



CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba, 2019

Nuevos inhibidores de metaloaminopeptidasas M1 microbianas obtenidos mediante síntesis química

Jorge González Bacerio^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7155-9165>

Yanira Méndez Gómez² <https://orcid.org/0000-0003-2124-4912>

Daniel García Rivera² <https://orcid.org/0000-0002-5538-1555>

Maday Alonso del Rivero Antigua¹ <https://orcid.org/0000-0003-1988-6852>

Marcos Gazarini Dutra³ <https://orcid.org/0000-0002-3882-6831>

María de los Á. Chávez Planes¹ (jubilada)

Adriana K. Carmona³ <https://orcid.org/0000-0003-3311-5456>

¹ Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

² Centro de Estudio de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

³ Departamento de Biofísica, Universidad Federal de Sao Paulo. Sao Paulo, Brasil.

*Autor para la correspondencia: jogoba@fbio.uh.cu

RESUMEN

Palabras clave

agentes antibacterianos y antimaláricos; aminopeptidasas M1 microbianas; inhibidores sintéticos de aminopeptidasas; reacción de Ugi multicomponente

Introducción. Las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos convencionales constituyen un problema de salud mundial. Igualmente, el parásito causante de la malaria, principal enfermedad parasitaria tropical, ha desarrollado resistencia a los medicamentos tradicionales. En este sentido, las aminopeptidasas ePepN, de la bacteria *Escherichia coli*, y PfA-M1, del parásito *Plasmodium falciparum*, constituyen nuevos blancos en estas enfermedades. El objetivo de este trabajo fue la identificación de inhibidores sintéticos de ePepN y PfA-M1, con potencialidades como agentes antibacterianos y antimaláricos. **Métodos.** Mediante dos reacciones multicomponentes de Ugi se sintetizaron dos bibliotecas de 33 peptidomiméticos basados en la bestatina y la actinonina, y se evaluaron frente a PfA-M1. Además, se sintetizaron 22 peptidomiméticos tetrazoles, los cuales se evaluaron frente a ePepN. **Resultados.** Frente a esta enzima, se identificaron 3 tetrazoles (YTE003, YTE007 y YTE008) como inhibidores potentes y selectivos de ePepN, en comparación con la aminopeptidasa M1 porcina (APNp). El YTE003 presenta actividad antibacteriana *in vitro*, lo que refuerza sus potencialidades como compuesto líder en el campo de los agentes antibacterianos. Frente a PfA-M1, se identificó el compuesto KBE009 como un inhibidor potente, con actividad antimalárica *in vitro*, que no inhibe a la APNp a concentraciones de relevancia terapéutica, y no es citotóxico hasta 200 $\mu\text{mol/L}$ frente a la línea de células humanas HUVEC. Se comprobó que el KBE009 inhibe la actividad aminopeptidasa en el parásito íntegro y aislado en el mismo orden de magnitud que su actividad antimalárica *in vitro*. Estas propiedades permiten considerar al peptidomimético una molécula promisorio como compuesto líder contra la malaria.



New inhibitors of microbial M1 metallo-aminopeptidases obtained by chemical synthesis

ABSTRACT

Keywords

antibacterial and antimalarial agents; microbial M1 aminopeptidases; synthetic aminopeptidase inhibitors; Ugi-multicomponent reaction

Introduction. Infections by bacteria resistant to conventional antibiotics are a worldwide health problem. Likewise, the parasite causal agent of malaria, main tropical parasitic disease, has developed resistance to the traditional drugs. In this sense, aminopeptidases ePepN, from the bacterium *Escherichia coli*, and PfA-M1, from the *Plasmodium falciparum* parasite, are new targets in these sicknesses. The objective of this work was the identification of synthetic inhibitors of ePepN and PfA-M1, with potentialities as antibacterial and antimalarial agents. **Methods.** Using two multicomponent Ugi-reactions, two libraries of 33 bestatin- and actinonin-based peptidomimetics were synthesized and evaluated against PfA-M1. In addition, 22 tetrazole-peptidomimetics were synthesized and evaluated against ePepN. **Results.** Three tetrazoles (YTE003, YTE007, YTE008) were identified as potent and selective ePepN inhibitors, regarding porcine M1 aminopeptidase (pAPN). YTE003 shows *in vitro* antibacterial activity, which supports its potential as leader compound in the field of antibacterial agents. Toward PfA-M1, compound KBE009 was identified as a potent inhibitor, with *in vitro* antimalarial activity, that does not inhibit pAPN at concentrations of therapeutic relevance, and it is not cytotoxic up to 200 $\mu\text{mol/L}$ against the human HUVEC cell line. It was found that KBE009 inhibits AP activity in the whole and isolated parasite in the same order of magnitude as its *in vitro* antimalarial activity. These properties lead into considering the peptidomimetic a promising molecule as a lead compound against malaria.

INTRODUCCIÓN

La resistencia de las bacterias patógenas para los humanos, a los antibióticos convencionales, constituye uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad a nivel mundial.⁽¹⁾ Por otra parte, la malaria es la principal enfermedad parasitaria humana en las regiones tropicales, y su agente etiológico más letal es el protozoo *Plasmodium falciparum*.⁽²⁾ El desarrollo de nuevos agentes antibacterianos y antimaláricos potentes y selectivos, dirigidos contra nuevas dianas moleculares, es una necesidad urgente.⁽³⁾

Entre los procesos fisiológicos que resultan fundamentales para la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de los microorganismos, se encuentra la proteólisis.⁽⁴⁾ Es por ello que las proteasas bacterianas y de parásitos han atraído la atención de varios grupos de investigadores en los últimos años, en calidad de nuevas dianas para la búsqueda de inhibidores con efecto antibacteriano y antiparasitario, respectivamente.^(5,6) Entre las enzimas de este tipo que más se han estudiado para este fin, se encuentran las aminopeptidasas (AP) de tipo metalo pertenecientes a la familia M1 (APN).⁽⁷⁾ Dos APN microbianas que se consideran buenos blancos de inhibidores son la ePepN, de *Escherichia coli*, y PfA-M1, de *P. falciparum*.^(6,8)

