$ , calculated/found (percent): C, 40.51/40.47; H, 2.53/2.75; N, 23.63/23.95.

**2-Adamant-1-yl-2-oxoethyl selenocyanate (1m).** Compound 1m was from 1-adamant-1-yl-2-bromoethanone and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether ( $2 \times 50$  ml). Yellow solid. Yield: 77%. mp: 108 to 110°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2,149 (s,  $C\equiv N$ ); 1678 (s,  $C=O$ ).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.63 to 1.67 (m, 6H,  $CH_2$ -CH); 1.80-1.81 (m, 6H,  $CH_2$ -C-CO); 1.99 (s, 3H, CH); 4.63 (s, 2H,  $CH_2$ -Se).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 27.1 ( $CH_2$ -Se); 29.0 (CH); 36.7 ( $CH_2$ -CH); 38.4 ( $CH_2$ -C-CO); 47.1 (C-CO); 104.5 (CN); 210.2 (C=O). MS ( $m/z$  [abundance]): 163 (4); 135 (100); 107 (8); 93 (17); 79 (18); 67 (7). Elemental analysis for  $C_{13}H_{17}NOSe$ , calculated/found (percent): C, 55.31/55.38; H, 6.03/6.19; N, 4.96/4.70.

**(9,10-Dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl selenocyanate (1n).** Compound 1n was from 2-chloromethylanthraquinone and potassium selenocyanate. The compound was washed with ethyl ether ( $2 \times 50$  ml). Yellow solid. Yield: 75.3%. mp: 168 to 169°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2,145 (m,  $C\equiv N$ ); 1,674 (s,  $C=O$ ).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4.51 (s, 2H,  $CH_2$ -Se); 7.90 (dd, 1H,  $H_3$ ,  $J_{3-4} = 8.1$  Hz,  $J_{3-1} = 2.5$  Hz); 7.93 to 7.96 (m, 2H,  $H_1 + H_4$ ); 8.22-8.25 (m, 4H,  $H_5 + H_6 + H_7 + H_8$ ).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 33.3 ( $CH_2$ -Se); 106.5 (CN); 128.5 ( $C_1$ ,  $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_{11}$ ); 133.2 ( $C_3$ ); 134.1 ( $C_9$ ,  $C_{10}$ ); 135.0 ( $C_5$ ,  $C_7$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ); 146.9 ( $C_2$ ); 183.4 (CO). MS ( $m/z$  [abundance]): 256 (9); 221 (100); 207 (4); 165 (22); 139

(5); 76 (4); 63 (4). Elemental analysis for  $C_{16}H_9NO_2Se$ , calculated/found (percent): C, 58.89/58.74; H, 2.76/2.86; N, 4.29/4.25.

**(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl selenocyanate (1o).** Compound 1o was from *N*-bromomethylphthalimide and potassium selenocyanate. The oil obtained after washed with water was extracted with dichloromethane ( $3 \times 50$  ml). The organic phase was washed with water ( $3 \times 20$  ml) and dried over  $Na_2SO_4$ . The dichloromethane was removed under vacuum, and the residue was recrystallized from ethanol to give a white-pink solid. Yield: 50.4%. mp: 162 to 164°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 2,155 (m,  $C\equiv N$ ); 1,778 (CO); 1,718 (CO).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 5.28 (s, 2H,  $CH_2$ ); 7.89-7.98 (m, 4H,  $H_3 + H_4 + H_5 + H_6$ ).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 35.0 ( $CH_2$ ); 105.2 (CN); 124.5 ( $C_4$ ); 132.2 ( $C_3$ ); 136.0 ( $C_5$ ); 166.8 ( $C_2$ ). MS ( $m/z$  [abundance]): 160 (100); 104 (22). Elemental analysis for  $C_{10}H_6N_2O_2Se$ , calculated/found (percent): C, 45.29/44.93; H, 2.26/2.49; N, 10.57/10.37.

**General procedure for the synthesis of compounds 2a to 2g.** The appropriate selenocyanate derivative (3 mmol) was solved in absolute ethanol (40 ml), and  $NaBH_4$  (6.2 mmol) was added in small portions with caution to the solution. To obtain compound 2g,  $NaBH_3CN$  (6.2 mmol) was used. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The solvents were removed under vacuum by rotary evaporation, and the residue was treated with water (50 ml) and purified in order to obtain the target compounds.

**8,8'-(Diselenodiyldimethanediyl)diquinoline (2a).** Compound 2a was from (quinolin-8-yl)methyl selenocyanate (1a) and sodium borohydride. The resultant solid was washed with ethyl ether ( $3 \times 50$  ml) and recrystallized from ethanol to give a yellow solid. Yield: 60.3%. mp: 103 to 104°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 1591 (s,  $C=C$ ); 790 (s, Se-Se).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4.58 (s, 4H, 2  $CH_2$ -Se); 7.43 to 7.48 (m, 4H,  $H_6 + H_7$ ,  $H_6' + H_7'$ ); 7.57 (dd, 2H,  $H_3$ ,  $H_3'$ ,  $J_{3-4} = 8.1$  Hz,  $J_{3-2} = 4.6$  Hz); 7.89 (dd, 2H,  $H_5$ ,  $H_5'$ ,  $J_{5-6} = 8.1$  Hz,  $J_{5-7} = 2.5$  Hz); 8.38 (dd, 2H,  $H_4$ ,  $H_4'$ ,  $J_{4-3} = 8.1$  Hz,  $J_{4-2} = 2.5$  Hz); 8.97 (dd, 2H,  $H_2$ ,  $H_2'$ ,  $J_{2-3} = 4.6$  Hz,  $J_{2-4} = 2.5$  Hz).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 30.2 ( $CH_2$ -Se); 122.5 ( $C_3$ ,  $C_3'$ ); 127.1 ( $C_7$ ,  $C_7'$ ); 128.0 ( $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_5'$ ,  $C_6'$ ); 130.7 ( $C_8$ ,  $C_8'$ ); 137.9 ( $C_9$ ,  $C_9'$ ); 138.4 ( $C_4$ ,  $C_4'$ ); 146.2 ( $C_2$ ,  $C_2'$ ); 150.1 ( $C_{10}$ ,  $C_{10}'$ ). MS ( $m/z$  [percent abundance]): 442 ( $M^+$ , 5); 222 (75); 142 (100); 130 (10); 115 (17); 89 (7); 63 (5). Elemental analysis for  $C_{20}H_{16}N_2Se_2$ , calculated/found (percent): C, 54.30/54.80; H, 3.62/4.00; N, 6.33/6.10.

**9,9'-(Diselenodiyldimethanediyl)diacridine (2b).** Compound 2b was from acridin-9-ylmethyl selenocyanate (1c) and sodium borohydride. The resultant solid was washed with ethyl ether ( $3 \times 50$  ml) and recrystallized from ethanol to give an orange solid. Yield: 45%. mp: 108 to 109°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 1552 (s,  $C=C$ ); 752 (s, Se-Se).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 5.22 (s, 4H,  $CH_2$ -Se,  $CH_2'$ -Se); 7.63 (t, 4H,  $H_2 + H_7$ ,  $J_{2-3} = J_{7-6} = 9.0$  Hz); 7.84 (t, 4H,  $H_3 + H_6$ ,  $J_{3-2} = J_{6-7} = 9.0$  Hz); 8.14 (d, 4H,  $H_4 + H_5$ ,  $J_{4-3} = J_{5-6} = 9.0$  Hz); 8.41 (d, 4H,  $H_1 + H_8$ ,  $J_{1-2} = J_{8-7} = 9.1$  Hz).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 26.3 ( $CH_2$ -Se); 123.1 ( $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{12}'$ ,  $C_{14}'$ ); 125.0 ( $C_1$ ,  $C_{11}$ ,  $C_1'$ ,  $C_{11}'$ ); 128.6 ( $C_2$ ,  $C_{10}$ ,  $C_2'$ ,  $C_{10}'$ ); 130.0 ( $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_4'$ ,  $C_8'$ ); 133.4 ( $C_3$ ,  $C_9$ ,  $C_3'$ ,  $C_9'$ ); 141.8 ( $C_{13}$ ,  $C_{13}'$ ); 149.9 ( $C_5$ ,  $C_7$ ,  $C_5'$ ,  $C_7'$ ). MS ( $m/z$  [percent abundance]): 204 (100); 165 (47); 63 (6). Elemental analysis for  $C_{28}H_{20}N_2Se_2$ , calculated/found (percent): C, 61.99/61.62; H, 3.69/4.03; N, 5.16/5.12.

**5,5'-(Diselenodiyldimethanediyl)bis(6-bromo-1,3-benzodioxole) (2c).** Compound 2c was from (6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)methyl selenocyanate (1g) and sodium borohydride. The resultant solid was washed with ethyl ether ( $3 \times 50$  ml) and recrystallized from ethanol to give a yellow solid. Yield: 70.3%. mp: 90 to 91°C. IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 766 (s, Se-Se).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4.03 (s, 4H,  $CH_2$ -Se,  $CH_2'$ -Se); 6.00 (s, 4H, O- $CH_2$ -O, O- $CH_2$ -O); 6.77 (s, 2H,  $H_6$ ,  $H_6'$ ); 7.01 (s, 2H,  $H_3$ ,  $H_3'$ ).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 33.3 ( $CH_2$ -Se); 103.1 (O- $CH_2$ -O); 111.6 ( $C_6$ ,  $C_6'$ ); 113.7 ( $C_4$ ,  $C_4'$ ); 115.2 ( $C_3$ ,  $C_3'$ ); 132.9 ( $C_5$ ,  $C_5'$ ); 147.0 ( $C_2$ ,  $C_2'$ ); 148.8 ( $C_1$ ,  $C_1'$ ). MS ( $m/z$  [percent abundance]): 213 (100); 157 (9); 135 (9); 75 (10); 50 (5). Elemental analysis for  $C_{16}H_{12}Br_2O_4Se_2$ , calculated/found (percent): C, 32.76/32.99; H, 2.04/2.02.

**3,3'-(Diselenodiyldimethanediyl)bis(2-bromothiophene) (2d).** Compound 2d was from (2-bromothiophene-3-yl)methyl selenocyanate (1i) and sodium borohydride. The mixture was extracted with ethyl ether (3 × 50 ml). The organic phase was washed with water (3 × 50 ml) and dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The ethyl ether was removed under vacuum, and a yellow powder was obtained. Yield: 29%. mp: 49 to 50°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3,099 (w, C-H); 722 (s, Se-Se). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 4.04 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Se, CH<sub>2</sub>'-Se); 7.00 (d, 2H, H<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>', J<sub>1-2</sub> = 5.6 Hz); 7.58 (d, 2H, H<sub>1</sub> + H<sub>1</sub>', J<sub>2-1</sub> = 5.6 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 26.5 (CH<sub>2</sub>-Se); 111.1 (C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>') ; 128.4 (C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>') ; 130.6 (C<sub>5</sub>, C<sub>5</sub>') ; 140.0 (C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>'). MS (*m/z* [percent abundance]): 510 (M<sup>+</sup>; 3); 175 (100); 96 (19); 69 (9); 45 (8). Elemental analysis for C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>S<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>, calculated/found (percent): C, 23.55/23.49; H, 1.58/1.52.

**1,1'-(Diselenodiyldimethanediyl)bis(1H-benzotriazole) (2e).** Compound 2e was from 1H-benzotriazol-1-ylmethyl selenocyanate (1i) and sodium borohydride. The mixture was extracted with dichloromethane (3 × 50 ml). The organic phase was washed with water (3 × 50 ml) and dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The dichloromethane was removed under vacuum, and a white powder was obtained. Yield: 25%. mp: 197 to 199°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 744 (s, Se-Se). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 6.19 (s, 4H, N-CH<sub>2</sub>-Se, N-CH<sub>2</sub>'-Se); 7.44 (t, 2H, H<sub>3</sub> + H<sub>3</sub>', J<sub>3-2</sub> = 8.2 Hz, J<sub>3-4</sub> = 8.2 Hz); 7.57 (t, 2H, H<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>', J<sub>2-1</sub> = 8.2 Hz, J<sub>2-3</sub> = 8.2 Hz); 7.87 (d, 2H, H<sub>4</sub> + H<sub>4</sub>', J<sub>3-4</sub> = 8.2 Hz); 8.07 (d, 2H, H<sub>1</sub> + H<sub>1</sub>', J<sub>1-2</sub> = 8.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 43.6 (CH<sub>2</sub>-Se); 112.2 (C<sub>8</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>') ; 120.2 (C<sub>5</sub>); 125.3 (C<sub>6</sub>); 128.3 (C<sub>7</sub>); 133.0 (C<sub>9</sub>); 146 (C<sub>4</sub>). MS (*m/z* [percent abundance]): 132 (86); 77 (100). Elemental analysis for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>Se<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, calculated/found (percent): C, 38.80/38.40; H, 2.77/2.74; N, 19.61/19.39.

**2,2'-(Diselenodiyldimethanediyl)di(9,10-dihydroanthracene-9,10-dione) (2f).** Compound 2f was from (9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-yl)methyl selenocyanate (1n) and sodium borohydride. The resultant solid was washed with ethyl ether (3 × 50 ml) and recrystallized from ethanol to give a yellow solid. Yield: 52%. mp: 186 to 187°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1,666 (CO); 710 (m, Se-Se). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 4.21 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Se, CH<sub>2</sub>'-Se); 7.70 (d, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>', J<sub>3-4</sub> = 8.1 Hz); 7.86-7.89 (m, 4H, H<sub>5</sub> + H<sub>8</sub>, H<sub>5</sub>' + H<sub>8</sub>') ; 7.95 (s, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>') ; 8.06 (d, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4</sub>', J<sub>4-3</sub> = 8.1 Hz); 8.09 to 8.11 (m, 4H, H<sub>6</sub> + H<sub>7</sub>, H<sub>6</sub>' + H<sub>7</sub>'). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 31.4 (CH<sub>2</sub>-Se); 127.6 (C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>1</sub>', C<sub>4</sub>', C<sub>8</sub>', C<sub>11</sub>') ; 133.2 (C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>') ; 134.1 (C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>9</sub>', C<sub>10</sub>') ; 135.3 (C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>5</sub>', C<sub>7</sub>', C<sub>12</sub>', C<sub>14</sub>') ; 148.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>') ; 183.2 (CO). MS (*m/z* [percent abundance]): 177 (100); 149 (13); 96 (22); 69 (17); 51 (8). Elemental analysis for C<sub>30</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>Se<sub>2</sub>·½H<sub>2</sub>O, calculated/found (percent): C, 59.11/59.12; H, 3.12/3.44.

