

Recibido: 30 September 2014

Aceptado: 4 November 2014

EXPLORACIÓN DE COMPUESTOS EXTRAÍDOS DE «MALARIA BOX» COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Esqué Englund, Frans¹

Departament de Fisicoquímica

Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona

Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona

Abstract

The search for new therapeutic strategies against malaria includes the possibility of finding a selective inhibitor of the *Plasmodium falciparum* Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) enzyme, competitive with Glucose 6-Phosphate (G6P) but not for NADP⁺, with a significant selectivity toward the *Plasmodium* enzyme relative to the human counterpart. Structural models of the *P. falciparum* G6PD have reflected that this hypothetical inhibitor should have a positive charge at physiological pH.

Malaria Box is a database of 400 candidate compounds to be antimalarial drugs. Among them, 80 compounds comprising *Plate A* have a higher *in vitro* efficacy. From all stereoisomers of these compounds, using computational tools, we will make a selection of those with positive charge at pH=7.4. Then, the rDock program has been used to perform molecular *docking* to the G6P binding cavity in *Plasmodium* enzyme. Such screening has allowed to eliminate compounds with poor properties as binders, while the binding of the rest has been checked visually using the PyMOL engine.

The results have led to the identification of five compounds as potential candidates with inhibitory activity toward G6PD, MMV665831 being the most relevant one.

Keywords: Malaria box, Plate A, *Plasmodium Falciparum*, PyMOL Glucose-6-phosphate-dehydrogenase inhibition.

Resumen

La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas contra la malaria incluye la posibilidad de hallar un inhibidor selectivo de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de *Plasmodium falciparum*, caracterizado por una inhibición competitiva respecto a la glucosa 6-fosfato (G6P) pero no respecto al NADP⁺, así como con una significativa selectividad hacia el enzima de *Plasmodium* comparada con el enzima humano. Los modelos estructurales de la G6PD de *P. falciparum* han reflejado que este hipotético inhibidor debería tener carga positiva a pH fisiológico.

La Malaria Box es una base de datos de 400 compuestos candidatos a ser fármacos antimaláricos. Entre ellos, el *Plate A* comprende 80 compuestos con mayor eficacia *in vitro*. A partir de todos los estereoisómeros de cada uno de dichos compuestos se ha examinado un conjunto de aquellos con carga positiva a pH = 7,4. Mediante el programa rDock, se ha llevado a cabo el *docking* de dichos compuestos en el centro de unión de G6P del enzima de *Plasmodium*. Tras dicho cribado, que ha permitido descartar aquellos ligandos inadecuados para interaccionar en el sitio de unión de G6P, el resto ha sido valorado mediante inspección visual de sus interacciones con los residuos del centro de unión mediante el programa PyMOL.

Los resultados han permitido identificar cinco compuestos como posibles candidatos con potencial actividad inhibidora, destacando entre ellos el compuesto MMV665831.

Palabras clave: Malaria Box. Plate A, *Plasmodium falciparum*, PyMOL Inhibidores de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

¹ Graduat en Farmàcia (fransesque@hotmail.com)

Resum

La recerca de noves estratègies terapèutiques contra la malària inclou la possibilitat de trobar un inhibidor selectiu de la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) de *Plasmodium falciparum*, caracteritzat per una inhibició competitiva respecte a la glucosa 6-fosfat (G6P) però no respecte del NADP⁺, així com amb una selectivitat significativa cap a l'enzim de *Plasmodium* comparada amb l'enzim humà. Els models estructurals de la G6PD de *P. falciparum* han reflectit que aquest hipotètic inhibidor hauria tenir càrrega positiva a pH fisiològic.

La Malaria Box és una base de dades de 400 compostos candidats a ser fàrmacs antimalàrics. Entre aquests, el Plate A comprèn 80 compostos amb eficàcia més elevada in vitro. A partir de tots els estereoisòmers de cadascun d'aquests compostos s'ha examinat un conjunt d'aquells amb càrrega positiva a pH = 7,4. Mitjançant el programa rDock s'ha dut a terme el *docking* d'aquests compostos al centre d'unió de G6P l'enzim de *Plasmodium*. Després d'aquest cribratge, que ha permès descartar aquells lligands inadequats per interaccionar en el lloc d'unió de G6P, la resta ha estat valorat mitjançant inspecció visual de les seves interaccions amb els residus del centre d'unió mitjançant el programa PyMOL. Els resultats han permès identificar cinc compostos com a possibles candidats amb potencial activitat inhibidora, dels quals destaca el compost MMV665831.