La mayoría de los inhibidores potentes de estas APN, informados hasta la fecha y de origen sintético, son péptidos o peptidomiméticos.⁽⁹⁾ Las AP de tipo metalo se inhiben típicamente por la bestatina, un pseudopéptido natural, análogo

del estado de transición del mecanismo catalítico de estas enzimas, y la actinonina.^(10,11) Sin embargo, una desventaja clave para su uso terapéutico es su baja selectividad para la inhibición de las metalo-AP, ya que también inhiben a estas enzimas humanas.⁽¹²⁾ No obstante, las estructuras de la bestatina y la actinonina constituyen fuente de inspiración para el diseño de compuestos de naturaleza peptídica con vistas a potenciar los índices de actividad y selectividad frente a las metaloaminopeptidasas microbianas.⁽¹³⁾ Por otra parte, se ha informado actividad antimicrobiana frente a bacterias y protozoos patógenos para compuestos tetrazólicos.⁽¹⁴⁾

Las reacciones multicomponentes son procesos en los cuales se condensan tres o más moléculas (de forma simultánea o secuencial) para formar un producto que integra la mayoría de los átomos de los materiales de partida. Estas reacciones ofrecen ventajas como la generación de gran diversidad y complejidad estructural y en la actualidad se consideran poderosas herramientas para la generación de bibliotecas combinatorias.⁽¹⁵⁾ En este trabajo nos propusimos obtener por vía recombinante ambas enzimas. Además, se describe la síntesis de dos bibliotecas de 33 peptidomiméticos en total basados en las estructuras de la bestatina y la actinonina mediante reacciones multicomponentes, y 22 peptidomiméticos tetrazoles. También nos propusimos identificar en las bibliotecas de peptidomiméticos y tetrazoles inhibidores potentes y selectivos de la actividad de ePepN y PfA-M1, con potencia-

lidades para la obtención de estructuras líderes como agentes antibacterianos y antimaláricos.

MÉTODOS

- Síntesis de peptidomiméticos N-alquilados basados en la bestatina mediante la reacción de Ugi-4-componentes, y de compuestos inspirados en la actinonina mediante la reacción de Ugi 4-componentes 5-centros. Se realizó de acuerdo a Méndez *et al.* y González-Bacerio *et al.* ^(16,17)
- Síntesis multicomponente en fase sólida de peptidomiméticos tetrazoles mediante la reacción de Ugi-azida-4-componentes. Se realizó como se describe en Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾.
- Diseño, optimización, síntesis y clonación del gen *pfam1* en el vector de expresión en *Escherichia coli*. Se realizó de acuerdo a González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁹⁾.
- Expresión, purificación, identificación mediante métodos proteómicos y caracterización cinética de ePepN. La expresión y purificación de ePepN se realizó de acuerdo con Méndez *et al.* ⁽¹⁶⁾ y Larrea ⁽²⁰⁾. La identificación de la enzima mediante métodos proteómicos y la caracterización cinética de ePepN se realizó como se describe en Larrea ⁽²⁰⁾. La caracterización cinética de la inhibición por la bestatina se efectuó según Varela *et al.* ⁽²¹⁾.
- Expresión, purificación e identificación de PfA-M1 mediante *Western blot* y métodos proteómicos. Se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁹⁾
- Obtención de APNp. Se describe en Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Caracterización cinética de PfA-M1. El estudio del efecto de la concentración de Zn²⁺ sobre la actividad enzimática y la determinación del perfil de inhibición se describen en González-Bacerio *et al.* ⁽²²⁾ El estudio de pH óptimo y la determinación de los parámetros cinéticos se realizaron de acuerdo a González-Bacerio *et al.* ^(19, 22)
- Tamizaje de 22 peptidomiméticos tetrazoles sintéticos para la inhibición de ePepN. Se realizó según Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Tamizaje de 33 peptidomiméticos sintéticos N-alquilados basados en la bestatina y compuestos basados en la actinonina para la inhibición de PfA-M1. Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾
- Estudios de selectividad para la inhibición de ePepN por los tetrazoles en comparación con APNp. Se describe en Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Estudios de selectividad para la inhibición de PfA-M1 por KBE009 en comparación con APNp. Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾

- Caracterización cinética de la inhibición de ePepN por YTE008. Se realizó de acuerdo a Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Anclaje molecular *in silico* y simulaciones de dinámica molecular para el complejo YTE008-ePepN. Se realizó de acuerdo a Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Anclaje molecular *in silico* para el complejo KBE009-PfA-M1. Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾
- Ensayo cinético con sustratos fluorogénicos, *Plasmodium falciparum* 3D7 íntegro y aislado de los eritrocitos, y bestatina y los peptidomiméticos sintéticos (incluyendo KBE009). Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾
- Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Escherichia coli* de los tetrazoles. Se describe en Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Tamizaje de 33 peptidomiméticos sintéticos N-alquilados basados en la bestatina y compuestos basados en la actinonina para la inhibición de la proliferación *in vitro* de *Plasmodium falciparum* 3D7 y FcB1. Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾
- Determinación de la actividad hemolítica y citotóxica de los tetrazoles. Se efectuó de acuerdo a Méndez *et al.* ⁽¹⁸⁾
- Determinación de la actividad hemolítica de los peptidomiméticos N-alquilados basados en la bestatina y compuestos basados en la actinonina. Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾
- Determinación de la actividad citotóxica de KBE009 frente a células HUVEC. Se realizó como se describe en González-Bacerio *et al.* ⁽¹⁷⁾
- Determinación del efecto de la bestatina y los peptidomiméticos sintéticos (incluyendo KBE009) sobre la inhibición de la proliferación *in vitro* de una cepa transgénica de *Plasmodium falciparum* superproductora de PfA-M1. Se realizó de acuerdo a González-Bacerio *et al.* ⁽²³⁾