**2,2'-(Diselenodiyldimethanediyl)bis(1H-isoindole-1,3(2H)-dione) (2g).** Compound 2g was from (1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl selenocyanate and sodium cyanoborohydride. A white solid was obtained. Yield: 28%. mp: 162 to 164°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1,774 and 1,715 (vs, C=O); 719 (m, Se-Se). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5.07 (s, 4H, N-CH<sub>2</sub>-Se, N-CH<sub>2</sub>'-Se); 7.86 (s, 8H, H<sub>3</sub> + H<sub>3</sub>' + H<sub>4</sub> + H<sub>4</sub>' + H<sub>5</sub> + H<sub>5</sub>' + H<sub>6</sub> + H<sub>6</sub>'). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 34.0 (CH<sub>2</sub>-Se); 124.2 (C<sub>4</sub>); 132.3 (C<sub>3</sub>); 135.6 (C<sub>5</sub>); 167.3 (CO). MS (*m/z* [percent abundance]): 478 (M<sup>+</sup>; 2); 160 (100). Elemental analysis for C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se<sub>2</sub>, calculated/found (percent): C, 45.19/45.25; H, 2.51/2.70; N, 5.86/5.64.

**2,2'-(Selenodiyldimethanediyl)bis(1H-isoindole-1,3(2H)-dione) (3).** Compound 3 was from (1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl selenocyanate (1o) (0.75 mmol) and sodium borohydride (0.75 mmol). Yield: 47%. mp: 230 to 232°C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1,772 and 1,718 (vs, C=O). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5.13 (s, 4H, N-CH<sub>2</sub>-Se, N-CH<sub>2</sub>'-Se); 7.87 to 7.89 (m, 8H, H<sub>3</sub> + H<sub>3</sub>' + H<sub>4</sub> + H<sub>4</sub>' + H<sub>5</sub> + H<sub>5</sub>' + H<sub>6</sub> + H<sub>6</sub>'). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 31.5 (CH<sub>2</sub>-Se); 124.2 (C<sub>4</sub>); 132.5 (C<sub>3</sub>); 135.6 (C<sub>5</sub>); 167.8 (CO). MS (*m/z* [percent abundance]): 400 (M + 1<sup>+</sup>; 2); 160 (100). Elemental analysis for C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se, calculated/found (percent): C, 54.13/54.13; H, 3.00/2.79; N, 7.02/7.07.

**Biological evaluation. (i) Cells and culture conditions.** *L. infantum* promastigotes (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) were grown in RPMI 1640

medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), antibiotics, and 25 mM HEPES (pH 7.2) at 26°C.

*L. infantum* axenic amastigotes were obtained by incubation of 4.5 × 10<sup>6</sup> late-logarithmic-phase promastigotes in 5 ml of M199 medium (Invitrogen, Leiden, The Netherlands) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 1 g liter<sup>-1</sup> of β-alanine, 100 mg liter<sup>-1</sup> of L-asparagine, 200 mg liter<sup>-1</sup> of sucrose, 50 mg liter<sup>-1</sup> of sodium pyruvate, 320 mg liter<sup>-1</sup> of malic acid, 40 mg liter<sup>-1</sup> of fumaric acid, 70 mg liter<sup>-1</sup> of succinic acid, 200 mg liter<sup>-1</sup> of α-ketoglutaric acid, 300 mg liter<sup>-1</sup> of citric acid, 1.1 g liter<sup>-1</sup> of sodium bicarbonate, 5 g liter<sup>-1</sup> of morpholineethanesulfonic acid (MES), 0.4 mg liter<sup>-1</sup> of hemin, and 10 mg liter<sup>-1</sup> of gentamicin, pH 5.4, at 37°C. After 48 h of incubation, all parasites had a rounded morphology without a flagellum and divided during several weeks under the described conditions.

THP-1 cells were grown in RPMI 1640 medium (Gibco, Leiden, The Netherlands) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, antibiotics, 1 mM HEPES, 2 mM glutamine, and 1 mM sodium pyruvate, pH 7.2, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

**(ii) Leishmanicidal activity and cytotoxicity assays.** Drug treatment of amastigotes was performed during the logarithmic growth phase at a concentration of 2 × 10<sup>6</sup> parasites/ml at 26°C or 1 × 10<sup>6</sup> parasites/ml at 37°C for 24 h, respectively. Drug treatment of THP-1 cells was performed during the logarithmic growth phase at a concentration of 4 × 10<sup>5</sup> cells/ml at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The percentage of living cells was evaluated by flow cytometry by the propidium iodide (PI) exclusion method (51). Drug concentrations ranged from 0.2 μM to 25 μM.

**(iii) Leishmania infection assay.** Human THP-1 monocytic cells were seeded at 1.2 × 10<sup>5</sup> cells/ml in 24-multidish plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and differentiated to macrophages for 24 h in 1 ml of RPMI 1640 medium containing 10 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Medium culture was removed, and 1.2 × 10<sup>6</sup> *Leishmania* amastigotes in 1 ml of THP-1 medium were added to each well. Four hours later, all medium with noninfective amastigotes was removed, washed 3 times with 1 × phosphate-buffered saline (PBS), and replaced with new THP-1 medium and corresponding treatment. After 48 h of treatment, medium was removed; THP-1 cells were washed 3 times with 1 × PBS and detached with TrypLE Express (Invitrogen, Leiden, The Netherlands) according to the manufacturer's indications. Infection quantification was measured by flow cytometry. Drug concentrations ranged from 0.2 μM to 25 μM.

**(iv) Trypanothione reductase assay.** Oxidoreductase activity was determined according to the method described by Toro et al. (52). Briefly, reactions were carried out at 26°C in 250 μl of 40 mM HEPES buffer (pH 8.0) containing 1 mM EDTA, 150 μM NADPH, 30 μM NADP<sup>+</sup>, 25 μM DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) or Ellman's reagent], 1 μM T[S]2, 0.02% glycerol, 1.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 7 nM recombinant Li-TryR. Enzyme activity was monitored by the increase in absorbance at 412 nm for 1 h at 26°C in a VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, CA). All the assays were conducted in triplicate in at least three independent experiments. Data were analyzed using a nonlinear regression model with Graft6 software (Erithacus, Horley, Surrey, United Kingdom).

**Drug likeness parameters.** The drug likeness and drug score values along with the topological polar surface area (TPSA) values and the properties described in the Lipinski's rule of five (molecular mass ≤ 500 Da, log *P* ≤ 5, H-bond donors [HBD] ≤ 5, and H-bond acceptors [HBA] ≤ 10) were calculated using Osiris (53) and Molinspiration property calculation programs (54), respectively. Topological polar surface area was used to calculate the percentage of absorption (ABS) according to the equation 109 - (0.345 × TPSA) (55).

## RESULTS

**Chemistry.** The synthetic approaches adopted to obtain the target compounds are depicted in Fig. 2. The selenocyanate derivatives



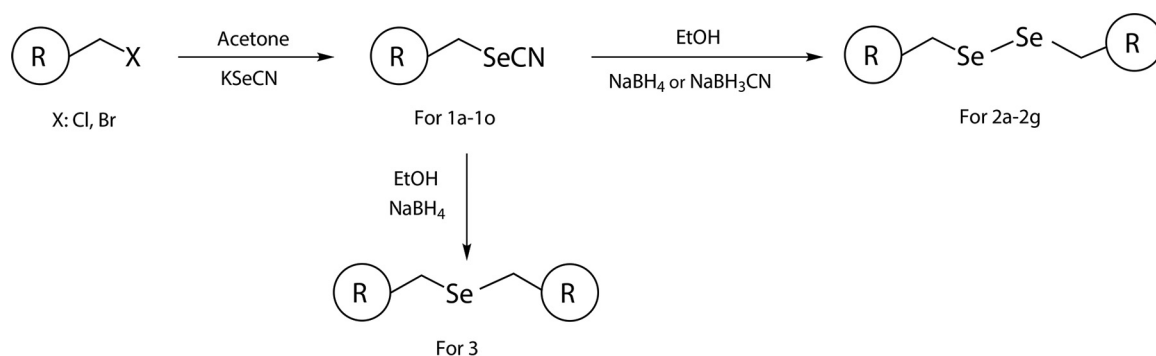


FIG 2 Synthesis of compounds 1a to 1o, 2a to 2g, and 3.

(compounds 1a to 1o) were obtained in variable yields (27 to 92%) by reaction between the commercially available haloalkyl carbo or heterocyclic reactivities with potassium selenocyanate in the molar ratio 1.1 in acetone under reflux over 3 to 4 h (24). The subsequent reduction of compounds 1a to 1o with sodium borohydride or sodium cyanoborohydride in ethanol afforded derivatives 2a to f and 2g (24) in yields ranging from 25 to 70%. Unfortunately, for some selenocyanates (1a, 1d, 1e, 1f, 1h, 1i, 1k, and 1m) several difficulties were found, and this procedure failed to afford the expected products. This prompted us to seek alternative routes to prepare the corresponding diselenides. Surprisingly, modification of the reaction conditions (temperature, solvents, or molar ratio) resulted in decomposition of the starting materials by rupture of the bond between the heterocycle and methylene. This hypothesis was confirmed by the disappearance of the signal corresponding to the methylene group in  $^1\text{H}$  NMR. Additionally, an undesired mixture of side compounds was identified in TLC. The alternative strategy employing 100% hydrazine hydrate and sodium hydroxide in DMF (*N,N*-dimethylformamide) to reduce elemental selenium and generate sodium diselenide followed by reaction with the corresponding haloalkyl reactivities (56) did not allow the synthesis of the corresponding diselenides. These results can be explained by the greater steric hindrance so as the quick degradation of the starting materials in the reduction process.

Finally, and contrary to our expectations, the reduction of 1o with  $\text{NaBH}_4$  in ethanol yielded compound 3, an unexpected compound instead of the corresponding diselenide that was obtained by reaction with  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ .

All of the compounds prepared during the course of these investigations are stable. Their purity was assessed by TLC and elemental analyses, and their structures were identified from spectroscopic data. IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, mass spectrometry, and elementary analysis methods were used for structure elucidation (Fig. 2).

The IR spectra of compounds 1a to 1o illustrate sharp peaks around 2,138 to 2,155  $\text{cm}^{-1}$  due to a CN group. Derivatives 2a to 2g showed multiple bands in the range of 710 to 790  $\text{cm}^{-1}$  attributable to the Se-Se group and lacked the CN band, confirming the reduction. In NMR all the signals were fully consistent with proposed structures. Copies of the registered  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra for the selected compounds (1h, 2d, and 2e) can be found in the supplemental material.

**Biological evaluation.** (i) **Activity in amastigotes and cytotoxic activity in human cells.** Compounds 1a to 1o, 2a to 2g, and 3 were tested for their antiprotozoal activity against amastigotes of

the pathogenic *Leishmania infantum* using miltefosine and edelfosine as standard drugs according to a previously described procedure (57). Although most of the studies on the *in vitro* biological activity of new compounds against *Leishmania* spp. are performed on promastigote forms, this assay must be considered preliminary because this stage of parasite is significantly more susceptible to drug-induced effects than the amastigote form. Moreover, promastigotes are not the developed forms of the parasite in vertebrate hosts so the evaluations made with them are merely indicative of the potential leishmanicidal activity of the compounds tested. Accordingly, because amastigotes are responsible for all clinical manifestations in humans, the intracellular amastigote model has been cited as the “gold standard” for *in vitro* *Leishmania* drug discovery research. Taking this into account, all the analyses were carried out in the amastigote form with a minimum of three independent experiments and the results are expressed as 50% effective dose ( $\text{ED}_{50}$ ) values. In addition, for a compound to be a candidate for antileishmanial drug, it is required to have both high leishmanicidal activity and low cytotoxicity. Cytotoxicity for the THP-1 cell line was evaluated for all compounds in order to identify drugs with low toxicity in human cells and as a prelude to selecting drugs for *in vitro* assay on the relevant clinical *Leishmania* amastigote stage. The selectivity index (SI) of the compounds is expressed by the ratio between cytotoxicity ( $\text{ED}_{50}$  value on THP-1 cells) and activity ( $\text{ED}_{50}$  value on *L. infantum* amastigotes).

Table 1 shows the  $\text{ED}_{50}$  values obtained after 24 h of exposure to the compounds in *L. infantum* axenic amastigotes. Values for the reference drugs miltefosine and edelfosine are included in all cases for comparison. Biological data evidenced that most of the screened compounds (15 out of 23) showed high bioactivity ( $\text{ED}_{50} \leq 2.53 \mu\text{M}$ ) against *L. infantum*, being more potent than miltefosine ( $\text{ED}_{50} = 2.84 \mu\text{M}$ ). In addition, under our experimental conditions, seven compounds (1d, 1e, 1h, 1m, 1n, 2e, and 2f) displayed *in vitro* potency comparable to or higher than that of edelfosine ( $\text{ED}_{50} = 0.82 \mu\text{M}$ ).

Different authors have claimed that compounds having SI values greater than 20 can be considered ideal candidates for further development as leishmanicidal drugs (58). However, in this study and with rigorous criteria, we have considered the SI threshold of  $>25$  for further analysis of their activity in amastigote-infected THP-1 cells. This requirement is satisfied by compounds 1h, 2d, 2e, and 2f considering them as the lead ones in this series due to their excellent biological behavior.

(ii) **Leishmanicidal activity in infected macrophages.** According to their activity and selectivity, four compounds (1h, 2d,

TABLE 1 ED<sub>50</sub> values for compounds on amastigotes and cytotoxic activity in the THP-1 cell line

| Compound    | R (substituted group)                 | ED <sub>50</sub> (mean ± SEM), μM |              | SI <sup>a</sup> |
|-------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------------|
|             |                                       | Amastigotes                       | THP-1        |                 |
| 1a          | Quinol-8-yl                           | 4.49 ± 0.21                       | 14.48 ± 0.37 | 3.2             |
| 1b          | Quinol-2-yl                           | 1.76 ± 0.04                       | 14.91 ± 0.92 | 8.5             |
| 1c          | Acridin-9-yl                          | 7.40 ± 0.60                       | 15.01 ± 0.68 | 2.0             |
| 1d          | Quinoxalin-2,3-diylmethanediyl        | 0.69 ± 0.06                       | 13.83 ± 1.59 | 20.0            |
| 1e          | 6,7-Dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl   | 0.82 ± 0.07                       | 15.95 ± 1.54 | 19.4            |
| 1f          | 5-Nitrofur-2-yl                       | 1.99 ± 0.23                       | 3.95 ± 0.29  | 2.0             |
| 1g          | 6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl          | 10.10 ± 1.81                      | 15.26 ± 1.19 | 1.5             |
| 1h          | 3,5-Dimethylisoxazol-4-yl             | 0.73 ± 0.10                       | 21.82 ± 2.40 | 29.9            |
| 1i          | 2-Bromothien-3-yl                     | 2.86 ± 0.29                       | 19.54 ± 0.52 | 6.8             |
| 1j          | 5-Chlorothien-2-yl                    | 1.85 ± 0.33                       | 21.02 ± 0.52 | 11.4            |
| 1k          | N-Phenylpyrrol-4-yl                   | 8.87 ± 1.32                       | 23.74 ± 0.48 | 2.7             |
| 1l          | Benzotriazol-1-yl                     | 1.11 ± 0.21                       | 22.00 ± 1.20 | 19.8            |
| 1m          | 2-Adamant-1-yl-2-oxoethyl             | 0.83 ± 0.03                       | 19.68 ± 1.98 | 23.7            |
| 1n          | 9,10-Dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl | 0.74 ± 0.18                       | 6.05 ± 1.19  | 8.2             |
| 1o          | Phthalimidyl                          | 2.53 ± 0.32                       | 22.50 ± 1.63 | 8.9             |
| 2a          | Quinol-8-yl                           | 2.05 ± 0.24                       | 8.60 ± 1.10  | 5.6             |
| 2b          | Acridin-9-yl                          | 5.46 ± 0.01                       | 3.76 ± 0.07  | <1              |
| 2c          | 6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl          | 3.99 ± 0.62                       | >25          | >6.3            |
| 2d          | 2-Bromothien-3-yl                     | 1.20 ± 0.03                       | 30.9 ± 0.02  | 25.8            |
| 2e          | Benzotriazol-1-yl                     | 0.45 ± 0.03                       | >25          | >55.5           |
| 2f          | 9,10-Dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl | 0.68 ± 0.30                       | >25          | 36.8            |
| 2g          | Phthalimidyl                          | 1.35 ± 0.17                       | 9.26 ± 0.31  | 6.8             |
| 3           | Phthalimidyl                          | >25                               | >25          |                 |
| Edelfosine  |                                       | 0.82 ± 0.13                       | 4.96 ± 0.16  | 6.0             |
| Miltefosine |                                       | 2.84 ± 0.10                       | 18.50 ± 0.60 | 7.0             |

<sup>a</sup> Selectivity index (SI) is the ratio of ED<sub>50</sub> values of compounds against THP-1 cells relative to their corresponding ED<sub>50</sub> against *L. infantum* amastigotes.