Paraules clau: Malaria Box. Plate A, *Plasmodium falciparum*, PyMOL, inhibidors de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

1. Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria que afecta al ser humano y tiene un enorme impacto sanitario. De acuerdo con las últimas estimaciones de la OMS, más de 500 millones de individuos padecen la enfermedad cada año, con cerca de 2,7 millones de muertos, la mayoría de ellos niños. Aunque la malaria supone un importante problema a escala global, solo un pequeño número de nuevos fármacos han sido recientemente desarrollados como entidades químicas ciertamente novedosas. Por desgracia, la toxicidad acumulada de muchos fármacos antimaláricos y la amplia extensión de la resistencia del parásito a los antimaláricos de primera y segunda generación (como cloroquina, primaquina o mefloquina) han disminuido la eficacia de la terapia farmacológica. Además, las crecientes resistencias a los fármacos antimaláricos de uso actual, como la artemisina y sus derivados, demuestran la facilidad con que el parásito puede desarrollar resistencias (Kim, 2013).

A pesar del progreso efectuado descifrando el genoma completo de diversas especies de *Plasmodium* y el continuo esfuerzo invertido en el desarrollo de vacunas eficaces, recientemente muchos informes han constatado la necesidad de centrar la investigación en el ciclo vital del parásito y su desarrollo en el huésped para proporcionar la base de tratamientos prometedores y que tengan un coste económicamente efectivo y sostenible (Callaway, 2007; Lorenz, 2011). En este contexto, uno de los rasgos característicos de la infección es que *Plasmodium* se multiplica en los glóbulos rojos del huésped con la generación de estrés oxidativo. En ese punto, la vía de las pentosas fosfato, tanto del huésped como del parásito, son cruciales para neutralizar las especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante el NADPH generado en la conversión de glucosa 6-fosfato a ribulosa 5-fosfato por tres enzimas: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Además, en el parásito la vía de las pentosas fosfato también contribuye a la síntesis de ácidos nucleicos y ácidos grasos (Mason, 2007).

Son diversas las evidencias que han señalado que la actividad de la vía de las pentosas fosfato es crucial durante la infección eritrocítica. Así, se ha observado que la defi-

ciencia en G6PD alcanza niveles polimórficos en poblaciones de áreas donde la malaria es endémica, seleccionando y protegiendo contra la malaria a los individuos deficientes en G6PD (Guindo, 2007). Además, en los eritrocitos infectados, la actividad de la vía de las pentosas fosfato se incrementa 78 veces, principalmente debido a la vía de las pentosas fosfato del parásito (Atamna, 1994). Finalmente, la G6PD y la 6PGL parecen desempeñar un papel metabólico esencial en el ciclo eritrocítico del parásito, ya que el silenciamiento génico transitorio causa la detención de su ciclo biológico en la etapa de trofozoíto e incrementa la formación de gametocitos (Crooke, 2006; Preuss, 2012).

La G6PD de *P. falciparum* tiene 911 residuos, con una extensa porción del extremo C-terminal (residuos 311 a 911) claramente homóloga a la G6PD de otras especies, tanto eucariotas como procariotas. El resto de la proteína corresponde a un fragmento adicional de 300 residuos en el extremo N-terminal. Se ha comprobado que esta porción N-terminal de la G6PD de *P. falciparum* es la que contiene la actividad 6PGL, dejando propiamente la actividad G6PD en la porción C-terminal. Es pues un enzima bifuncional, G6PD-6PGL, únicamente encontrado en este parásito (Preuss, 2012; Jortzik, 2011).