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de los peptidomiméticos basados en la bestatina, la actinonina y los tetrazoles

En la primera parte de este trabajo se describe la utilización de la reacción de Ugi-4-componentes (Ugi-4C) para la obtención de peptidomiméticos N-alquilados basados en la estructura peptídica de la bestatina (Figura 1). En este sentido, el diseño estuvo orientado a la conservación del grupo amino terminal de la bestatina, responsable de interacciones con varios residuos glutamato en los sitios activos de ePepN

y PfA-M1, así como a la introducción de cadenas laterales hidrofóbicas capaces de interactuar con los sub-sitios S1 y S1' de estas enzimas.^(24,25) Los compuestos diseñados son tripéptidos de tipo Phe-N(aa)-Leu, donde aa es la porción aminoacídica introducida durante la reacción de Ugi-4C. Estos compuestos son totalmente novedosos y pueden incluso conducir a nuevos modos de inhibición. Boc-fenil alanina y el metil éster de la leucina se emplearon como componentes ácido y amino, respectivamente. La naturaleza multicomponente de este proceso permite la introducción de elementos adicionales de diversidad, a partir de diferentes componentes carbonílicos e isonitrilos. Por otra parte, la reacción de Ugi-4C permite obtener péptidos N-sustituídos, que por lo general poseen mayor estabilidad metabólica y permeabilidad de membranas que las estructuras peptídicas análogas.⁽²⁶⁾

En una segunda aproximación, se decidió emplear la reacción de Ugi 4-componentes 5-centros (Ugi-5C-4C), para el diseño y obtención de compuestos inspirados en la actinonina (v. Fig. 1). Es necesario resaltar que hasta el presente gran parte de las estrategias para la obtención de análogos de este producto natural se basan en la introducción del grupo funcional ácido hidroxámico o ácido hidroxámico inverso, potentes ligandos bidentados frente al ion metálico de las dianas terapéuticas en cuestión.⁽¹⁵⁾ Es posible razonar que precisamente esta propiedad es la responsable de la baja selectividad inhibitoria reportada para la mayor parte de los compuestos de esta familia.⁽¹¹⁾ Por ello, la estrategia empleada en este trabajo se basó en la sustitución de este residuo por un ácido car-

boxílico. Esta reacción permite obtener pseudodipéptidos en los cuales es posible razonar la introducción de una amida secundaria a partir del ciclohexil isonitrilo, elegido como componente fijo con el objetivo de reproducir las propiedades estereo-electrónicas del residuo L-prolinol del inhibidor natural, y diferentes sustituyentes a partir del resto de los componentes (ej. α -amino ácido y compuesto carbonílico). L-Leu, L-Ile, L-Phe y L-Trp fueron seleccionados como amino ácidos, debido a que permiten la introducción de residuos hidrofóbicos voluminosos, que pueden proveer interacciones, antes descritas, con diversos residuos hidrofóbicos del sitio activo de las dianas terapéuticas en cuestión.

En tercer lugar, informamos la síntesis multicomponente en fase sólida de peptidomiméticos tetrazoles mediante la reacción de Ugi-azida-4-componentes (Ugi-azida-4C) con aminoácidos unidos a resina (fase sólida) (Figura 2). Atrajo nuestra atención la capacidad quelante de metales de los tetrazoles, además de que algunos han sido informados con actividad antimicrobiana contra bacterias y protozoos patógenos.⁽¹⁴⁾ Hipotetizamos que tetrazoles funcionalizados adecuadamente (con grupos funcionales hidrofóbicos y voluminosos capaces de unirse al centro activo de las metalo-AP) podrían inhibir ePepN mediante la quelación del catión Zn^{2+} . Se eligió este método porque proporciona un acceso eficiente a tetrazoles 1,5-disustituídos con tres sitios diferentes de generación de diversidad, surgiendo de los componentes amina, carbonilo e isocianida. Se seleccionaron aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas, como fenilalanina, tirosina

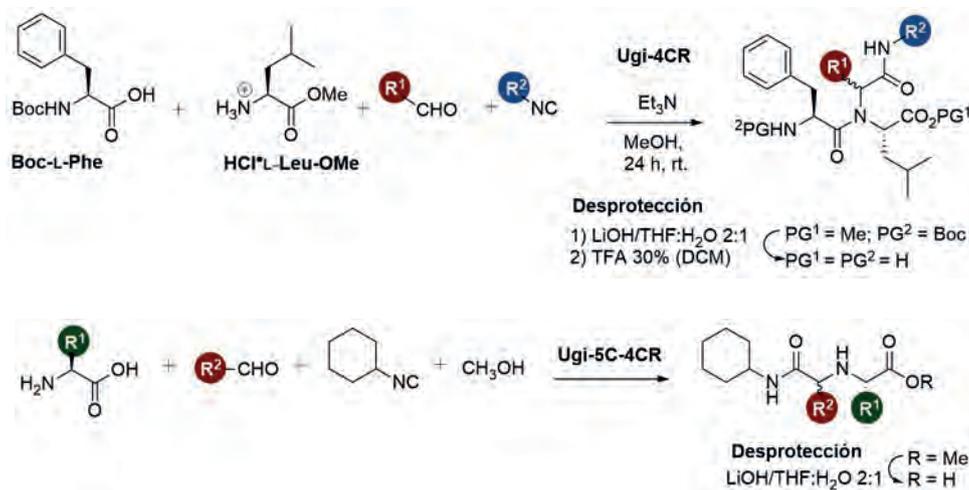


Fig. 1. Síntesis de análogos de la bestatina y la actinonina mediante las reacciones de Ugi 4-componentes y Ugi 4-componentes 5-centros.