2e, and 2f) were advanced for testing leishmanicidal activity in amastigote-infected THP-1 cells. Compound 2f (ED<sub>50</sub> = 0.68 μM; SI = 36.8) was not further tested due to the reproducibility issues showed by this derivative pertaining to its lack of solubility under the assay conditions. The ED<sub>50</sub> values for the other selected derivatives (1h, 2d, and 2e) were calculated and summarized in Table 2. The potency of the analogues was compared with that of edelfosine, a current antileishmanial agent (ED<sub>50</sub> = 3.1 ± 0.1 μM). These compounds reduced the parasite load of the cells, exhibiting ED<sub>50</sub> values of 23.2, 14.0, and 14.4 μM, respectively, with the members of diselenide family being the most potent compounds.

**(iii) Inhibition of *L. infantum* trypanothione reductase activity.** In an attempt to investigate a possible mechanism of action, the ability to inhibit the trypanothione reductase activity for the most active compounds was first screened at six different concentrations between 0.1 and 75 μM. Mepacrine, a well-known TryR inhibitor, was used as positive control (59) and DMSO as a vehicle. The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s) obtained are shown in Table 3.

The compounds 1h and 2d were able to inhibit TryR with IC<sub>50</sub>s

of 0.46 and 6.85 μM, respectively. It is remarkable that derivative 1h was 37-fold more active than the positive control. 1h and 2d exhibited good association between TryR inhibitory activity and antileishmanial potency (intracellular forms of the parasite). The results for 2e, which did not show inhibitory activity, suggest an alternative mechanism of action for its potent leishmanicidal activity. Compound 1h, as well as compound 2d, can be considered promising antileishmanial lead candidates because they show a strong inhibitory activity against axenic amastigotes (IC<sub>50</sub>s of 0.73 and 1.27 μM), excellent SI (29.9 and 25.8), and a marked inhibitory activity against TryR.

**Drug likeness properties.** Employing the Molinspiration (54) and Osiris (53) software, the selected compounds (1h, 2d, and 2e) were subjected to Lipinski's rule of five analyses (drug likeness), which helps to predict and explain the biological behavior of small molecules. This preliminary analysis allows prediction of the physicochemical properties related to their absorption and bioavailability. We have found that the derivatives 1h and 2e show no violations of Lipinski's rule of five (Table 4). Among leishmanicidal drugs available on the market, only miltefosine does not violate Lipinski's rule of five; all other drugs have at least 1 violation (edelfosine). It has been well established that optimal lipophi-

TABLE 2 ED<sub>50</sub> values for compounds in amastigote-infected THP-1 cells

| Compound   | ED <sub>50</sub> (mean ± SEM), μM |
|------------|-----------------------------------|
| 1h         | 23.2 ± 4.3                        |
| 2d         | 14.0 ± 2.1                        |
| 2e         | 14.4 ± 2.6                        |
| Edelfosine | 3.1 ± 0.1                         |

TABLE 3 IC<sub>50</sub>s for the selected compounds against TryR inhibition

| Compound  | IC <sub>50</sub> (mean ± SEM), μM |
|-----------|-----------------------------------|
| 1h        | 0.46 ± 0.01                       |
| 2d        | 6.85 ± 0.49                       |
| 2e        | >75                               |
| Mepacrine | 16.99 ± 1.18                      |

TABLE 4 Theoretical ADME properties for lead compounds

| Compound   | Molinspiration calculations <sup>a</sup> |        |      |     |       |    |       | Osiris calculations |            |
|------------|--|--------|------|-----|-------|----|-------|---------------------|------------|
|            | MW                                       | miLogP | TPSA | nON | nOHNH | NV | Vol   | Drug likeness       | Drug score |
| 1h         | 215.1                                    | 1.2    | 49.8 | 3   | 0     | 0  | 151.7 | -6.8                | 0.5        |
| 2d         | 510.0                                    | 5.8    | 0.00 | 0   | 0     | 2  | 253.2 | -7.5                | 0.1        |
| 2e         | 422.2                                    | 3.6    | 61.4 | 6   | 0     | 0  | 278.1 | -8.0                | 0.1        |
| Edelfosine | 523.7                                    | 0.7    | 77.1 | 7   | 0     | 1  | 550.9 | -58.2               | 0.3        |

<sup>a</sup> MW, molecular weight; miLogP, octanol-water partition coefficient; TPSA, topological polar surface area; nON, hydrogen bond acceptors; nOHNH, hydrogen bond donors; NV, number of violations; Vol, volume.

licity range along with low log P (<5) and low topological polar surface area (TPSA) are the major driving forces that lead to good absorption, including intestinal absorption, bioavailability, Caco-2 cell permeability, and blood-brain barrier penetration. Molecules with a TPSA of <140 Å<sup>2</sup> are indicative of excellent bioavailability (60). According to the theoretical study carried out by de Toledo et al. (61), the TPSA of most leishmanicidal drugs currently on the market is higher than this limit, which probably restricts their absorption and bioavailability. The log P and TPSA values for compounds 1h, 2d, and 2e range from 0.75 to 4.68 and 0 to 61.44, respectively, suggesting that these compounds are potentially able to cross cell membranes in a permeation process, which could explain the ability to reach the amastigotes inside the phagolysosome.

The drug score uses and relates other molecular parameters, such as drug likeness, log P, molecular weight, and toxicity risks, and can be considered a convenient value that may be used to judge the overall potential of a compound to become a drug. A value of 0.5 or more is indicative of a promising lead for future development of a safe and efficient drug (62). Compound 1h possess the maximum drug score (0.5) for the selected compounds, whereas edelfosine presented a drug score of 0.3.

## DISCUSSION

There are many available antileishmanial agents, but the drug of choice is still awaited because of several limitations of current drugs, such as high cost, poor compliance, drug resistance, low efficacy, and poor safety. The high prevalence and severity of this illness justify the urgency for the discovery of new drugs. In the last 2 decades, several interesting drug targets have been proposed, including many proteins and enzymes that differ from mammalian counterparts which can interfere with the redox system. Among the promising targets that the scientific community considers for the design of useful therapies, enzymes (trypanothione reductase, proteinases, superoxide dismutase, dihydrofolate reductase, metacaspase, topoisomerase, kinases, sirtuins, etc.) are one of the classes with the most representation. In this context, we notice that selenium plays an important role in medicinal chemistry, particularly in antioxidant, antitumoral, chemopreventive, or antiparasitic agents. Thus, we have described here the synthesis and leishmanicidal activity of novel selenocyanate and diselenide compounds.

For the novel seleno derivatives presented in this work, there seems to exist a tendency suggesting that analogues with the diselenide unit were more active than those with the selenocyanate moiety (1a versus 2a, 1c versus 2b, 1g versus 2c, 1i versus 2d, 1l

versus 2e, and 1o versus 2g) against *L. infantum* amastigotes. Regarding the selectivity index, the addition of the diselenide scaffold clearly improved the selectivity, for example, in compounds 1g versus 2c, 1i versus 2d, 1l versus 2e, and 1n versus 2f. In general, it was observed that tricyclic nitrogenated rings, such as acridine (1c and 2b), are detrimental to the biological activity and selectivity compared with bicyclic nitrogenated rings (1b, 1d, 1l, 1o, 2e, and 2g). Furthermore, no regular order of decrease or increase in the activity among the rest derivatives can be concluded.

Taking into account the results related to activity and selectivity and considering our exigent criteria for both parameters (ED<sub>50</sub> of <2.5 μM and SI of >25), four derivatives, one selenocyanate, 1h, and two diselenides (2d and 2e) were selected for further studies. Despite the fact that compound 2f fulfilled these criteria, it could not be tested due to solubility problems. When we performed intracellular form tests, these derivatives did not improve the activity compared to that of edelfosine. However, their lack of toxicity against THP-1 cells (Table 1) represents a remarkable advantage over the reference drug.

We hypothesized that TryR inhibition may be related with the leishmanicidal activity observed for seleno derivatives. The results for *in vitro* assays revealed that compounds 1h and 2d exhibited a good correlation between leishmanicidal activity and TryR inhibition, confirming our previous proposal. On the other hand, 2e did not show inhibitory activity, suggesting that not only is this enzyme involved in its potent leishmanicidal activity but also other mechanisms can be implicated.

Finally, *in silico* prediction studies were performed in order to determine the drug like properties for the lead compounds. Considering these properties, derivatives 1h and 2e were shown to meet the Lipinski's rule of five, indicating favorable properties for drug development. The *in silico* toxicity profile, drug likeness, and drug score (0.5) data for compound 1h make it a promising leader for future development of safer and more efficient leishmanicidal drugs.

In conclusion, the present study reports the synthesis of new selenocyanates and diselenides bearing interesting bioactive scaffolds (quinoline, quinoxaline, acridine, chromene, furane, and isosazole) and their *in vitro* leishmanicidal activities against *L. infantum* amastigotes along with their cytotoxicities in THP-1 cells. Fifteen such compounds exhibited better potency against axenic amastigotes than the standard drug miltefosine. Based on their antiparasitic activities and low toxicity in THP-1 cells, compounds 1h, 2d, 2e, and 2f were identified as the best candidates for further studies with infected macrophages. Although their potency against intracellular amastigotes is lower than that observed for the reference drug, these compounds combined a potent leishmanicidal activity with excellent selectivity index (>25), resulting in promising therapeutic utility. In order to get further insight into their putative mechanism of action, their activity against *L. infantum* TryR was determined. A clear correlation between enzyme inhibition and antiparasitic activity was observed for compounds 1h and 2d, which may be considered evidence for one of their many possible mechanisms of action. No correlation was detected for 2e, which suggest the existence of different targets in this family of compounds. The ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) parameters calculated for derivatives 1h and 2e predict a good bioavailability. *In silico* ADME profiling and drug score results along with *in vitro* leishmanicidal activity, cytotoxicity, and TryR inhibitory activity make 1h a promising

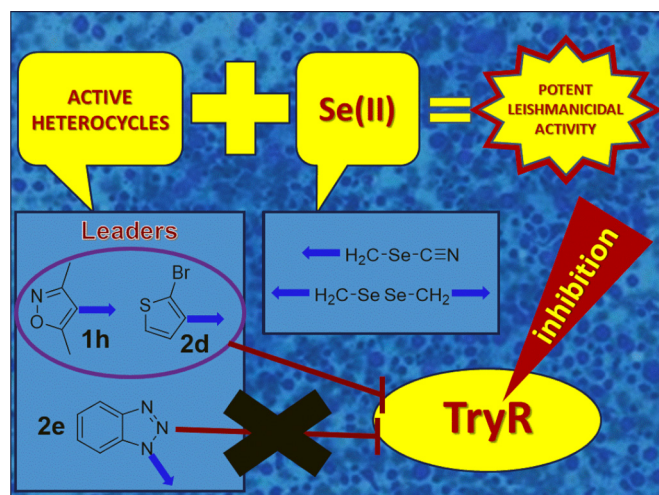


FIG 3 Schematic illustration of conclusions.

lead compound for the development of more potent antiparasitary drugs. A graphical summary of the conclusions drawn from this work is depicted in Fig. 3.

Moreover, to the best of our knowledge, this is the first study that reports new selenoderivatives as leishmanicidal and TryR inhibitors and opens new possibilities in the field of neglected diseases.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to the Foundation for Applied Medical Investigation (FIMA), University of Navarra. We also acknowledge financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (grant SAF2012-39760-C02-02).

We have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in this article apart from those disclosed.

#### FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Verónica Alcolea, was funded by Foundation for Applied Medical Investigation (ISTUN-API-2011/02). This work, including the efforts of Antonio Jiménez-Ruiz, was funded by Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) (SAF2012-39960-C02-02).

The authors express their gratitude to the Foundation for Applied Medical Investigation (FIMA), University of Navarra. The authors also acknowledge financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (grant SAF2012-39760-C02-02). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

#### REFERENCES

- Louzir H, Aoun K, Spath GF, Laouini D, Prina E, Victoir K, Bouratbine A. 2013. Leishmania epidemiology, diagnosis, chemotherapy and vaccination approaches in the international network of Pasteur Institutes. *Med Sci (Paris)* 29:1151–1160. <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2013291200>.
- McGwire BS, Satoskar AR. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM* 107:7–14. <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hct116>.
- Sundar S, Chakravarty J. 2013. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 14:53–63. <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2013.755515>.