Los modelos estructurales de la G6PD humana y de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* están disponibles en el Protein Data Bank (PDB) (Clarke, 2001; Naylor, 1996). Han sido utilizados por el equipo de investigación coordinado por el Dr. F. Javier Luque para construir un modelo en 3D de la G6PD de *P. falciparum*, mediante modelado por homología. Inesperadamente, la comparación entre el enzima humano y el de *P. falciparum* puso en evidencia la existencia en este último de una mutación significativa en la cavidad del sustrato (glucosa 6-fosfato), que debería alterar tanto la forma como la polaridad del sitio de unión. Los cribados farmacológicos efectuados para caracterizar la actividad de un hipotético inhibidor de la G6PD de *P. falciparum* han llevado a dos conclusiones:

- a) Podría diseñarse un inhibidor de la actividad G6PD del enzima bifuncional de *P. falciparum* que a su vez fuese un muy leve inhibidor de la G6PD humana.
- b) Tal inhibidor sería competitivo respecto a la glucosa 6-fosfato y no competitivo respecto al NADP⁺.

En definitiva, estas evidencias revelan el papel esencial de la G6PD en el ciclo vital de *Plasmodium* y proporcionan la base teórica para los beneficios terapéuticos potenciales que podrían originarse a partir del desarrollo de inhibidores selectivos de la G6PD de *Plasmodium*.

2. Objetivos

La enzima G6PD es una diana terapéutica de suma relevancia por dos motivos. Primero, representa un enzima clave de cara a profundizar en los mecanismos bioquímicos que regulan el ciclo de vida de *Plasmodium*. Segundo, la existencia de diferencias estructurales con respecto al enzima humano abre la puerta al diseño de inhibidores selectivos, permitiendo abordar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la malaria.

En este contexto, el objetivo de este trabajo será comprobar si los compuestos del Plate A de la Malaria Box (base de datos con 400 posibles candidatos a ser fármacos antimaláricos) se acoplan a la cavidad de unión a la glucosa 6-fosfato del enzima de *P. falciparum*. En caso afirmativo, ello permitiría identificar un compuesto precursor para el desarrollo de fármacos de elevada afinidad y selectividad.

Para ello emplearemos un programa de *docking* molecular, rDock, tras haber realizado un cribado de los compuestos de la Malaria Box basándonos en dos criterios. En primer lugar, la actividad antimalárica del compuesto experimentada in vitro y, en segundo lugar, su carga electrostática, pues se ha comprobado en modelos estructurales computacionales que este hipotético inhibidor selectivo de la G6PD de *P. falciparum* debería ser un compuesto con carga positiva a pH fisiológico.

3. Material y métodos

La metodología que se ha utilizado consta de cuatro elementos principales:

- **Malaria Box:** Base de datos que contiene los posibles candidatos a ser inhibidores de G6PD.
- **Marvin:** Paquete informático mediante el cual transformaremos los compuestos de la Malaria Box codificados en SMILES a estructuras bidimensionales para conocer la molécula y al mismo tiempo evaluar su carga, tautómeros y estereoisómeros.
- **rDock:** Paquete informático utilizado para realizar el *docking*, es decir, el proceso por el cual se intenta encontrar puntos de anclaje, de interacción atractiva, entre una molécula (ligando) y una región de una macromolécula (dominio de una proteína en este caso), dando como resultado una sucesión de posibles soluciones, cada una de ellas con una puntuación en función del estado energético de la unión ligando-receptor.
- **PyMOL:** Programa informático cuya finalidad básica es visualizar en 3 dimensiones cómo las soluciones obtenidas mediante el *docking* pueden encajar en la cavidad de la proteína o dominio de unión al ligando.

3.1. Malaria Box

En 1999, en Suiza, se crea la organización sin ánimo de lucro: Medicines for Malaria Venture (MMV), patrocinada tanto por entidades gubernamentales de distintos países como por entidades privadas. A lo largo de sus quince años de existencia, MMV ha ido creciendo y recogiendo información sobre posibles candidatos a ser fármacos con actividad antimalárica. Esto se ha traducido en la llamada «Malaria Box», una lista de 400 compuestos actualizada anualmente. Para poder ser incluido en la Malaria Box, un compuesto debe:

- Haber probado ser eficaz in vitro contra los trofozoítos sanguíneos de la cepa 3D7 (sensible a cloroquina pero resistente a sulfadoxina), utilizando la cloroquina y la artemisina como controles positivos. La eficacia se expresa en función de la EC_{50} (concentración a la que se consigue el 50% de su efecto máximo).
- Haber probado no ser citotóxico sobre la línea de cultivo celular HEK-293 (células de riñón de embrión humano), utilizando la puromicina como control positivo (Duffy, 2012)