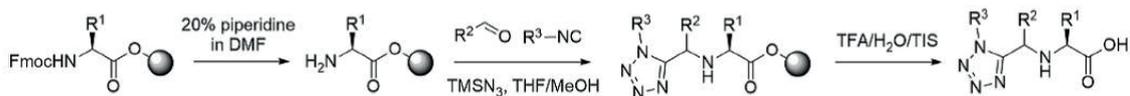


Fig. 2. Síntesis de peptidomiméticos tetrazoles mediante la reacción de Ugi-azida 4-componentes en fase sólida.

protegida con bencilo, triptófano y valina. Los componentes aldehído permitieron la incorporación de sustituyentes como 2-furilo, *p*-metoxifenilo, 3-piridilo y 2-imidazolilo.

Identificación de inhibidores potentes y selectivos de ePepN con actividad antibacteriana *in vitro*

Además, se sobreexpresó la enzima ePepNr en la bacteria *E. coli* BL21 Gold (DE3) a nivel de zaranda, a partir de una construcción genética (ADN plasmídico) adquirida por donación, mediante la inducción con IPTG 0,5 mmol/L, añadido en la fase exponencial tardía del crecimiento bacteriano, durante 14 h a 30°C. Este procedimiento permitió alcanzar un rendimiento volumétrico de 50 mg de proteína activa y soluble en el citosol por L de cultivo. Esta enzima se purificó mediante Cromatografía de Intercambio Iónico en la matriz Q-Sepharose Fast Flow. De esta manera, se obtuvo una preparación enzimática con un 85 % de pureza. La ePepNr purificada se identificó mediante la digestión triptica de las proteínas presentes en la banda del gel correspondiente a la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), y la posterior secuenciación de los péptidos resultantes mediante Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS). Los 16 péptidos secuenciados corresponden a la secuencia de la ePepN depositada en las bases de datos, y cubren el 25 % de esta secuencia.

Los valores de la constante de Michaelis-Menten aparente ($K_{M,ap}$) para la ePepNr, frente a los sustratos Ala- y Leu-pNA, coinciden con los informados por otros autores para esta enzima.⁽²⁷⁾ Se determinó experimentalmente que la bestatina presenta un tipo de inhibición reversible no competitivo ($\alpha > 1$) o mixto frente a la ePepNr. De 22 peptidomiméticos tetrazoles sintéticos evaluados en un tamizaje frente a la ePepNr, se identificaron tres (YTE003, YTE007, YTE008) que inhiben a la enzima con valores de $IC_{50} < 2 \mu\text{mol/L}$ (Figura 3). Además, estos 3 compuestos son altamente selectivos para la inhibición de la enzima bacteriana en comparación con la enzima ortóloga porcina (APNp). El YTE008 es un inhibidor no competitivo ($\alpha < 1$) de ePepN, y YTE003 tiene actividad antibacteriana *in vitro* ($IC_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$ a 3 y 6 h de exposición; $IC_{50} < 100 \mu\text{mol/L}$ a 20 h (Fig. 3). Este último tetrazol presenta potencialidades para la obtención de una nueva estructura líder para el desarrollo de agentes antibacterianos.

Se predijo mediante anclaje molecular *in silico* y simulaciones de dinámica molecular que el YTE008 tiene un probable modo de unión al centro activo de ePepN basado en interacciones hidrofóbicas, que no involucra su interacción con el catión Zn^{2+} (Figura 4). Este inhibidor no interactúa con ningún residuo perteneciente al sitio de unión del sustrato, lo que permite la unión simultánea del inhibidor y el sustrato. Sin

embargo, interactúa con una tirosina crítica para la catálisis, lo cual es consistente con el modo de unión no competitivo.

Ninguno de los tres compuestos (YTE003, YTE007, YTE008) es un potente agente hemolítico (YTE008 100 $\mu\text{mol/L}$: 15% hemólisis a las 20 h; YTE003 y YTE007 100 $\mu\text{mol/L}$: 40% hemólisis a las 20 h) o citotóxico (células de mieloma murino P3X63Ag; YTE008: no disminuye significativamente la viabilidad celular a las 20 h; YTE003 a 6 y 20 h: $IC_{50} = 100 \mu\text{mol/L}$; YTE007 a 20 h: $IC_{50} = 100 \mu\text{mol/L}$).

Identificación de inhibidores potentes y selectivos de PfA-M1 con actividad antimalárica *in vitro*

Se diseñó un gen codificador de la enzima PfA-M1 fusionada a una cola de histidinas, el cual se optimizó para su expresión en *E. coli*. Como resultado de la optimización, el Índice de Adaptación de Codones para el sistema *E. coli* se incrementó desde 0,65, en el gen nativo, hasta 0,96, en el gen modificado. Además, el contenido promedio de G/C aumentó desde 26,36 %, en el gen natural, hasta 39,28 %, en el gen optimizado. El gen optimizado de la PfA-M1 se sintetizó y clonó en un vector plasmídico de expresión en *E. coli*, mediante la contratación de los servicios de la compañía alemana GeneArt.

Se expresó la enzima PfA-M1r en la bacteria *E. coli* BL21 a nivel de zaranda mediante la inducción con IPTG 1 mmol/L, añadido en la fase exponencial tardía del crecimiento bacteriano, durante 18 h a 37°C. Este procedimiento permitió alcanzar un rendimiento volumétrico de 100 mg de proteína activa y soluble en el citosol por L de cultivo. El método de inducción mencionado anteriormente permite obtener un mayor nivel de expresión (PfA-M1r constituye el 19 % de las proteínas en el extracto soluble de la bacteria) y rendimiento volumétrico que la inducción con IPTG 0,1 mmol/L, añadido al comienzo del cultivo, y la autoinducción con lactosa 0,2 %. Se determinó que el tiempo de inducción óptimo para la producción de la enzima recombinante es 18 h, y que dos ciclos de ultrasonido es la cantidad óptima para la extracción de la PfA-M1r a partir de las células de la bacteria.