- Yaszynski M, Khan M, Nadhman A, Shahnaz G. 2013. Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives. *Future Med Chem* 5:1877–1888. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.13.143>.
- Fernandes FR, Ferreira WA, Campos MA, Ramos GS, Kato KC, Almeida GG, Correa JD, Melo MN, Demicheli C, Frezard F. 2013. Amphiphilic antimony(V) complexes for oral treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4229–4236. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00639-13>.
- Solomon M, Pavlotzky F, Barzilai A, Schwartz E. 2013. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. *J Am Acad Dermatol* 68:284–289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2012.06.014>.
- Seifert K, Munday J, Syeda T, Croft SL. 2011. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 66:850–854. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq542>.
- Loiseau PM, Cojean S, Schrevel J. 2011. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite* 18:115–119. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2011182115>.
- Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, Munoz DL, Robledo SM, Muskus CE, Lopez-Aban J, Muro A, Velez ID, Mollinedo F. 2012. *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1612.
- Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. 2014. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem* 22:18–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.048>.
- Arsenyan P, Paegle E, Domracheva I, Gulbe A, Kanep-Lapsa I, Shestakova I. 2014. Selenium analogues of raloxifene as promising antiproliferative agents in treatment of breast cancer. *Eur J Med Chem* 87:471–483. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.088>.
- Fernández-Herrera MA, Sandoval-Ramirez J, Sanchez-Sanchez L, Lopez-Munoz H, Escobar-Sanchez ML. 2014. Probing the selective antitumor activity of 22-oxo-26-selenocyanocholestane derivatives. *Eur J Med Chem* 74:451–460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.059>.
- Gowda R, Madhunapantula SV, Desai D, Amin S, Robertson GP. 2013. Simultaneous targeting of COX-2 and AKT using selenocoxib-1-GSH to inhibit melanoma. *Mol Cancer Ther* 12:3–15. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0492>.
- Araújo AP, Rocha OG, Mayrink W, Machado-Coelho GL. 2008. The influence of copper, selenium and zinc on the response to the Montenegro skin test in subjects vaccinated against American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:64–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.08.010>.
- da Silva MT, Silva-Jardim I, Thiemann OH. 2014. Biological implications of selenium and its role in trypanosomiasis treatment. *Curr Med Chem* 21:1772–1780. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867320666131119121108>.
- Weekley CM, Harris HH. 2013. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chem Soc Rev* 42:8870–8894.
- Castro H, Teixeira F, Romao S, Santos M, Cruz T, Florido M, Appelberg R, Oliveira P, Ferreira-da-Silva F, Tomas AM. 2011. Leishmania mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity. *PLoS Pathog* 7:e1002325. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002325>.
- Faim LM, Rosa e Silva I, Bertacine Dias MV, D’Muniz Pereira H, Brandao-Neto J, Alves da Silva MT, Thiemann OH. 2013. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of selenophosphate synthetases from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69:864–867. <http://dx.doi.org/10.1107/S1744309113014632>.
- Pal S, Dolai S, Yadav RK, Adak S. 2010. Ascorbate peroxidase from *Leishmania major* controls the virulence of infective stage of promastigotes by regulating oxidative stress. *PLoS One* 5:e11271. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011271>.
- Beheshti N, Soflaei S, Shakibaie M, Yazdi MH, Ghaffarifar F, Dalimi A, Shahverdi AR. 2013. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Trace Elem Med Biol* 27:203–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.11.002>.
- Moreno D, Plano D, Baquedano Y, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartin C. 2011. Antileishmanial activity of imidothiocarbamates and imi-

- doselenocarbamates. *Parasitol Res* 108:233–239. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2073-x>.
22. Baquedano Y, Moreno E, Espuelas S, Nguewa P, Font M, Gutierrez KJ, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartin C. 2014. Novel hybrid selenosulfonamides as potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 74:116–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.030>.
  23. Fernandez-Rubio C, Campbell D, Vacas A, Ibanez E, Moreno E, Espuelas S, Calvo A, Palop JA, Plano D, Sanmartin C, Nguewa PA. 6 July 2015. Exploring leishmanicidal activities of novel methylselenoimidocarbamates. *Antimicrob Agents Chemother* <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00997-15>.
  24. Plano D, Baquedano Y, Moreno-Mateos D, Font M, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartin C. 2011. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 46:3315–3323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.054>.
  25. Gopinath VS, Pinjari J, Dere RT, Verma A, Vishwakarma P, Shivahare R, Moger M, Kumar Goud PS, Ramanathan V, Bose P, Rao MV, Gupta S, Puri SK, Launay D, Martin D. 2013. Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 69:527–536. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.028>.
  26. Bompard D, Nunez-Duran J, Rodriguez D, Kouznetsov VV, Melendez Gomez CM, Sojo F, Arvelo F, Visbal G, Alvarez A, Serrano-Martín X, Garcia-Marchan Y. 2013. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorg Med Chem* 21:4426–4431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.063>.
  27. Di Giorgio C, Shimi K, Boyer G, Delmas F, Galy JP. 2007. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. *Eur J Med Chem* 42:1277–1284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.02.010>.
  28. Carole DG, Michel DM, Julien C, Florence D, Anna N, Severine J, Gerard D, Pierre TD, Jean-Pierre G. 2005. Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. *Bioorg Med Chem* 13:5560–5568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.06.045>.
  29. Lizarazo-Jaimes EH, Reis PG, Bezerra FM, Rodrigues BL, Monte-Neto RL, Melo MN, Frezard F, Demicheli C. 2014. Complexes of different nitrogen donor heterocyclic ligands with  $SbCl_3$  and  $PhSbCl_2$  as potential antileishmanial agents against  $Sb^{III}$ -sensitive and -resistant parasites. *J Inorg Biochem* 132:30–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.12.001>.
  30. Villalobos-Rocha JC, Sanchez-Torres L, Noguera-Torres B, Segura-Cabrera A, Garcia-Perez CA, Bocanegra-García V, Palos I, Monge A, Rivera G. 2014. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-leishmanial activity by quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives. *Parasitol Res* 113:2027–2035. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3850-8>.
  31. Ronga L, Del Favero M, Cohen A, Soum C, Le Pape P, Savrimoutou S, Pinaud N, Mullie C, Daulouede S, Vincendeau P, Farvacques N, Agnamey P, Pagniez F, Hutter S, Azas N, Sonnet P, Guillon J. 2014. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-alkapolyenylypyrrolo[1,2-a]quinoxalines as antileishmanial agents—part III. *Eur J Med Chem* 81:378–393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.037>.
  32. Arango V, Robledo S, Seon-Meniél B, Figadere B, Cardona W, Saez J, Ojalvaro F. 2010. Coumarins from *Galipea panamensis* and their activity against *Leishmania panamensis*. *J Nat Prod* 73:1012–1014. <http://dx.doi.org/10.1021/np100146y>.
  33. Vila-Nova NS, de Moraes SM, Falcao MJ, Alcantara TT, Ferreira PA, Cavalcanti ES, Vieira IG, Campello CC, Wilson M. 2013. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the Annona muricata acetogenin annonacinone and corosolone, and the Platymiscium floribundum coumarin scoparone. *Exp Parasitol* 133:334–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.025>.
  34. Tahghighi A, Razi S, Mahdavi M, Foroumadi P, Ardestani SK, Emami S, Kobarfard F, Dastmalchi S, Shafiee A, Foroumadi A. 2012. Synthesis and anti-leishmanial activity of 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-amines containing *N*-[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] moieties. *Eur J Med Chem* 50:124–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.046>.
  35. Upadhyaya RS, Dixit SS, Foldesi A, Chattopadhyaya J. 2013. New antiprotozoal agents: their synthesis and biological evaluations. *Bioorg Med Chem Lett* 23:2750–2758. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.054>.
  36. Parise-Filho R, Pasqualoto KF, Magri FM, Ferreira AK, da Silva BA, Damiao MC, Tavares MT, Azevedo RA, Auada AV, Polli MC, Brandt CA. 2012. Dillapiole as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic activity and preliminary SAR studies of dillapiole analogues. *Arch Pharm (Weinheim)* 345:934–944. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201200212>.
  37. Suryawanshi SN, Tiwari A, Chandra N, Ramesh Gupta S. 2012. Chemotherapy of leishmaniasis. Part XI: synthesis and bioevaluation of novel isoxazole containing heteroretinoid and its amide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 22:6559–6562.
  38. Marrapu VK, Mittal M, Shivahare R, Gupta S, Bhandari K. 2011. Synthesis and evaluation of new furanyl and thiophenyl azoles as antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 46:1694–1700. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.021>.
  39. Baiocco P, Poce G, Alfonso S, Cocozza M, Porretta GC, Colotti G, Biava M, Moraca F, Botta M, Yardley V, Fiorillo A, Lantella A, Malatesta F, Ilari A. 2013. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: a comparative analysis with its physiological substrate by X-ray crystallography. *ChemMedChem* 8:1175–1183. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201300176>.
  40. Fernandes MC, Da Silva EN, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. 2012. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 139:26–36. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011001612>.
  41. Papanastasiou I, Prousis KC, Georgikopoulou K, Pavlidis T, Scoulica E, Kolocouris N, Calogeropoulou T. 2010. Design and synthesis of new adamantyl-substituted antileishmanial ether phospholipids. *Bioorg Med Chem Lett* 20:5484–5487. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.078>.
  42. Tavares J, Ouassii A, Kong Thoo Lin P, Loureiro I, Kaur S, Roy N, Cordeiro-da-Silva A. 2010. Bisnaphthalimidopropyl derivatives as inhibitors of *Leishmania* SIR2 related protein 1. *ChemMedChem* 5:140–147. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200900367>.
  43. Stec J, Huang Q, Pieroni M, Kaiser M, Fomovska A, Mui E, Witola WH, Bettis S, McLeod R, Brun R, Kozikowski AP. 2012. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of *N*-benzoyl-2-hydroxybenzamides as agents active against *P. falciparum* (K1 strain), trypanosomes, and *Leishmania*. *J Med Chem* 55:3088–3100. <http://dx.doi.org/10.1021/jm2015183>.
  44. Stump B, Kaiser M, Brun R, Krauth-Siegel RL, Diederich F. 2007. Betraying the parasite's redox system: diaryl sulfide-based inhibitors of trypanothione reductase: subversive substrates and antitrypanosomal properties. *ChemMedChem* 2:1708–1712. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200700172>.
  45. Braga SF, Alves EV, Ferreira RS, Fradico JR, Lage PS, Duarte MC, Ribeiro TG, Junior PA, Romanha AJ, Tonini ML, Steindel M, Coelho EF, de Oliveira RB. 2014. Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones. *Eur J Med Chem* 71:282–289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.011>.
  46. Colotti G, Baiocco P, Fiorillo A, Boffi A, Poser E, Chiaro FD, Ilari A. 2013. Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs. *Future Med Chem* 5:1861–1875. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.13.146>.
  47. Bernardes LS, Zani CL, Carvalho I. 2013. Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. *Curr Med Chem* 20:2673–2696. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867311320210005>.
  48. Müller J, Terfort A. 2006. Synthesis of pure aromatic, aliphatic, and araliphatic diselenides. *Inorganica Chim Acta* 359:4821–4827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2006.05.032>.
  49. Shaaban S, Arafat MA, Hamama WS. 2014. Vistas in the domain of organoselenocyanates. *Arkivoc* 2014:470–505. <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.p008.763>.
  50. Shaaban S, Negm A, Sobh MA, Wessjohann LA. 2015. Organoselenocyanates and symmetrical diselenides redox modulators: design, synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem* 97:190–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.002>.
  51. Alzate JF, Arias AA, Moreno-Mateos D, Alvarez-Barrientos A, Jimenez-Ruiz A. 2007. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 152:192–202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.006>.
  52. Toro MA, Sanchez-Murcia PA, Moreno D, Ruiz-Santaquiteria M, Alzate JF, Negri A, Camarasa MJ, Gago F, Velazquez S, Jimenez-Ruiz A. 2013. Probing the dimerization interface of *Leishmania infantum* trypano-

- thione reductase with site-directed mutagenesis and short peptides. *Chembiochem* 14:1212–1217. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200744>.
53. Sander T, Freyss J, von Korff M, Reich JR, Rufener C. 2009. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. *J Chem Infect Model* 49:232–246. <http://dx.doi.org/10.1021/ci800305f>.
  54. Agnihotri S, Narula R, Joshi K, Rana S, Singh M. 2012. In silico modeling of ligand molecule for non structural 3 (NS3) protein target of flaviviruses. *Bioinformatics* 8:123–127. <http://dx.doi.org/10.6026/97320630008123>.
  55. Ahsan MJ, Samy JG, Khalilullah H, Nomani MS, Saraswat P, Gaur R, Singh A. 2011. Molecular properties prediction and synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole analogues as potent antimicrobial and antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett* 21:7246–7250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.057>.
  56. Bhasin KK, Singh J. 2002. A novel and convenient synthesis towards 2-pyridylselenium compounds: X-ray crystal structure of 4,4'-dimethyl-2,2'-dipyridyl diselenide and tris(2-pyridylseleno)methane. *J Organomet Chem* 658:71–76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-328X\(02\)01627-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-328X(02)01627-3).
  57. Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. 2006. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X<sub>L</sub> expression. *Apoptosis* 11:161–171. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-006-4570-z>.
  58. Nwaka S, Hudson A. 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* 5:941–955. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2144>.
  59. Eberle C, Burkhard JA, Stump B, Kaiser M, Brun R, Krauth-Siegel RL, Diederich F. 2009. Synthesis, inhibition potency, binding mode, and antiprotozoal activities of fluorescent inhibitors of trypanothione reductase based on mepacrine-conjugated diaryl sulfide scaffolds. *ChemMedChem* 4:2034–2044. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200900327>.
  60. Hundsdorfer C, Hemmerling HJ, Hamberger J, Le Borgne M, Bednarski P, Gotz C, Totzke F, Jose J. 2012. Novel indeno[1,2-*b*]indoloquinones as inhibitors of the human protein kinase CK2 with antiproliferative activity towards a broad panel of cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 424:71–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.068>.
  61. de Toledo JS, Junior PE, Manfrim V, Pinzan CF, de Araujo AS, Cruz AK, Emery FS. 2013. Synthesis, cytotoxicity and in vitro antileishmanial activity of naphthothiazoles. *Chem Biol Drug Des* 81:749–756. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12123>.
  62. Ali AR, El-Bendary ER, Ghaly MA, Shehata IA. 2013. Novel acetamidothiazole derivatives: synthesis and *in vitro* anticancer evaluation. *Eur J Med Chem* 69:908–919. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.021>.

## Artículo 4.

### First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent in vitro antileishmanial activity

Marta Ruiz-Santaquiteria<sup>a</sup>, Pedro A. Sánchez-Murcia<sup>b</sup>, Miguel A. Toro<sup>c</sup>, Héctor de Lucio<sup>c</sup>, Kilian Jesús Gutiérrez<sup>c</sup>, Sonia de Castro<sup>a</sup>, Filipa A.C. Carneiro<sup>a</sup>, Federico Gago<sup>b</sup>, Antonio Jiménez-Ruiz<sup>c</sup>, María-Jose Camarasa<sup>a</sup>, Sonsoles Velázquez<sup>a</sup>.