La Malaria Box se presenta en forma de archivo Excel con 400 compuestos candidatos a ser fármacos antimaláricos y donde se expone para cada uno de ellos toda una serie de datos, que entre otros incluye:

- Número de identificación particular para la MMV
- Estructura del compuesto expresada en formato SMILES
- EC₅₀ contra la cepa 3D7 de *P. falciparum*
- Código de identificación del compuesto según la base de datos ChEMBL (gestionada por el European Bioinformatics Institute)
- Compañía farmacéutica que aporta la identidad del compuesto

La tabla completa y actualizada de la Malaria Box es accesible en el link:

<http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/RandD/MalariaBox-400compoundsAPRIL2013.xls>

A su vez, esta lista de 400 compuestos está dividida en cinco *Plates*, de 80 compuestos cada uno: *Plate A*, *Plate B*, *Plate C*, *Plate D* y *Plate E*. En este trabajo nos centraremos en el *Plate A*, por ser el conjunto de compuestos con actividad antimalárica más potente in vitro.

3.2. Marvin

Marvin es un conjunto de programas informáticos desarrollados por la empresa ChemAxon con el objetivo de facilitar el diseño virtual de fármacos. El paquete básico consta de cuatro programas:

- **MarvinSketch:** editor para dibujar estructuras químicas.
- **MarvinSpace:** permite la visualización en 3 dimensiones de macromoléculas: proteínas y ácidos nucleicos.
- **MarvinView:** Permite la visualización tanto en 2 como en 3 dimensiones de moléculas relativamente sencillas. Concretamente, es ideal para visualizar los ligandos. Además, partiendo de la molécula con su código SMILES, permite obtener la proporción a pH = 7,4 de cada uno de sus estados de ionización y tautómeros, al poder calcular los valores de pKa de cada heteroátomo de la molécula (básicamente N y O). Fue esencial en el cribado inicial de compuestos, para seleccionar aquellos con carga positiva a pH fisiológico.
- **Structure Checker:** Herramienta para corregir los errores en las construcciones químicas o detectar dónde están situados determinados elementos estructurales.

De los cuatro programas adquiridos, fueron utilizados principalmente **MarvinView**, fundamental para la primera parte del trabajo, y también **MarvinSpace**, como complemento a PyMOL en la segunda parte del trabajo.

3.3. rDock

Partimos de una macromolécula que presenta una zona a la que se unirán los ligandos que vamos a estudiar. Esta macromolécula puede ser una proteína o un ácido nucleico, sin embargo, en el caso que nos ocupa nos vamos a centrar en las proteínas.

El *docking* es un método de encaje y predicción de afinidad que, partiendo de una posición inicial del ligando, identifica un mínimo *local* de la función energía potencial del complejo ligando-receptor.

Para ello es necesario definir una cavidad que limitará la zona de búsqueda por parte del *docking*. Hay dos métodos para definir esta cavidad. El más sencillo y que es el que hemos empleado es el *método del ligando de referencia*. Primero debemos concretar cuál será este ligando de referencia, que, en general, corresponde al ligando natural del receptor o enzima que queremos evaluar. En nuestro caso, la proteína será G6PD y el ligando de referencia será glucosa 6-fosfato. La cavidad donde se efectuará el *docking* vendrá definida a partir de la posición conocida del ligando de referencia en la proteína. La cavidad consistirá en el volumen accesible dentro de una distancia específica al ligando de referencia. Es decir, para cada átomo del ligando de referencia se construye una esfera de un radio fijo R centrada en ese átomo. Se efectúa la reunión de todas las esferas para cada átomo del ligando de referencia y se excluye la intersección entre dicha reunión y el espacio ocupado por la proteína. El resultado será la cavidad en la que se efectuará el *docking*. El programa (perteneciente al paquete rDock) que construirá la cavidad será el **rbcavity**.

A continuación se preparan los ligandos con los que se efectuará el *docking*. Se llevará a cabo con el programa **LigPrep**, que consiste en un pre-procesado de los ligandos, para asignarles una estructura en 3D con la topología correcta, órdenes y ángulos de enlace correctos, conformaciones de baja energía (en especial con los anillos flexibles), etc.