Se seleccionó el Co^{2+} como catión metálico divalente para la purificación de la PfA-M1r mediante Cromatografía de Afinidad con Ion Metálico Inmovilizado (IMAC). Este catión permite obtener una proteína más pura, en comparación con el Ni^{2+} y el Cu^{2+} . Además, se seleccionó 50 mmol/L como la concentración óptima de imidazol para la elución de la proteína recombinante adsorbida a la matriz de Co^{2+} . Se purificó la PfA-M1r a partir del extracto proteico soluble de la bacteria, mediante IMAC en una matriz con Co^{2+} inmovilizado, con un rendimiento final de 24 mg de proteína activa por L de cultivo. De esta manera, se obtuvo una preparación enzimática

con un 97 % de pureza. Se identificó la PfA-M1r purificada, así como productos de degradación de la proteína recombinante en la preparación purificada, mediante un Western-blot con un anticuerpo anti-cola de histidinas. La PfA-M1r purificada y su principal producto de degradación se identificaron además mediante LC-MS/MS, a partir de los péptidos trípticos derivados de ambas bandas proteicas en el gel de la SDS-PAGE. Todos los péptidos secuenciados corresponden a la secuencia de la PfA-M1 depositada en las bases de datos, y cubren el 69 y el 25 % de esta secuencia, en cada caso. Ninguno de los péptidos secuenciados corresponde a la secuencia de la APN endógena de *E. coli*, ePepN, por lo que esta última no es un contaminante apreciable de la PfA-M1r purificada, proteína cuya masa molecular coincide con la de la ePepN.

La PfAM1r purificada no se activó por ZnCl₂ en el intervalo 10 nmol/L - 1 μmol/L, y se inhibe a concentraciones del catión mayores de 1 μmol/L. Esto indica que es innecesario añadir el Zn²⁺ a la preparación enzimática para los ensayos de actividad. Se determinó que el pH óptimo para la actividad AP de la PfA-M1r, frente al sustrato cromogénico Leu-pNA y a los sustratos fluorogénicos Ala-, Leu-, Arg- y Met-AMC, es 7,2-7,4. Este valor coincide con el informado en la literatura para la PfA-M1 nativa. Se determinaron los parámetros cinéticos de la PfA-M1r con los sustratos cromogénicos Ala-, Leu-, Arg- y Lys-pNA. La especificidad de sustrato de la AP, para aminoácidos neutros y básicos en el extremo amino, coincide con la informada previamente por otros autores.⁽²⁸⁾ Se determinaron los parámetros cinéticos de la PfA-M1r con los sustratos fluorogénicos Ala-, Leu-, Arg- y Met-AMC. Los valores de K_{M,ap} obtenidos son cercanos a los informados previamente por otros autores para la PfA-M1 nativa.⁽²⁹⁾ Además, la especificidad de sustrato también coincide con la informada con anterioridad para esta APN.⁽²⁸⁾ Se comprobó que la PfA-M1r es insensible al PMSF, el E64 y la pepstatina A: inhibidores típicos de proteasas de tipo serino, cisteíno y aspártico, respectivamente. En cambio, la enzima recombinante se inhibió por la amastatina: inhibidor de AP de tipo metalo; y la 1,10-fenantrolina: compues-

to que inhibe a las proteasas de tipo metalo; y la bestatina: inhibidor de AP de tipo metalo neutras y básicas.⁽¹⁰⁾

De 33 peptidomiméticos sintéticos evaluados en un tamizaje inicial frente a la PfA-M1r y cultivos eritrocíticos de *P. falciparum* 3D7 (sensible a la cloroquina), se identificaron 5 que inhiben a la enzima y la proliferación *in vitro* del parásito en un 45 % o más, a 20 y 25 μmol/L de los compuestos, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron frente a la cepa FcB1 del parásito (resistente a la cloroquina). Se comprobó que ninguno de estos 5 peptidomiméticos, a 25 μmol/L, promueve la pérdida de la integridad celular de los eritrocitos. De los 5 peptidomiméticos seleccionados, se identificó el compuesto KBE009 (Fig. 3), mediante estudios de dosis-efecto, como un inhibidor potente (submicromolar) de la PfA-M1r (IC₅₀ = 0,8 μmol/L), cuya actividad antimalárica *in vitro* frente a *P. falciparum* 3D7 es tan potente como la de la bestatina (IC₅₀ = 18 vs. 21 μmol/L, respectivamente). De modo notable, el KBE009 presenta la misma potencia para la actividad antimalárica frente a la cepa FcB1 del parásito (IC₅₀ = 16 μmol/L). Utilizando el mismo procedimiento, se comprobó que este peptidomimético no inhibe a la APNp, a concentraciones de relevancia terapéutica. Además, el KBE009 no es citotóxico, hasta la concentración de 200 μmol/L, frente a la línea de células humanas HUVEC. Con este trabajo se aporta una nueva molécula al reducido grupo de inhibidores conocidos de la PfA-M1 que tienen potencialidades para la obtención de estructuras líderes contra la malaria.

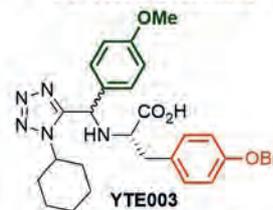
Se predijo, mediante simulaciones de anclaje molecular *in silico*, que el modo de unión del KBE009 a la PfA-M1 se basa en interacciones hidrofóbicas y en la complementariedad geométrica entre el inhibidor y el centro activo de la AP, sin coordinar al ion Zn²⁺ de la enzima (Figura 5). Estas interacciones hidrofóbicas son similares a las descritas por otros autores para otros inhibidores de la AP.⁽¹³⁾ Además, la selectividad de la inhibición de la PfA-M1r pudiera explicarse por la menor complementariedad geométrica y cantidad de interacciones hidrofóbicas entre el KBE009 y el centro activo de la APNp.