[a] Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), E-28006 Madrid, España

[b] Área de Farmacología, Departamento de Ciencias Biomédicas, Unidad Asociada al IQM-CSIC, Universidad de Alcalá, E-28805 Alcalá de Henares, Madrid, España

[c] Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, E-28805 Alcalá de Henares, Madrid, España

**Revista** European Journal of Medicinal Chemistry  
**Editorial** Elsevier  
**Año** 2017  
**Volumen** 135  
**Páginas** 49-59  
**DOI** 10.1016/j.ejmech.2017.04.020



**ELSEVIER**



## Research paper

# First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent *in vitro* antileishmanial activity<sup>#</sup>



Marta Ruiz-Santaquiteria <sup>a</sup>, Pedro A. Sánchez-Murcia <sup>b</sup>, Miguel A. Toro <sup>c</sup>, Héctor de Lucio <sup>c</sup>, Kilian Jesús Gutiérrez <sup>c</sup>, Sonia de Castro <sup>a</sup>, Filipa A.C. Carneiro <sup>a</sup>, Federico Gago <sup>b</sup>, Antonio Jiménez-Ruiz <sup>c</sup>, María-José Camarasa <sup>a</sup>, Sonsoles Velázquez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), E-28006 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Área de Farmacología, Departamento de Ciencias Biomédicas, Unidad Asociada al IQM-CSIC, Universidad de Alcalá, E-28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, E-28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 February 2017

Received in revised form

30 March 2017

Accepted 11 April 2017

Available online 13 April 2017

<sup>#</sup>Dedicated to Professor Jan Balzarini on the occasion of his retirement

## Keywords:

Peptides

Helix stabilization

Protein-protein interactions

Trypanothione reductase

*Leishmania infantum*

Cell-penetrating peptides

## ABSTRACT

A series of 9-mer and 13-mer amide-bridged cyclic peptides derived from the linear prototype Ac-PKIIQSVGIS-Nle-K-Nle-NH<sub>2</sub> (Toro et al. *ChemBioChem* 2013) has been designed and synthesized by introduction of the lactam between amino acid side chains that are separated by one helical turn (*i, i+4*). All of these compounds were tested *in vitro* as both dimerization and enzyme inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase (Li-TryR). Three of the 13-mer cyclic peptide derivatives (**3**, **4** and **6**) inhibited the oxidoreductase activity of Li-TryR in the low micromolar range and they also disrupted enzyme dimerization. Cyclic analogues **3** and **4** were more resistant to proteases than was the linear prototype. Furthermore, the most potent TryR inhibitors in the linear and cyclic series displayed potent *in vitro* activity against *Leishmania infantum* upon conjugation with cationic cell-penetrating peptides. To date, these conjugated peptides can be considered the first example of TryR dimerization inhibitors that are active in cell culture.

© 2017 Published by Elsevier Masson SAS.

## 1. Introduction

*Leishmania* parasites are the causative agents of leishmaniasis, one of the World Health Organization's 16 neglected tropical diseases and endemic in more than 80 countries worldwide. One of the most serious clinical forms of this disease is visceral

leishmaniasis (VL), caused by *L. donovani*, *L. infantum* and *L. chagasi*, which is invariably fatal if left untreated. VL kills more than 20000 people every year and over 310 million people are considered at risk of infection [1]. Furthermore, reported cases of *Leishmania* and HIV co-infection in many endemic countries continue to be of great concern. Current drugs are highly toxic, resistance is common, and patient compliance is low as the medicines are costly and treatments are long [2–4]. Thus, there is an urgent need to identify and develop new and more efficient nontoxic and innovative drugs to fight this infection.

Trypanothione reductase (TryR) of trypanosomatids is a validated drug target as this is a crucial enzyme in their defense against oxidative stress and is absent in humans [5]. Most, if not all, the efforts made by the scientific community to inhibit TryR have relied on the design of molecules directed towards the active site, some of which have turned out to be lethal to whole parasites *in vitro* [6–8].

**Abbreviations:** CPP, cell-penetrating peptide; DSSP, define secondary structure of proteins algorithm; ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; IC<sub>50</sub>, inhibitory concentration 50; Li-TryR, *Leishmania infantum* trypanothione reductase; LC<sub>50</sub>, lethal concentration 50; MD, molecular dynamics; Mmt, monomethoxytrityl; Phipr, phenylisopropyl; PyBOP, (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate; PPIs, protein-protein interaction inhibitors; PI, propidium iodide; SPSS, solid phase peptide synthesis; TFE, trifluoroethanol; VL, visceral leishmaniasis.

\* Corresponding author. Instituto de Química Médica (CSIC), C/ Juan de la Cierva 3 E-28006 Madrid, Spain.

E-mail address: [iqmsv29@iqm.csic.es](mailto:iqmsv29@iqm.csic.es) (S. Velázquez).



Considering that the biologically functional form of TryR is a homodimer, we have recently reported [9] an unexploited inhibition strategy directed at disrupting the dimer interface of the enzyme by means of protein–protein interaction inhibitors (PPIs). Previously, using a combination of molecular modeling and site-directed mutagenesis studies, we identified and validated E436 as a key amino acid (“hot spot”) for the structural stability and function of the dimer. On the basis of these results and as a “proof of concept” of this novel approach, we designed and tested a small library of linear peptides representing rational variations of the  $\alpha$ -helix, spanning residues P435 to M447, that contains the crucial E436 of *Leishmania infantum* TryR (Li-TryR). Among the synthesized peptides, the 13-mer peptide Ac-PKIIQSVGIS-Nle-K-Nle-NH<sub>2</sub>, containing Lys in place of Glu at position 2, outperformed the original sequence (Ac-PEIIQSVGIS-Nle-K-Nle-NH<sub>2</sub>, compound **P1**) in inhibiting both Li-TryR dimerization and oxidoreductase activity in a sequence-specific manner [9]. These findings were rationalized by results from molecular dynamics (MD) simulations that highlighted a strong electrostatic interaction between the Lys at position 2 of the peptide and E436 in the Li-TryR monomer, a key residue for enzyme stability. Furthermore, we identified the 9-mer peptide Ac-PKIIQSVGI-NH<sub>2</sub> as the shortest C-terminally truncated peptide that was able to inhibit Li-TryR [9]. Therefore, these peptides emerged as promising Li-TryR dimerization inhibitors in the micromolar range [9]. Nonetheless, these linear prototypes derived from the 435–447  $\alpha$ -helix were inactive against *L. infantum* axenic amastigotes and promastigotes, most likely because the theoretically predicted low propensity to form an  $\alpha$ -helix in solution prevents crossing of cell membranes. For this reason, we recently explored strategies for stabilizing the helical content of the original peptide sequence **P1** in solution by side chain-to-side chain cyclization through carbon-carbon or amide bonds [10]. The use of both lactam bridges [11–14] and short hydrocarbon chains [15,16] as staples proved to be successful to enhance and maximize helicity as well as to limit degradation by proteases [17–19]. Our germinal results indicated that the nature of the introduced linker had a deep impact on the potency as Li-TryR dimerization inhibitors of **P1** derivatives of general formula Ac-PEIXQSVXIS-Nle-K-Nle, where X indicates the position of the cyclizing residues. Notably, the dicarba analogs of **P1** had no measurable activity but the lactam derivatives not only retained the inhibitory potency found in their linear counterparts but they were also more resistant to proteolytic degradation [10].

In the work reported herein, the overall aim was to increase the proteolytic stability and to improve the *in vitro* leishmanicidal activity of previously described Li-TryR-derived linear peptides that were active as TryR dimerization inhibitors [9]. To achieve this goal, we first synthesized and characterized a series of amide-bridged cyclic analogues, derived from the most potent 13-mer and 9-mer linear prototypes identified so far (compounds **1** and **2**, Fig. 1). Macrolactam constraints were introduced between amino acid side-chains that are separated by one helical turn (*i, i+4*) (compounds **3–8**, Fig. 1). Of these new amide-bridged derivatives, **3, 4** and **6** inhibited the oxidoreductase activity of Li-TryR in the low micromolar range and were also active in disrupting enzyme dimerization. The conformational constraints introduced improved the proteolytic stability of these derivatives against proteinase K, a broad-spectrum serine-protease. On the other hand, conjugation with cationic cell-penetrating peptides (CPP) of the linear and cyclic peptides that were most active in the enzymatic assays was also explored. Interestingly, these conjugates displayed potent *in vitro* activity against *Leishmania infantum* parasites. To date, and to the best of our knowledge, these compounds represent the first reported TryR dimerization inhibitors that are active in cell culture.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Design and chemical synthesis

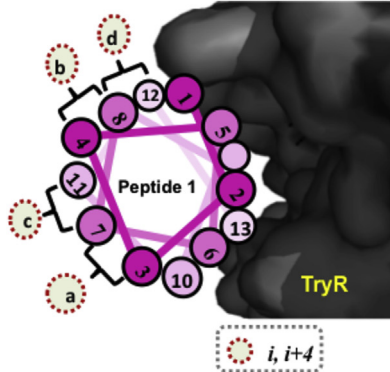
We explored several positions for covalent amide closure in both 13-mer and 9-mer peptides, all of them placed on the face of the  $\alpha$ -helix opposite to that used for binding to the Li-TryR monomer (Fig. 1). The sequences of the target cyclic peptides (**3–8**) are depicted in Fig. 1.

The synthesis of **3–8** was performed manually following standard solid-phase peptide synthesis (SPPS) protocols using a Rink amide MBHA polystyrene resin and *N*-Fmoc/<sup>t</sup>Bu chemistry. The peptides were isolated both acetylated at the *N*-terminus and as carboxamides at the C-terminal end. A low load of resin (0.38 mmol/g) was used to minimize oligomer formation during the side chain-to-side chain cyclization.

The synthesis of 13-mers **3–6** is depicted in Scheme 1. For the preparation of lactam **3, 4** and **6**, we used commercially available Glu and Lys residues with the side-chains protected as allyl esters and allyloxycarbonyl groups suitable for orthogonal deprotection prior to on-resin cyclization (Method a, Scheme 1). After Fmoc deprotection of the resin under standard piperidine conditions, the first amino acid was introduced in the presence of HCTU as the coupling reagent and DIEA as the base at room temperature for 2 h. The coupling of the following amino acids was carried out under microwave irradiation at 40° C in the presence of HCTU/DIEA (3 × 10 min). Once the elongation was completed, the Fmoc-group of the *N*-terminus of the peptides was deprotected and acetylated. Next, the allyl groups were selectively removed with Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> and PhSiH<sub>3</sub> as an allyl scavenger, and then, the lactam bridge was formed using PyBOP and DIEA in NMP as solvent. The lactam-forming reaction was completed at room temperature in 1 h. Finally, the cyclic peptides were cleaved from the resin under standard conditions. The 9-mer cyclic analogues **7** and **8** were similarly prepared (see Experimental). The corresponding 13-mer and 9-mer linear precursors **14, 15, 17–19** (Table S1, see Supplementary material) were also synthesized by cycles of Fmoc-deprotection and coupling, acetylation, removal of the allyl groups and final cleavage from the resin.

Our initial attempts to synthesize **5** using a similar Fmoc/allyl/<sup>t</sup>Bu strategy consistently failed due to the high propensity of the unhindered allyl ester-protected glutamate adjacent to a Gly residue to undergo base-induced glutarimide formation [20]. For preventing this side-reaction, the sterically demanding mild acid-labile protecting groups monomethoxytrityl (Mmt) and phenylisopropyl (Phipr) groups were used for the protection of the bridging Lys and Glu residues, respectively (Method b, Scheme 1). Thus, after elongation of the first seven residues, the Glu and Lys side-chain groups were deprotected with dilute TFA (1%). Cyclization was then carried out with PyBOP as the coupling reagent. Upon subsequent peptide chain elongation, the *N*-terminus of the peptide was acetylated and cleaved from the resin under standard conditions to give the desired 13-mer cyclic compound **5**. The corresponding linear precursor **16** (Table S1, see Supplementary material) was also prepared after completing the elongation, acetylation and standard TFA cleavage leading to the simultaneous deprotection of the side-chains of Glu(Phipr) and Lys(Mmt) residues.

Every cyclic peptide and linear precursor synthesized in this work was characterized by analytical HPLC and ESI-MS after purification on a Biotage Isolera (linear analogues) or by semi-preparative HPLC (cyclic analogues). The sequences, HPLC purity and global yields of the target cyclic peptides and linear precursors are shown in Table S1 (see Supplementary material).



| Peptide number<br>(cyclization<br>position) <sup>a</sup> | Peptide sequence |   |       |   |   |   |       |       |   |    |                |    |                |  |
|--|------------------|---|-------|---|---|---|-------|-------|---|----|----------------|----|----------------|--|
|  | 1                | 2 | 3     | 4 | 5 | 6 | 7     | 8     | 9 | 10 | 11             | 12 | 13             |  |
| 1  | P                | K | I     | I | Q | S | V     | G     | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |  |
| 2  | P                | K | I     | I | Q | S | V     | G     | I |    |                |    |                |  |
| 3 (a)  | P                | K | E     | I | Q | S | K     | G     | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |  |
|  |                  |   | CO-NH |   |   |   |       |       |   |    |                |    |                |  |
| 4 (b)  | P                | K | I     | E | Q | S | V     | K     | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |  |
|  |                  |   | CO-NH |   |   |   |       |       |   |    |                |    |                |  |
| 5 (c)  | P                | K | I     | I | Q | S | E     | G     | I | S  | K              | K  | N <sub>L</sub> |  |
|  |                  |   |       |   |   |   | CO-NH |       |   |    |                |    |                |  |
| 6 (d)  | P                | K | I     | I | Q | S | V     | E     | I | S  | N <sub>L</sub> | K  | N <sub>L</sub> |  |
|  |                  |   |       |   |   |   |       | CO-NH |   |    |                |    |                |  |
| 7 (a)  | P                | K | E     | I | Q | S | K     | G     | I |    |                |    |                |  |
|  |                  |   | CO-NH |   |   |   |       |       |   |    |                |    |                |  |
| 8 (b)  | P                | K | I     | E | Q | S | V     | K     | I |    |                |    |                |  |
|  |                  |   | CO-NH |   |   |   |       |       |   |    |                |    |                |  |

<sup>a</sup> Cyclization positions a-d according to Figure 1  
N<sub>L</sub> = norleucine

**Fig. 1.** Sequences and cyclization positions (on the side of the  $\alpha$ -helix side that is thought not to interact directly with Li-TryR) of the designed lactam peptides synthesized in this work.

## 2.2. Structural characterization

The helical content of peptides **3–8** was studied by means of circular dichroism (CD) spectroscopy and molecular modeling. The percentage of helicity for each cyclic peptide and linear precursor was calculated according to its molar ellipticity at 222 nm and the number of amino acids using the equation of Baldwin and col [21]. (see table in Fig. 2). To increase the aqueous solubility of the peptides the CD-UV spectra were acquired in the presence of the helix-promoting solvent 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) [22,23].

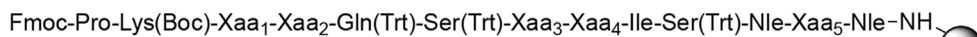
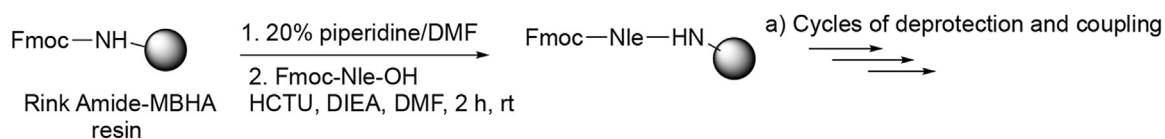
In all cases, the introduction of the amide covalent closure promoted  $\alpha$ -helical formation: whereas the linear prototypes **1** and **2**, as well as the linear 9-mer and 13-mer precursors **14–19**, exhibited a CD spectrum characteristic of unstructured peptides (data not shown), all the cyclic peptides **3–8** displayed the dual minima at 208 and 222 nm characteristic of an  $\alpha$ -helix (Fig. 2). As expected due to their increased length, the lactam-bridged **3–6** 13-mers, irrespective of the position of cyclization, exhibited higher percentages of helicity compared to the linear prototype **1** (38–65% vs 16%) (Fig. 2A). In contrast, the two amide-bridged 9-mers **7** and **8** behaved differently (Fig. 2B) insofar as cyclization between positions 3 and 7 (**7**) was found to be less beneficial for helicity than cyclization between positions 4 and 8 (**8**).