Ahora llevaremos a cabo el *docking* propiamente dicho, mediante el programa **rb-dock**. Partiendo de una posición inicial del ligando, se lleva a cabo un proceso iterativo que finaliza cuando la función de puntuación o SCORING alcanza un mínimo *local*. Esta función se denotará S^{total} y se define como la suma ponderada de las funciones: S^{inter} , S^{intra} , S^{site} y $S^{\text{restraint}}$, que evalúan diferentes factores que influyen en la estabilidad del ligando en su posición. En particular:

- S^{inter} : cuantifica la energía potencial de la unión proteína-ligando (o RNA-ligando). Representa el sumando con más peso específico de S^{total} , pues evalúa el componente energético más importante: el que atañe a las interacciones entre el ligando y la macromolécula.
- S^{intra} : cuantifica el cambio en la energía del ligando relativa a los cambios conformacionales que sufre desde el momento en que se introduce en la cavidad (al inicio del proceso iterativo) hasta que se alcanza el mínimo local.
- S^{site} : cuantifica la energía de las regiones flexibles del sitio de unión al ligando en la proteína (o RNA). En nuestro caso, los únicos enlaces flexibles en el sitio de unión al ligando serán: el O-H del hidroxilo y los N-H de la amina primaria protonada $-\text{NH}_3^+$.
- $S^{\text{restraint}}$: conjunto de funciones de restricción no ligadas a ningún elemento físico que pueden ser usadas para desviar el cálculo del *docking* de varias formas útiles, ejerciendo así una influencia sobre las soluciones finales.

Cada vez que termina el proceso iterativo porque se ha alcanzado un mínimo *local* de la función S^{total} , este valor se guardará como el SCORE asociado a la solución obtenida por el *docking*, que es la posición que ha acabado ocupando el ligando (Ruiz-Carmona, 2014).

Fijamos un número máximo N de soluciones para el *docking*, es decir, N posiciones del ligando, cada una asociada a un SCORE (mínimo *local* de la función S^{total}). A continuación un simple comando nos permitirá ordenar todos estos SCOREs, empezando por el

más negativo. Tendremos una lista ordenada que empezará con el mínimo *absoluto* obtenido de la función S^{total} (SCORE más favorable), seguido del resto de mínimos *locales* de S^{total} (el resto de SCOREs).

Con esto finalizará el proceso del *docking*, aunque debemos remarcar que no siempre la solución con el SCORE más favorable será aquella que nos servirá. Hay otros factores que deben tenerse en cuenta (como, por ejemplo, el conocimiento de las interacciones que estamos buscando), y no siempre acabaremos escogiendo la óptima desde un punto de vista estrictamente energético.

3.4. PyMOL

PyMOL es un programa para la visualización molecular en 3 dimensiones tanto de macromoléculas (como nuestra proteína G6PD) como de ligandos relativamente sencillos. Presenta una diversidad muy amplia de opciones a la hora de dar la imagen visual de cualquier estructura química, caracterizando parámetros geométricos del complejo ligando-proteína. Gracias a ello, podremos intentar reconocer el conjunto de interacciones que modulan la unión del ligando, proporcionando elementos para juzgar la bondad del *docking*.

4. Resultados

4.1. Selección de los compuestos de Malaria Box

La base de datos Malaria Box reúne una lista de 400 compuestos obtenidos mediante síntesis química que han probado su efectividad como agentes antimaláricos, si bien no se ha identificado su mecanismo de acción, incluyendo la(s) posible(s) diana(s) que regula su actividad.

De cara a examinar la posibilidad de que alguno de dichos compuestos pudiese ejercer su acción antimalárica a través de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de *Plasmodium falciparum*, se planteó realizar un estudio de *docking* con el objeto de determinar posibles compuestos con capacidad de interaccionar en el centro de unión de la glucosa-6-fosfato (G6P). Ello obedece a estudios previos realizados en el grupo, que han mostrado una diferencia significativa entre los enzimas de *Plasmodium* y humanos, lo que implicaría la existencia de una carga neta positiva en la estructura química de un hipotético inhibidor competitivo de G6PD.

Basándonos en el requisito de carga indicado anteriormente, se efectuó un primer cribado de los compuestos incluidos en Malaria Box. Mediante el programa MarvinView se seleccionaron solo aquellos compuestos cuya forma mayoritaria a pH = 7,4 tuviese carga positiva, incluyendo también aquellos con carga positiva en proporción no mayoritaria, pero aun así relevante. Ello condujo a un listado de 156 compuestos, que incluía 121 cuya forma mayoritaria a pH = 7,4 tenía carga positiva, así como 35 con carga positiva en una proporción relevante aunque no mayoritaria.