Análogos de la bestatina



KBE009
 PfA-M1 (IC₅₀ = 0.8 μmol/L)
P. falciparum 3D7 (IC₅₀ = 18 μmol/L)
 similar a bestatina (IC₅₀ = 21 μmol/L)
 APNp (no inhibe a concentraciones
 de relevancia terapéutica)
 células HUVEC (no citotóxico)

Derivados tetrazólicos



YTE003
 ePepN (IC₅₀ = 1.4 μmol/L)
 APNp (IC₅₀ = 1580 μmol/L)
E coli a 3 y 6 h de exposición (IC₅₀ < 50 μmol/L)
 % de hemólisis a 100 μmol/L (40 % a las 20 h)
 células P3X63Ag (IC₅₀ 100 μmol/L a las 6 y 20 h)

Fig. 3. Análogo de la bestatina y tetrazol con actividad inhibitoria de metaloamino-peptidasas microbianas y potencialidades como agentes antimaláricos y antibacterianos.

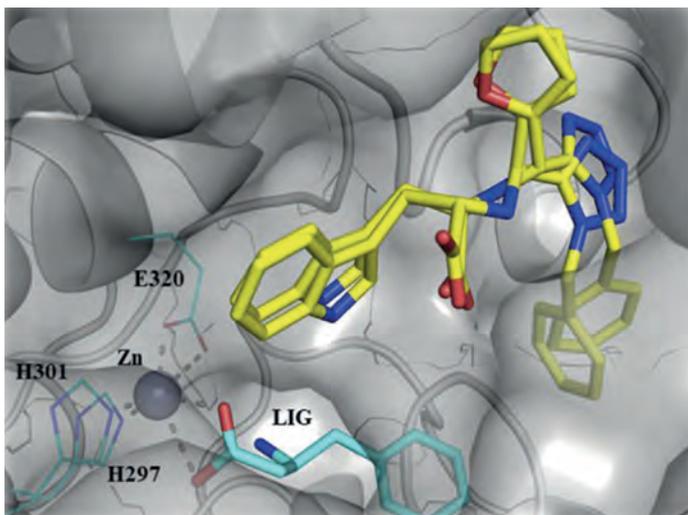


Fig. 4. Modo de unión predicho para el complejo ePepN-YTE008. Superposición de los complejos modelados de los isómeros R y S del inhibidor en un diagrama de superficie del centro activo de ePepN. YTE008 y el inhibidor tipo sustrato L-β-HPheAla se muestran en representación de varillas. Código de colores: carbonos en amarillo (YTE008) y azul claro (L-β-HPheAla), oxígenos en rojo, nitrógenos en azul oscuro. El átomo de Zn²⁺ se representa como una esfera gris.

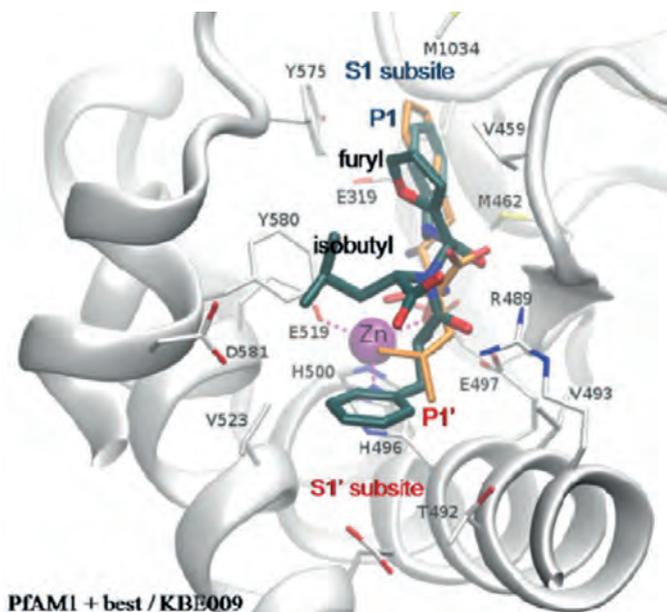


Fig. 5. Simulaciones de anclaje molecular *in silico* para la unión del KBE009 y la bestatina al centro activo de PfA-M1. Solo se representa un diastereómero del KBE009 (verde) (la unión de ambos isómeros es similar). La bestatina (best) se muestra en naranja. La coordinación del Zn²⁺ se representa con líneas discontinuas.

Este novedoso modo de interacción difiere del informado para el resto de los inhibidores potentes y selectivos conocidos de esta APN.⁽²⁵⁾

Se validó un ensayo cinético con los sustratos fluorogénicos Ala- y Leu-AMC, *P. falciparum* 3D7 íntegro y aislado de

los eritrocitos como fuente de la PfA-M1 nativa, y la bestatina como inhibidor de esta enzima. La bestatina inhibe la actividad AP endógena frente a ambos sustratos con una potencia (expresada como un intervalo) similar a la mostrada para la inhibición de la PfA-M1r (IC₅₀ <0,31 μmol/L). Otros autores han informado una potencia similar para la inhibición de la actividad AP de tipo metalo neutra en extractos del parásito.⁽³⁰⁾ En cambio, la actividad AP endógena, medida en el presente trabajo con el sustrato Arg-AMC en el parásito íntegro y aislado, se inhibió solo en un 50 % en presencia de bestatina 160 μmol/L. Se comprobó que el KBE009 inhibe la actividad AP en el parásito íntegro y aislado, frente a los sustratos Ala- y Leu-AMC, con valores de IC₅₀ de 82 y 27 μmol/L, respectivamente. Estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que la IC₅₀ del KBE009 para la actividad antimalárica *in vitro* (18 μmol/L). La actividad AP endógena también la inhiben los peptidomiméticos con actividad antimalárica *in vitro* AL005, YAN005 y KBE021, no seleccionados por su baja selectividad para la inhibición de la PfA-M1r, pero utilizados como controles positivos en este experimento a 25 μmol/L. Consistentemente, el compuesto KBE003, débil inhibidor de la PfA-M1r y potente antimalárico, empleado como control negativo a 200 μmol/L, no inhibe la actividad AP endógena de tipo PfA-M1 (frente al sustrato Ala-AMC).