To get some insight into the structural effects of introducing these amide bonds between positions 3,7 or 4,8 we ran unrestrained MD simulations of 9-mers **7** and **8** in explicit water. We found, in both cases, an increase in the percentages of  $\alpha$ -helices in comparison to their linear counterpart **2**, in consonance with the experimental findings (Fig. 3). Nonetheless, in **7** only the five central residues (4–8) maintained the  $\alpha$ -helical structure (Fig. 3A) whereas two complete helical turns covering the whole sequence were apparent in **8** during most of the simulation (Fig. 3B).

## 2.3. Biological activity

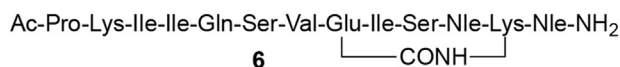
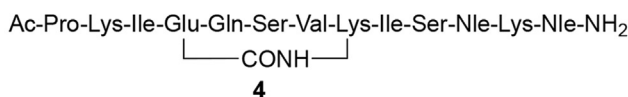
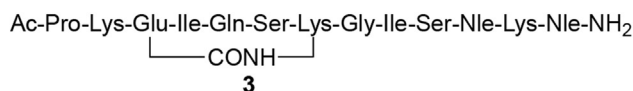
### 2.3.1. Enzymatic assays and proteolytic stability

All the synthesized compounds (including intermediates **14–19**) were evaluated as Li-TryR inhibitors [24] (Table 1). The position of the linking residues in the peptide sequence of the amide-bridged cyclic 13-mers was found to be crucially important for their Li-TryR inhibitory activity. Thus, the IC<sub>50</sub> values of **3** and **4**, with a lactam bridge at positions 3, 7 and 4, 8, respectively, were similar to that of the linear prototype **1** whereas substantial drops in inhibitory potency were apparent for **5** and **6**, which are cyclized through positions 7 and 11 or 8 and 12, respectively. None of the two shorter cyclic 9-mers, **7** and **8**, displayed any activity but **19** (the linear

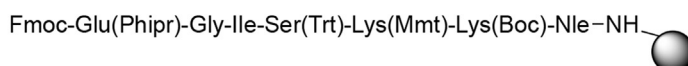


| Comp.     | Xaa <sub>1</sub> | Xaa <sub>2</sub> | Xaa <sub>3</sub> | Xaa <sub>4</sub> | Xaa <sub>5</sub> |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>9</b>  | All              | Ile              | Lys(Alloc)       | Gly              | Lys(Boc)         |
| <b>10</b> | Ile              | Glu(All)         | Val              | Lys(Alloc)       | Lys(Boc)         |
| <b>11</b> | Ile              | Ile              | Val              | Glu(All)         | Lys(Alloc)       |

b) Fmoc deprotection  
 c) Acetylation  
 d) All/Alloc deprotection  
 e) Cyclization  
 f) Cleavage

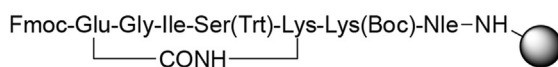


**Method a**



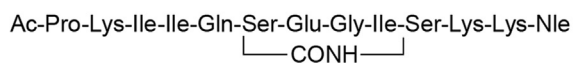
**12**

g) Phipr/Mmt deprotection  
 e) Cyclization



**13**

a) Cycles of deprotection and coupling  
 b) Fmoc deprotection  
 c) Acetylation  
 f) Cleavage

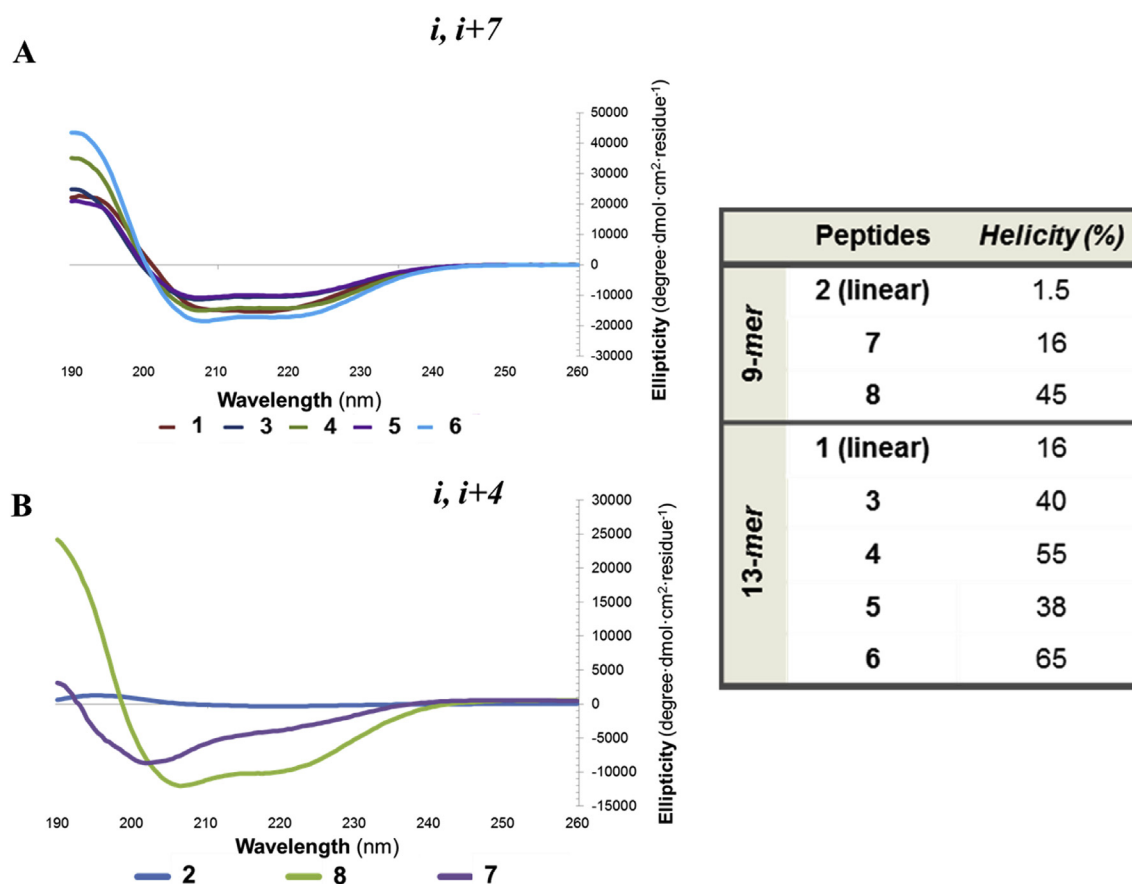


**5**

**Method b**

**Reagents and conditions:** (a) 20% piperidine, DMF, rt; Fmoc-AA-OH; HCTU, DIEA, DMF, MW, 3 x 10 min, 40 °C; (b) 20% piperidine, DMF, rt; (c) Ac<sub>2</sub>O, DIEA, DMF, rt; (d) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PhSiH<sub>3</sub>, DCM, rt; (e) PyBOP, DIEA, NMP, 1 h, rt; (f) TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5), rt; (g) TFA/TIPS/DCM (1:2:97), rt.

**Scheme 1.** Synthesis of amide-bridged cyclic peptides **3**, **4**, **6** (**Method a**) and **5** (**Method b**).



**Fig. 2.** (Left) Circular dichroism spectra of amide-bridged 13-mers **3–6** (A) and amide-bridged 9-mers **7** and **8** (B). Linear peptides **1** and **2** were used as controls. (Right) Experimentally determined helicities (%).

precursor of **8**) was found to be moderately active against the enzyme.

The next step was to explore whether the inhibitory activity detected in this assay was contingent on the disruption of the dimeric form of the enzyme, as originally intended [9]. In good agreement with our expectations, all the cyclic compounds found to be active in the enzymatic assay (**3**, **4** and **6**) were also shown to be Li-TryR dimerization disruptors in our ELISA assay (Table 1) [9].

Taken together, our data support the view that a minimal backbone flexibility is required to keep the inhibitory potency in the cyclic derivatives. Whereas side-chain cross-linking of amino acids at positions 3, 7 and 4, 8 of the linear 13-mer **1** (yielding **3** and **4**, respectively) does not reduce the activity, cross-linking of the same positions in the linear 9-mer **2** completely abolishes the activity in derivatives **7** and **8**. Furthermore, activity does not appear to depend on helix propensity as no clear differences are found between active and inactive peptides in their heat maps for secondary structure (Fig. 3 and Fig. S1, see Supplementary material). Interestingly, the MD simulations of 13-mer cyclic peptides suggest that the loss of activity in **5** (cross-linked at 7, 11) is likely due to its being locked in a rigid non-bioactive conformation (Fig. S1, top right), in contrast to **6** (cross-linked at 8, 12), which is active and maintains a structure like that of the also active **3** and **4** (cross-linked at 3, 7 and 4, 8, respectively) (Fig. S1, top and bottom left). Finally, although the last three residues in the linear 13-mers are not required for activity [9], this C-terminal region appears to be critical for inhibitory potency in the presence of a side-chain crosslink (peptides **3**, **4** and **6**) (Table 1).

To determine the influence of lactam-bridge stapling on

proteolytic stability, we compared the susceptibilities of the linear prototype **1** and the most active lactam-containing analogues **3** and **4** to degradation by proteinase K, a promiscuous serine protease with broad substrate specificity. The half-lives of the lactam-bridged analogues **3** and **4** were 2- to 3-fold higher than that of the linear analogue **1** ( $t_{1/2}$  values of 52 and 64 min vs 23 min, respectively).

### 2.3.2. Anti-leishmanial activity in cell culture

The linear and cyclic analogues were tested *in vitro* against *L. infantum* promastigotes and axenic amastigotes using edelfosine and miltefosine as positive controls. Since none of the newly synthesized compounds displayed any activity at 25  $\mu$ M (maximum concentration assayed), we examined their ability to cross the plasma membrane. Fluorescence microscopy of promastigotes incubated with the fluoresceine-labeled peptide conjugates of (compounds **20** and **21**, Fig. S2, see Supplementary material) demonstrated the low ability of linear prototype **1** and the lactam-bridged analogue **3** to cross the cell membrane (data not shown).

In an attempt to increase cell permeability, both compounds were covalently linked to a CPP through their N-terminal or C-terminal regions [25–27]. Among the cationic CPPs, the widely used polyarginines ( $R_9$ ) and Tat sequences were selected due to their recently reported low toxicity and efficient uptake by *Leishmania* parasites and macrophages [28,29]. Moreover, stabilized  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib)-containing Arg-based peptides were also chosen [30]. It should be noted that CPP-based approaches have been rarely explored for infectious diseases such as leishmaniasis. The sequences of the target [CPP]-[peptide] conjugates



**Table 2**

LC<sub>50</sub><sup>a</sup> ± SEM values for the [CPPs]-[peptide] conjugates **22–26**, CPPs R<sub>9</sub> and Tat (**27** and **28**) and R<sub>9</sub>-conjugated scrambled peptide **29** on *L. infantum* promastigotes, amastigotes and THP-1 cells.<sup>b</sup>

| Comp.                 | Sequence <sup>c</sup>  | LC <sub>50</sub> (μM) Promastigotes | LC <sub>50</sub> (μM) Amastigotes | LC <sub>50</sub> (μM) THP-1 |
|-----------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <b>22</b>             | RRRRRRRRR PKIIQSVGISN <sub>1</sub> KN <sub>L</sub>   | 4.6 ± 0.2                           | 3.5 ± 0.9                         | 1.7 ± 0.5                   |
| <b>23</b>             | PKIIQSVGISN <sub>1</sub> KN <sub>L</sub> RRRRRRRRR   | 4.4 ± 0.5                           | 2.1 ± 1.0                         | 0.8 ± 0.1                   |
| <b>24</b>             | GRKKRRQRPPQ PKIIQSVGISN <sub>1</sub> KN <sub>L</sub>   | 4.3 ± 0.4                           | 1.5 ± 0.3                         | 1.2 ± 0.4                   |
| <b>25</b>             | RRRRRRRRPK-c[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ] <sup>3,7</sup> [EIQSK]GISN <sub>1</sub> KN <sub>L</sub>               | 3.5 ± 0.4                           | 2.8 ± 0.3                         | 2.5 ± 0.8                   |
| <b>26</b>             | (RR-Aib) <sub>3</sub> PK-c[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ] <sup>3,7</sup> [EIQSK]GISN <sub>1</sub> KN <sub>L</sub> | 6.4 ± 0.9                           | 10.4 ± 3.2                        | 5.2 ± 0.8                   |
| <b>27</b>             | RRRRRRRRR (R <sub>9</sub> )  | >25                                 | >25                               | >25                         |
| <b>28</b>             | GRKKRRQRPPQ (Tat)  | >25                                 | >25                               | >25                         |
| <b>29</b> (scrambled) | RRRRRRRRR KMGISSMVQPKII  | >25                                 | >25                               | >25                         |
| <b>Edelfosine</b>     | –  | 9 ± 0.2                             | 0.6 ± 0.1                         | 1 ± 0.2                     |
| <b>Miltefosine</b>    | –  | 47.6 ± 0.6                          | 2 ± 0.1                           | 19 ± 1.6                    |

<sup>a</sup> LC<sub>50</sub> concentration is defined as that causing 50% of cell death in the population. Dead parasites were identified by their increased permeability to propidium iodide.

<sup>b</sup> Results are representative of three independent experiments each performed in triplicate.

<sup>c</sup> All the peptides are acylated and as carboxamides at the N-terminal and C-terminal end, respectively.

Remarkably, no significant leishmanicidal activity was observed upon incubation of the parasites with non-conjugated R<sub>9</sub> (**27**) and Tat (**28**) peptides. Similarly, conjugation of R<sub>9</sub> with a scrambled peptide with identical amino acid composition but different sequence than our prototype **1** (**29**) did not show any relevant leishmanicidal activity. Thus, it appears that neither the nature of the linker nor the linking position of the CPP (N- vs C-terminus) has a great impact on the potency of the compounds, and the same can be said about the linear or cyclic character of the target peptide conjugates. On the contrary, the sequence composition of the parent peptide in the conjugates is critical for activity.

Next, the ability of the CPP-conjugated compounds to enter the parasites was evaluated by fluorescence microscopy. Conjugate **30**, with a fluorescein moiety linked to the N-terminal position of linear prototype **1** (through a polymethylene spacer) and R<sub>9</sub> conjugated at the C-terminal end, was designed for these studies (Fig. S2, see Supplementary material). Remarkably, parasites exposed to **30** (Fig. 4) for a short 4-h period showed a localized green fluorescence near the flagellar pocket, a complex structure close to the flagellum that is responsible for most of the trafficking through the plasma membrane (Fig. 4A). To our knowledge, this is the first description of a basal localization of a CPP-conjugated compound in *Leishmania* promastigotes. 24 h after addition of the peptides the fluorescence extended to most of the cellular body (Fig. 4B). Both results demonstrate that R<sub>9</sub> conjugation allows cell penetration of our designed peptides and is essential for the observed cytotoxic activity against the parasites.

### 3. Conclusions

To improve both the stability against proteases and the leishmanicidal activity of linear prototype peptides targeting the dimer interface of Li-TryR, we decided to combine advantages derived from the introduction of side-chain crosslinks and the use of CPPs. A positional scanning study allowed us to define the optimal cyclization positions to preserve inhibition of Li-TryR activity and dimerization and 2- to 3-fold increase stability against proteinase K. The data presented here indicate that our designed lactam-bridged peptides are potent inhibitors of Li-TryR activity and dimerization when the side-chain crosslink is properly located in the 13-mers so as to allow some residual flexibility. Interestingly, we demonstrate, for the first time to the best of our knowledge, *in vitro* activity against *Leishmania infantum* resulting from the conjugation of peptide-based inhibitors of TryR dimerization with cationic CPPs. Furthermore, we were able to show precise internal localization of a fluorescent derivative near the structure of the flagellar pocket. All in all, these results support our initial hypothesis that disruption

of the dimerization interface of TryR may be a useful strategy for the development of new drugs against this parasitic target.

## 4. Experimental section

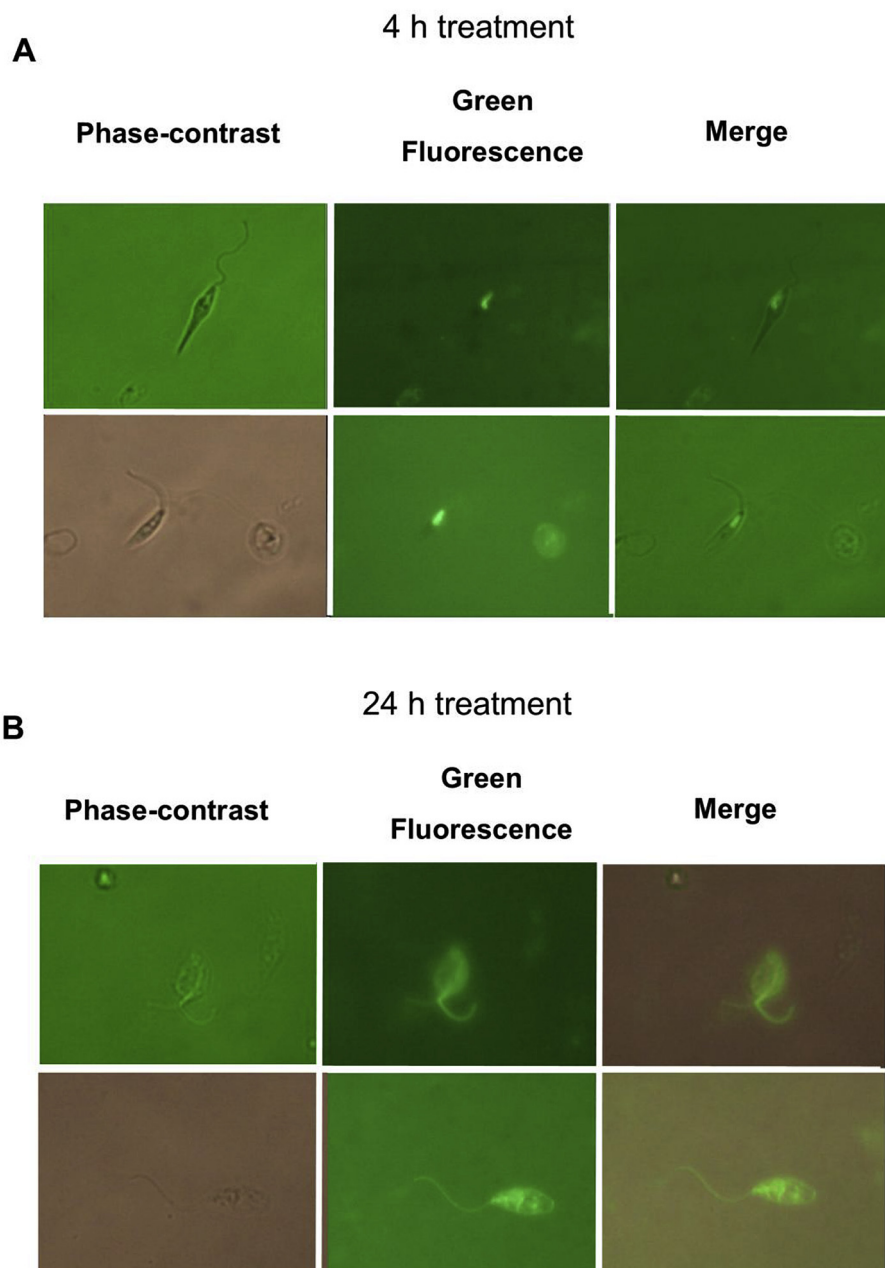
### 4.1. Chemistry

#### 4.1.1. General methods

Unless otherwise noted, analytical grade solvents and commercially available reagents were used without further purification. DIEA, piperidine, Ac<sub>2</sub>O, and EDT were purchased from Aldrich (Germany), TFA from Fluka (Germany) and HCTU from Fluorochem (UK). Fmoc-protected amino acids were purchased from Fluorochem (UK), Polypeptide (France), Novabiochem (Merck, Germany) and Iris Biotech (Germany). Fmoc-protected Rink Amide MBHA resin (0.56 mmol/g and 0.38 mmol/g loading) was purchased from Iris Biotech (Germany) and Novabiochem. [Fluorescein]-[PEG]-[peptide **1**] and [Fluorescein]-[PEG]-[peptide **3**] **20** and **21**, [CPPs]-[Peptide] conjugates **22–26** and **29**, CPPs sequences **27** and **28** and [Fluorescein]-[peptide **1**]-[R<sub>9</sub>] **30** were purchased from Peptide Protein Research (UK) and Genosphere Biotechnologies (France). The pure products were analyzed by HPLC and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

Lactam-bridged peptides **3–8** and linear precursors **14–19** were synthesized manually on a 20-positions manifold (Omega) in a 20-mL polypropylene syringe (Dubelcco) equipped with a porous polyethylene filter. The coupling reactions were carried out on solid phase using microwave radiation in a Biotage Initiator reactor in a 5-mL vial. Excluding the coupling reaction on the microwave reactor, the rest of the SPPS reactions were stirred using an IKA-100 orbital shaker. After cleavage, the acidic crudes were sedimented in Et<sub>2</sub>O on a Hettlich Universal 320R centrifuge at 5000 rpm. All the crude and samples were lyophilized using mixtures water/acetonitrile on a Telstar 6–80 instrument. The monitoring of the reactions was also performed by HPLC/MS through a HPLC-waters 12695 connected to a Waters Micromass ZQ spectrometer. The linear peptides were purified on a Biotage Isolera instrument using reverse phase columns (KP-C18-HS 12 g) and the cyclic peptides were purified on a semipreparative HPLC instrument. As mobile phase, mixtures of A:B were used, where A = 0.05% TFA water and B = acetonitrile with a flow rate of 7 mL/min. The peptides were purified using a gradient from 0% of B to 100% of B in 30–45 min and were detected at 217 nm.

The purity of the peptides was checked by analytical RP-HPLC on an Agilent Infinity instrument equipped with a Diode Array and a C18 Sunfire column (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm). As mobile phase, A:B mixtures were used, where A = 0.05% TFA water and



**Fig. 4.** Fluorescence microscopy images of *L. infantum* promastigotes incubated for 4 h (A) or 24 h (B) with a [fluorescein]-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-[linear peptide 1]-[R<sub>9</sub>] conjugate (**30**). Three different parasites are shown in each panel.

B = acetonitrile. The samples were analyzed at 214 and 254 nm in a gradient from 2% of B to 100% of B in 15 min (gradient 1). HRMS (EI<sup>+</sup>) was carried out in an Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS spectrometer using water/acetonitrile mixtures.

#### 4.1.2. Solid-phase peptide synthesis (SPPS)

Cyclic peptides **3–8** and linear precursors **14–19** were synthesized manually on resin following the standard Fmoc/*t*Bu solid-phase orthogonal protection strategy.

**4.1.2.1. General coupling procedure.** Fmoc-protected Rink Amide MBHA resin was swollen in DCM/DMF/DCM/DMF (4 × 0.5 min). Then, the resin was treated with a mixture of DBU:piperidine:DMF (1:1:48, in volume) at room temperature (1 × 1 min) and

(3 × 10 min) and washed with DMF/DCM/DMF/DCM (4 × 0.5 min). Later, to the free *N*α-terminal swollen resin (1 equiv.), a solution of the corresponding Fmoc-AA-OH (1.2 equiv.), HCTU (1.2 equiv.) and DIEA (2.4 equiv.) in dry DMF (5 mL) was added. After sealing the vial, the reaction was heated in a microwave vial equipped with a magnetic stirrer for 10 min at 40 °C. Then, the vial was opened, the supernatant removed and new coupling mixture added. This process was repeated 3 times in total (3 × 10 min) until complete coupling. Finally, the resin was transferred to a fritted syringe, drained and washed extensively (DMF/DCM/DMF/DCM, 5 × 0.5 min). This protocol was repeated for the sequential anchoring of each amino acid. Coupling reactions to primary amines were monitored by the Kaiser ninhydrin test and to secondary amines by the Choranyl test. In some cases, the progress of

the reactions was also followed by analysis of a small sample of peptidylresin after acidic cleavage in an HPLC-MS instrument.

**4.1.2.2. General acetylation procedure.** After elongation of the peptides, the *N*-terminal group was acetylated in all the cases by DBU deprotection of the Fmoc-resin-bounded derivative as mentioned above followed by treatment of the deprotected resin with a mixture of Ac<sub>2</sub>O:DIEA:DMF (1:1:1, in volume) at room temperature (1 × 1 min) and (4 × 10 min). The resin was finally washed with DMF/DCM/DMF/DCM (4 × 0.5 min).

**4.1.2.3. Selective deprotection of allyl ester (OAl) and allyloxycarbonyl (Alloc) groups.** To the peptidyl resins swollen in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in a syringe, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.25 equiv.) and PhSiH<sub>3</sub> (24 equiv.) were added in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the syringe was sealed and gently bubbled with argon. Then, the reaction was stirred at room temperature for 1 h. Then, the supernatant removed and new coupling mixture added for 1 h (2 × 1 h in total). The resin was then filtered and washed successively with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF/Et<sub>3</sub>NCS<sub>2</sub>Na 0.2 M in DMF/DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to remove residual palladium impurities.

**4.1.2.4. Selective deprotection of (PhiPr) and (Mmt) groups.** Deprotection was carried out using a mixture of TFA:TIPS:H<sub>2</sub>O 1:2:97 in 30 min. Then, the supernatant was removed and new deprotection mixture was added. This process was repeated twice in total (2 × 30 min).

**4.1.2.5. Amide-bridge cyclization.** After, acetylation of the peptides, the resin was swollen and treated with PyBOP (3 equiv.) and DIEA (6 equiv.) in NMP at room temperature for 1 h. Then, the resin was drained and washed extensively (DMF/DCM/DMF/DCM, 5 × 0.5 min).

**4.1.2.6. General cleavage procedure.** The well dried resin-bound derivative (1 vol) in a fritted syringe was treated with TFA:TIP-S:H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (5 vol) for 4 h at room temperature. The filtrates were precipitated over cold Et<sub>2</sub>O and centrifuged three times at 5000 rpm for 10 min. After removing the supernatant, the pellet was redissolved in water/acetonitrile and lyophilized. The crudes were purified to give the target peptides in high purity.

**4.1.2.7. Ac-PK-c[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>3,7</sup>[EQSK]GISN<sub>L</sub>KN<sub>L</sub>-NH<sub>2</sub> (3).** The general protocol was followed with 0.025 mmol of resin. After acetylation and deprotection of Glu and Lys side chains, cyclization was carried out with PyBOP and DIEA in NMP. The amide-cyclic peptide was cleaved and purified by reverse phase chromatography using semipreparative HPLC to give **3** as a white lyophilized cotton-like solid (3.71 mg, 12% overall yield).

HPLC (gradient 1): 6.64 min (98% analytical purity). HRMS (ESI,+) *m/z*: calculated for C<sub>67</sub>H<sub>118</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub> 1462.8934; found 1462.8871 (-4.28 ppm).

**4.1.2.8. Ac-PKI-c[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>4,8</sup>[EQSVK]ISN<sub>L</sub>KN<sub>L</sub>-NH<sub>2</sub> (4).** Starting from 0.114 mmol of resin, and after following the general protocol for elongation, acetylation, deprotection of side chains and cyclization, **4** was purified and isolated as a white lyophilized cotton-like solid (22.99 mg, 13% overall yield).

HPLC (gradient 1): 8.79 min (99% analytical purity). HRMS (ESI,+) *m/z*: calculated for C<sub>70</sub>H<sub>124</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub> 1504.9352; found 1504.9341 (0.72 ppm).

**4.1.2.9. Ac-PKIQSV-c[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>7,11</sup>EGISKKN<sub>L</sub>-NH<sub>2</sub> (5).** The general protocol for elongation was followed with 0.095 mmol of resin. Once Fmoc-Glu-(O-2-PhiPr)-OH was introduced, selective deprotection of Glu and Lys side chains was carried out following

the general protocol. After cyclization, elongation of the peptide was completed. Then, acetylation, cleavage and purification were performed to give **5** as a white lyophilized cotton-like solid (25.38 mg, 18% overall yield).

HPLC (gradient 1): 7.30 min (>99% analytical purity). HRMS (ESI,+) *m/z*: calculated for C<sub>67</sub>H<sub>118</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub> 1462.8880; found 1462.8871 (0.61 ppm).

**4.1.2.10. Ac-PKIQSV-c[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>8,12</sup>[EIS-N<sub>L</sub>-K]N<sub>L</sub>-NH<sub>2</sub> (6).** From 0.342 mmol of resin and following the general protocols, 27 mg (9% overall yield) of **6** were obtained as a white lyophilized cotton-like solid.

HPLC (gradient 1): 10.72 min (97% analytical purity). HRMS (ESI,+) *m/z*: calculated for C<sub>70</sub>H<sub>123</sub>N<sub>17</sub>O<sub>18</sub> 1489.9234; found 1489.9232 (0.14 ppm).

**4.1.2.11. Ac-PK-c[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>3,7</sup>[EQSK]GI-NH<sub>2</sub> (7).** From 0.084 mmol of resin and after elongation, acetylation, cyclization and purification **7** was isolated (13.72 mg, 16% overall yield) as a white cotton-like solid.