Se observó que la resistencia de una cepa transgénica de *P. falciparum* 3D7, que sobreexpresa el gen de la enzima PfA-M1, al efecto antimalárico del KBE009, es aproximadamente 42 veces mayor que la de *P. falciparum* 3D7 salvaje. Esta resistencia diferencial es de más de 88, 6, 37 y 17 veces frente a los compuestos controles: bestatina, AL005, YAN005 y KBE021, respectivamente. El mismo procedimiento se ha empleado previamente por otros autores para establecer que la PfA-M1 es una diana del efecto antimalárico de la bestatina y otro compuesto.⁽³¹⁾ Estas evidencias indican que el efecto antimalárico *in vitro* del KBE009 y la inhibición de la PfA-M1 nativa por este compuesto están relacionados. Esto permite clasificar al peptidomimético como uno de los pocos inhibidores de la PfA-M1 cuyo mecanismo de acción para la actividad antimalárica se ha relacionado experimentalmente con la inhibición de dicha AP.

Conclusiones

En este trabajo se obtuvieron por vía recombinante dos APNs microbianas, ePepN y PfA-M1, con características cinéticas similares a las de las enzimas nativas, lo que las faculta como dianas para la identificación de inhibidores. Utilizando reacciones multicomponentes de Ugi, se sintetizaron 33 peptidomiméticos basados en la bestatina y la actinonina, y 22 peptidomiméticos tetrazoles, y se evaluaron frente a ambas

APNs, identificándose dos compuestos, uno con actividad frente a ePepNr y cultivos de *E. coli*, y uno frente a PfA-M1r y cultivos de *P. falciparum*. Estos compuestos constituyen potenciales estructuras líderes a partir de las cuales es posible obtener agentes antibacterianos y antimaláricos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pathak A, Marothi Y, Kekre V, et al. High prevalence of extended spectrum β -lactamase-producing pathogens results of a surveillance study in two hospitals in Ujjain, India. *Infect Drug Resist* 2012;5:65-73.
2. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, et al. Malaria. *Lancet* 2005;365:1487-1498.
3. Scholz T, Heyl C, Bernardi D, et al. Chemical, biochemical and microbiological properties of a brominated nitrovinylfuran with broad-spectrum antibacterial activity. *Bioorg Med Chem* 2012;21:795-804.
4. Kaman W, Hays J, Endtz H et al. Bacterial proteases: targets for diagnostics and therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:1081-1087.
5. Chandu D, Nandi D. PepN is the major aminopeptidase in *Escherichia coli*: insights on substrate specificity and role during sodium-salicylate-induced stress. *Microbiology* 2003;149:3437-3447.
6. Harbut MB, Velmourougane G, Dalal S, et al. Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:E526-E534.
7. Drinkwater N, Lee J, Yang W, et al. M1 aminopeptidases as drug targets: broad applications or therapeutic niche? *FEBS J* 2017;12:3218-3221.
8. Chandu D, Kumar A, Nandi D. PepN, the major Suc-LLVY-AMC-hydrolyzing enzyme in *Escherichia coli*, displays functional similarity with downstream processing enzymes in Archaea and Eukarya. *J Biol Chem* 2003;278:5548-5556.
9. Flipo M, Beghyn T, Leroux V, et al. Novel selective inhibitors of the zinc plasmodial aminopeptidase PfA-M1 as potential antimalarial agents. *J Med Chem* 2007;50:1322-1334.
10. Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, et al. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 1976;29:97-99.
11. Mucha A, Drag M, Dalton J, et al. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie* 2010;92:1509-1529.
12. Scornik O, Botbol V. Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr Drug Metab* 2001;2:67-85.
13. Velmourougane G, Harbut MB, Dalal S, et al. Synthesis of new (-)-bestatin-based inhibitor libraries reveals a novel binding mode in the S1 pocket of the essential malaria M1 metalloaminopeptidase. *J Med Chem* 2011;54:1655-1666.
14. Cano PA, Islas-Jácome A, Rangel-Serrano Á, et al. In vitro studies of chromone-tetrazoles against pathogenic protozoa, bacteria, and fungi. *Molecules* 2015;20:12436-12449.
15. Thormann M, Almstetter M. Method of preparation of bioisosteres of actinonin of interest as metalloproteinase inhibitors. *WO 2004099124* 2004.
16. Méndez Y, Pérez-Labrada K, González-Bacerio J, et al. Combinatorial multicomponent access to natural-products-inspired peptidomimetics: Discovery of selective inhibitors of microbial metallo-aminopeptidases. *ChemMedChem* 2014;9:2351-2359.
17. González-Bacerio J, Maluf SEC, Méndez Y, et al. KBE009: An antimalarial bestatin-like inhibitor of the *Plasmodium falciparum* M1 aminopeptidase discovered in an Ugi multicomponent reaction-derived peptidomimetic library. *Bioorg Med Chem* 2017;25:4628-4636.
18. Méndez Y, De Armas G, Pérez I, et al. Discovery of potent and selective inhibitors of the *Escherichia coli* M1-aminopeptidase via multicomponent solid-phase synthesis of tetrazole-peptidomimetics. *Eur J Med Chem* 2019;163:481-499.
19. González-Bacerio J, Osuna J, Ponce A, et al. High-level expression in *Escherichia coli*, purification and kinetic characterization of *Plasmodium falciparum* M1-aminopeptidase. *Protein Expr Purif* 2014;104:103-114.
20. Larrea C. Identificación de peptidomiméticos inhibidores de la aminopeptidasa neutra M1 de *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura en Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2015.
21. Varela AC, Pérez I, De Armas G, et al. Structure-activity relationship of the inhibition of M1-aminopeptidases from *Escherichia coli* (ePepN) and *Plasmodium falciparum* (PfA-M1) by bestatin-derived peptidomimetics. *Rev Cub Cien Biol* 2019;7:1-21.
22. González-Bacerio J, Carmona AK, Gazarini ML, et al. Kinetic characterization of recombinant PfAM1, a M1-aminopeptidase from *Plasmodium falciparum* (Aconoidasida: Plasmodiidae), using fluorogenic peptide substrates. *Rev Cub Cien Biol* 2015;4:40-48.
23. González-Bacerio J. KBE009: peptidomimético inhibidor potente y selectivo de la aminopeptidasa M1 de *Plasmodium falciparum* con actividad antimalárica in vitro. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2015.
24. Adlagatta A, Gay L, Matthews BW. Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* suggests a compartmentalized, gated active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13339-13344.
25. McGowan S, Porter CJ, Lowther J, et al. Structural basis for the inhibition of the essential *Plasmodium falciparum* M1 neutral aminopeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:2537-2542.
26. Patch JA, Kirshenbaum K, Seuryneck SL, et al. Pseudo-peptides in drug discovery (Ed.: Nielsen PE), Wiley-VCH, Weinheim, 2004, pp. 1-31.
27. Golich F, Han M, Crowder M. Over-expression, purification, and characterization of aminopeptidase N from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2006;47:634-639.
28. Poreba M, McGowan S, Skinner-Adams TS, et al. Fingerprinting the substrate specificity of M1 and M17 aminopeptidases of human malaria, *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 2012;7:e31938.
29. Allary M, Schrével J, Florent I. Properties, stage-dependent expression and localization of *Plasmodium falciparum* M1 family zinc-aminopeptidase. *Parasitology* 2002;125:1-10.
30. Skinner-Adams TS, Peatey CL, Anderson K, et al. The aminopeptidase inhibitor CHR-2863 is an orally bioavailable inhibitor of murine malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3244-3249.
31. Skinner-Adams TS, Stack CM, Trenholme KR, et al. *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: New targets for anti-malarials. *Trends Biochem Sci* 2010;35:53-61.

Recibido: 23 de abril de 2020
Aprobado: 30 de mayo de 2020

Conflictos de interés: No hay conflictos de intereses.

Contribución de autoría:

1. Conceptualización: Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua
2. Curación de datos: Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua
3. Análisis formal: Jorge González Bacerio, Yanira Méndez Gómez, Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua
4. Adquisición de fondos: Jorge González Bacerio, Yanira Méndez Gómez, Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua, Marcos Gazarini Dutra
5. Investigación: Jorge González Bacerio, Yanira Méndez Gómez
6. Metodología: Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua, Marcos Gazarini Dutra, María de los Á. Chávez Planes, Adriana K. Carmona
7. Administración del proyecto: Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua, Marcos Gazarini Dutra
8. Recursos: Daniel García Rivera, Marcos Gazarini Dutra, Adriana K. Carmona
9. Software: -
10. Supervisión: Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua, Marcos Gazarini Dutra
11. Validación: Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua
12. Visualización: Jorge González Bacerio, Yanira Méndez Gómez
13. Redacción – borrador original: Jorge González Bacerio, Yanira Méndez Gómez
14. Redacción – revisión y edición: Jorge González Bacerio, Yanira Méndez Gómez, Daniel García Rivera, Maday Alonso del Rivero Antigua

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS), proyectos F/4730-1 y F/4730-2 otorgados a JGB; el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Mexicano (CONACyT), proyecto J000.0453 México-Cuba 2009-2011; las becas 811.06.03 de la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México (2010) y de la Universidad de las Naciones Unidas, Programa de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe (UNU-BIOLAC) (2012) para JGB; el proyecto asignado a JGB y asociado al Programa Nacional de Ciencias Básicas (2018-2021); el proyecto 169/12 de la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) - Ministerio de Educación Superior (MES, Cuba) a MGD y MAdRA; los proyectos FAPESP (2009/54598-9, 2011/14403-4, 2013/12913-0; Brasil) a MGD; el proyecto CNPq (482400/2013-7; Brasil) a AKC; y el proyecto BMBF (CUB17WTZ-068, Alemania). YMG agradece a la DAAD (Alemania) por la beca de doctorado, DGR a la Fundación Alexander von Humboldt (Alemania) por la beca de Investigador Experimentado y JGB a CAPES (Brasil) por la beca de doctorado. Los autores agradecen al Laboratorio Multiusuario (INFAR), UNIFESP, Brasil, por los ensayos de citometría de flujo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a las siguientes personas de diferentes instituciones y países, sin las cuales hubiera sido imposible la realización de este trabajo: Jean-Louis Charli Casalonga, Sarah E.C. Maluf, Alexandre Budu, Pollyana M.S. Melo, Ernesto Moreno Frías, Mario E. Valdés Tresanco, German De Armas Guitart, Idalia Pérez Leyva, Amaia Ponce de la Cal, Karell Pérez Labrada, Joel Osuna Quintero, Katherine Figarella Araujo, Rafael Fando Calzada, Isabelle Florent, Gilberto Valdés García, Alberto del Monte Martínez, Pedro A. Valiente Flores, Carmen Soto Febles, Lena M. de León Esperón, Dagmara Díaz Díaz, Emir Salas Sarduy, Maikel Izquierdo Rivero, Abel Regalado Calderín, Jorge Valdés Hernández, Victoria Lugo Hernández, Fidelia Romero Arteaga, Annamil Álvarez Trotta, Juliana Conrado Ferreira, Anett Rubio Torres, Sandra Madariaga Zarza, Mirtha Aguado Casas, Ana Claudia Varela López, Tamara Rojas Núñez, Yoanna M. Álvarez Ginarte, Aldrin V. Vasco, William L. Scott, Bernhard Westermann, Anthony Adltagatta, Laritza Rojas.