HPLC (gradient 1): 11.94 min (96% analytical purity). HRMS (ESI,+) *m/z*: calculated for C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>N<sub>13</sub>O<sub>13</sub> 1021.5936; found 1021.5920 (1.49 ppm).

**4.1.2.12. Ac-PKI-c[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]<sup>4,8</sup>[EQSVK]I-NH<sub>2</sub> (8).** The general protocols were followed with 0.076 mmol of resin to give **8** as a white lyophilized cotton-like solid (19.52 mg, 24% overall yield).

HPLC (gradient 1): 6.13 min (95% analytical purity). HRMS (ESI,+) *m/z*: calculated for C<sub>49</sub>H<sub>85</sub>N<sub>13</sub>O<sub>13</sub> 1063.6397; found 1063.6390 (0.66 ppm).

The synthesis of linear precursors **14–19** is detailed in the Supporting information.

## 5. Circular dichroism (CD)

CD spectra were recorded in a Jasco 715 (CIB, CSIC) over the 200–260 nm range at 25 °C in a 1 mm path-length cuvette. 4 scans were acquired for each sample (0.5–1.0 mg/mL in 30% TFE/water) and the mean spectra were finally considered. The presence of TFE as a helix promoting solvent was necessary to increase the aqueous solubility of peptides. Results were analyzed using the Spectrum Measurement software (Jasco, Easton, MD, USA).

## 6. Molecular dynamics (MD) simulations

Models for all linear and lactam-bridged peptides **1–8** were built using the Cartesian coordinates of the  $\alpha$ -helix formed by residues Pro435-Met447 of monomer B of Li-TryR (PDB entry 2JK6) by introducing the covalent closure in the appropriate positions. In all cases, *N*- and *C*-terminal were defined as acetyl carbamate and carboxamide, respectively. All the systems were simulated in the same conditions as described previously [5]. Peptides **1–8** were introduced in a box of TIP3P waters using the tool *tleap*, integrated in the suite of programs AMBER 14.0 [31]. To do this, it was previously necessary to calculate the partial charges and force field parameters for the residues that participates in the lactam bridge: lysine (named as LYA) and glutamic acid (named as GLA). The cut-off distance for the nonbonded interactions was 12 Å and periodic boundary conditions were used. Electrostatic interactions were treated using the smooth particle mesh Ewald (PME) method with a grid spacing of 1 Å. The SHAKE algorithm was applied to all bonds involving hydrogen atoms and an integration step of 2.0 fs was used throughout. The system was progressively relaxed by energy minimizations, heated to 300K, and further simulated for a total time of 150 ns without any restraints, as described previously [9]. The



average degree of theoretical helicity per residue in 5–10 was assessed with the DSSP [32] algorithm along the course of 150-ns MD simulations at 300 K.

## 7. Protease susceptibility assays

Stock solutions of proteinase K were prepared in tris-buffered saline (TBS buffer) (50 µg/mL based on weight to volume). Stock solutions of the linear peptide **1** and the amide-bridge cyclic analogues **3** and **4** (100 µM) were prepared using 10% DMSO in TBS buffer (pH = 7.6, Aldrich). For the proteolysis reaction, the former peptide stock solutions (200 µL) were mixed with TBS (120 µL). Then, proteinase K stock solution (80 µL) was added (final concentration enzyme 10 µg/mL), the solution mixed, and finally allowed to proceed at room temperature with orbital shaking. Then, the enzymatic reaction was quenched (50 µL) at the desired time point (0, 5, 15, 30, 60, 180 and 360 min for linear peptide **1** and 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 540 min and 24 h for cyclic analogues **3** and **4** by addition of 1% TFA in water/acetonitrile 1:1 (100 µL). 100 µL of the resulting quenched reaction was injected onto an HPLC, and the amount of starting peptide present was quantified by integration of the peak at 214 nm. Triplicate reactions were run for each time point reported and half-lives were determined by fitting time dependent peptide concentration to an exponential decay using GraphPad Prism.

## 8. Li-TryR oxidoreductase activity

Oxidoreductase activity was determined according to the method described by Hamilton et al. [24]. Briefly, reactions were carried out at 26 °C (250 µL) of HEPES pH 8.0 (40 mM) buffer containing EDTA (1 mM), NADPH (150 µM), NADP<sup>+</sup> (30 µM), DTNB (25 µM), T[S]<sub>2</sub> (1 µM), glycerol (0.02%), DMSO (1.5%) and recombinant Li-TryR (7 nM). For IC<sub>50</sub> determinations (**1–8** and **14–19**) the enzyme was pre-incubated with the peptides (concentrations ranging from 75 µM to 0.29 µM) for 10 min prior the addition of T[S]<sub>2</sub> and NADPH. Enzyme activity was monitored by the increase in absorbance at 412 nm for 1 h at 26 °C in a VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, California, USA). All the assays were conducted in triplicate in at least three independent experiments. Data were analyzed using a non-linear regression model with the Graft6 software (Erithacus, Horley, Surrey, UK).

## 9. Dimer quantitation assay

The stability of the Li-TryR dimeric form in the presence of cyclic peptides **3–8** and linear prototypes **1** and **2** was evaluated using the novel Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) recently developed in our laboratory [9]. Briefly a dual (HIS/FLAG) tagged Li-TryR (400 nM) was incubated in a dimerization buffer (200 µL 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0) for 16 h at 37 °C with agitation and in a humid atmosphere in the presence of different peptide concentration (10–90 µM). Next the plates were washed ten times with TTBS (Tween 0.1%, 2 mM Tris, 138 mM NaCl 138 pH 7.6) and incubated with diluted monoclonal α-HIS HRP conjugated antibody (200 µL, Abcam, Cambridge, UK) in BSA (5%) in TTBS for 1 h at room temperature. The plates were washed once again as previously described and 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) substrate (100 µL, Dako, Glostrup, Denmark) prepared according to manufacturer's instructions was added. The enzymatic reaction was stopped after 10 min with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 µL, 0.5 M) and the absorbances were measured at 490 nm in a VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, California, USA). All the assays were conducted in triplicate in at least three independent experiments. Data were analyzed using a non-linear regression model with the

Graft6 software (Erithacus, Horley, Surrey, UK).

## 10. Cells and culture conditions

*L. infantum* axenic amastigotes were grown in M199 (Invitrogen, Leiden, The Netherlands) medium supplemented with 10% heat inactivated FCS, 1 g/L β-alanine, 100 mg/L L-asparagine, 200 mg/L saccharose, 50 mg/L sodium pyruvate, 320 mg/L malic acid, 40 mg/L fumaric acid, 70 mg/L succinic acid, 200 mg/L α-ketoglutaric acid, 300 mg/L citric acid, 1.1 g/L sodium bicarbonate, 5 g/L MES, 0.4 mg/L hemin, 10 mg/L gentamicine pH 5.4 at 37 °C. THP-1 cells were grown in RPMI-1640 medium (Gibco, Leiden, The Netherlands) supplemented with 10% heat inactivated FCS, antibiotics, 1 mM HEPES, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate, pH 7.2 at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

*L. infantum* promastigotes (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89) were grown in RPMI-1640 medium (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), antibiotics, and 25 mM HEPES (pH 7.2) at 26 °C.

## 11. Leishmanicidal activity and cytotoxicity assays

Drug treatment of amastigotes was performed during the logarithmic growth phase at a concentration of 1 × 10<sup>6</sup> parasites/mL at 37 °C for 24 h. Drug treatment of promastigotes was performed during the logarithmic growth phase at a concentration of 2 × 10<sup>6</sup> parasites/mL at 26 °C for 24 h. Drug treatment of THP-1 cells was performed during the logarithmic growth phase at a concentration of 4 × 10<sup>5</sup> cells/mL at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. LC<sub>50</sub> was evaluated by flow cytometry by the propidium iodide (PI) exclusion method [33]. After selection of the parasite population based on their forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) values, live and dead parasite cells were identified by their permeability to PI. This is a conservative procedure that may underestimate LC<sub>50</sub> values as parasites that became fragmented as a consequence of cell death are excluded from the analysis. To minimize the presence of fragmented parasites drug treatment never exceeded 24 h.

## Acknowledgements

We thank the Spanish Government (MINECO/FEDER Projects SAF2012-39760-C02 and SAF2015-64629-C2) and Comunidad de Madrid (BIPEDD-2-CM ref. S-2010/BMD-2457) for financial support.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.020>.

## References

- [1] Leishmaniasis, Fact Sheet N°375, February 2015. Available at: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- [2] Joo Hwan, No. visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries, *Acta Trop.* 155 (2016) 113–123.
- [3] K. Shahnawaz, K. Irfan, P.M.S. Chauhan, Antileishmanial chemotherapy: present status and future perspectives, *Chem. Biol. Interface* 5 (2015) 1–28.
- [4] J.N. Sangshetti, F.A. Kalam Khan, A.A. Kulkarni, R. Arote, R.H. Patil, Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years, *RSC Adv.* 5 (2015) 32376–32415.
- [5] (For a review see) a) V. Olin-Sandoval, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites, *Curr. Drug Targets* 11 (2010) 1614–1630; b) A.E. Leroux, R.L. Krauth-Siegel, Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy, *Mol. Biochem. Parasitol.* 206 (2016) 67–74.
- [6] a) R.H. Schirmer, J.G. Müller, R.L. Krauth-Siegel, Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and

- malaria, *Angew. Chem. Int. Ed.* 34 (1995) 141–154;
- b) R.L. Krauth-Siegel, H. Bauer, R.H. Schirmer, Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 690–715.
- [7] a) M.O.F. Khan, Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design, *Drug Target Insights* 2 (2007) 129–146;
- b) L.S.C. Bernardes, C.L. Zani, I. Carvalho, Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 2673–2696.
- [8] G. Colotti, P. Baiocco, A. Fiorillo, A. Boffi, E. Poser, F. Di Chiaro, A. Llari, Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs, *Future Med. Chem.* 15 (2013) 1861–1875.
- [9] M.A. Toro, P.A. Sánchez-Murcia, D. Moreno, M. Ruiz-Santaquiteria, J.F. Alzate, A. Negri, M.J. Camarasa, F. Gago, S. Velázquez, A. Jiménez-Ruiz, Probing the dimerization interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with site-directed mutagenesis and short peptides, *ChemBioChem* 14 (2013) 1212–1217.
- [10] P.A. Sánchez-Murcia, M. Ruiz-Santaquiteria, M.A. Toro, H. De Lucio, M.A. Jiménez, F. Gago, A. Jiménez-Ruiz, M.J. Camarasa, S. Velázquez, Comparison of hydrocarbon- and lactam- bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase, *RSC Adv.* 5 (2015) 55784–55794.
- [11] See for example N.E. Shepherd, H.N. Hoang, V.S. Desai, E. Letouze, P.R. Young, D.P. Fairlie, Modular  $\alpha$ -helical mimetics with antiviral activity against respiratory syncytial virus, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 13284–13289.
- [12] M.I. García-Aranda, Y. Mirassou, B. Gautier, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M.T. García-López, M.A. Jiménez, R. González-Muñiz, M.J. Pérez de Vega, Disulfide and amide-bridged cyclic peptide analogues of the VEGF(81–91) fragment: synthesis, conformational analysis and biological evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 7526–7533.
- [13] K.K. Khoo, M.J. Wilson, B.J. Smith, M.-M. Zhang, J. Gulyas, D. Yoshikami, J.E. Rivier, G. Bulaj, R.S. Norton, Lactam-stabilized helical analogues of the analgesic  $\mu$ -conotoxin KIIIA, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 7558–7566.
- [14] M.I. García-Aranda, S. González-López, C.M. Santiveri, N. Gagey-Eilstein, M. Reille-Seroussi, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M.T. García-López, M.A. Jiménez, R. González-Muñiz, M.J. Pérez de Vega, Helical peptides from VEGF and Vammin hotspots for modulating the VEGF–VEGFR interaction, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 1896–1905.
- [15] See for example recent reviews P.M. Cromm, J. Spiegel, T.N. Grossmann, Hydrocarbon stapled peptides as modulators of biological function, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 1362–1375.
- [16] See also L.D. Walensky, G.H. Bird, Hydrocarbon-stapled peptides: principles, practice, and progress, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6275–6288.
- [17] For reviews on covalent cyclization approach see for example ref. 17–19 C.J. White, A.K. Yudin, Contemporary strategies for peptide macrocyclization, *Nat. Chem.* 3 (2011) 509–524.
- [18] Y.H. Lau, P. de Andrade, Y. Wu, D.R. Spring, Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 91–102.
- [19] T.A. Hill, N.E. Shepherd, F. Diness, D.P. Fairlie, Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 13020–13041.
- [20] J. Zhu, R.E. Marchant, Solid-phase synthesis of tailed cyclic RGD peptides using glutamic acid: unexpected glutarimide formation, *J. Pept. Sci.* 14 (2008) 690–696.
- [21] P. Luo, R.L. Baldwin, Mechanism of helix induction by Trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water, *Biochemistry* 36 (1997) 8413–8421.
- [22] D. Roccatano, G. Colombo, M. Fioroni, A.E. Mark, Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 12179–12184.
- [23] M. Buck, Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins, *Q. Rev. Biophys.* 31 (1998) 297–355.
- [24] C.J. Hamilton, A. Saravanamuthu, I.M. Eggleston, A.H. Fairlamb, Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase, *Biochem. J.* 369 (2003) 529–537.
- [25] Some example of recent reviews ref. 25–27 J.D. Ramsey, N.H. Flynn, Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells, *Pharmacol. Ther.* 154 (2015) 78–86.
- [26] D.A. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications, *ACS Nano* 8 (2014) 1972–1994.
- [27] C. Bechara, S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587 (2013) 1693–1702.
- [28] J.R. Luque-Ortega, B.G. de la Torre, V. Hornillos, J.M. Bart, C. Rueda, M. Navarro, F. Amat-Guerri, A.U. Acuña, D. Andreu, L. Rivas, Defeating *Leishmania* resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy, *J. Control. Release* 161 (2012) 835–842.
- [29] M.A. Abengózar, J.R. Luque-Ortega, V. Hornillos, et al., Congreso II GEQB/XIV EPI, Bilbao (2013) P53.
- [30] H. Yamashita, Y. Demizy, T. Shoda, Y. Sato, M. Oba, M. Tanaka, M. Kurihara, Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 2403–2408.
- [31] D.A. Case, R.M. Betz, W. Botello-Smith, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York, P.A. Kollman, AMBER, University of California, San Francisco, 2016.
- [32] J. Klett, A. Núñez-Salgado, H.G. Dos Santos, A. Cortés-Cabrera, A. Perona, R. Gil-Redondo, D. Abia, F. Gago, A. Morreale, Mm-ismsa: an ultrafast and accurate scoring function for protein–protein docking, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (2012) 3395–3408.
- [33] J.F. Alzate, A. Arias, F. Mollinedo, E. Rico, J. de la Iglesia-Vicente, A. Jimenez-Ruiz, Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 3779–3792.