La base de datos Malaria Box solo define los compuestos en función de su código SMILES, que no distingue entre los diferentes estereoisómeros. Esto significa que los anteriores 156 compuestos representaban un número mayor de estructuras, pues para cada uno de ellos debemos considerar todos sus estereoisómeros. De hecho, si estos se incluyen, la lista anterior pasa a ser de aproximadamente 700 compuestos. El aún exce-

sivo número de compuestos candidatos nos llevó a la necesidad de efectuar cribados adicionales.

Un criterio adicional de cara a la selección de los compuestos es su actividad, expresada como EC_{50} , que permitió subdividir los compuestos de Malaria Box en 5 subconjuntos o *Plates*, de los cuales el *Plate A* englobaba los compuestos más potentes. Seleccionando de la lista anterior tan solo aquellos pertenecientes al *Plate A*, la lista se reduce a 36 compuestos (Tabla 1), que representan un total de 55 estructuras cuando se tienen en cuenta sus estereoisómeros.

Tabla 1. Selección de los compuestos del *Plate A* con carga positiva a pH = 7,4

Compuesto	SMILES	Carga	Población
Especie predominante con carga positiva			
MMV019406	<chem>CCC1(C)CC(CCNCC2CCCC2O)(CCO1)c3ccc(C)cc3</chem>	+1	84,057%
		0	15,863%
MMV006278	<chem>CCC1=C(C)C(=N)c2cccc2N1C</chem>	+1	99,999%
MMV020439	<chem>CCn1c(CN2CCN(Cc3cccc3)CC2)nc4cc(NC(=O)c5cccs5)ccc14</chem>	+1	74,139%
MMV396672	<chem>C(F)(F)(F)c(cc1)ccc1C(=O)NCC(N2CCCCC2)c(ccs3)c3</chem>	+1	91,001%
MMV008416	<chem>CCCC1=C(CC)C(=N)c2cccc2N1C</chem>	+1	99,999%
MMV006203	<chem>Cc1cc(NCCN2CCCC2)c3ccc4cccc4c3n1</chem>	+2	54,671%
		+1	41,915%
MMV020549	<chem>CC1CCN(Cc2ccc(NC(=O)c3cc4ccc5ccnc5c4[nH]3)cc2)CC1</chem>	+1	98,105%
MMV000448	<chem>CN(C)CCCNc1c2cccc2nc3cccc13</chem>	+2	97,465%
MMV020500	<chem>CNCCCNc1ccnc2cc(Cl)ccc12</chem>	+1	55,144%
		+2	44,704%
MMV020788	<chem>Oc1cccc1CNCC23CC4CC(CC(C4)C2)C3</chem>	+1	84,427%
		0	15,504%
MMV665785	<chem>CC(C)(C)c1ccc(O)c(CNC2CCCCC2)c1</chem>	+1	89,706%
		0	10,226%
MMV006172	<chem>CN1CCN(CC1)c2ccc(Nc3c4cccc4nc5cccc35)cc2</chem>	+2	73,504%
		+1	19,214%
		+1	5,751%
MMV006087	<chem>c(c(ccn1)NCCN(CC)CC)(ccc(Cl)c2)c12</chem>	+1	59,632%
		+2	39,349%
MMV006455	<chem>CCCN(CCC)CC(O)COC1CCCC1C(=O)Nc2cccc2</chem>	+1	99,598%
MMV665782	<chem>COC1ccc2nccc(C(O)C3CC4(CCN3CC4)C=C)c2c1</chem>	+1	96,787%
MMV009063	<chem>OC(CNC1CCCCC1)Cn2c3cccc3c4cccc24</chem>	+1	99,845%
MMV396703	<chem>c12c(ncnc1NCCN(CC)CC)c3c(ccc(Cl)c3)[nH]2</chem>	+1	98,765%
MMV020548	<chem>CCN1CCN(Cc2ccc(NC(=O)c3cc4ccc5ccnc5c4[nH]3)cc2)CC1</chem>	+1	67,084%
		+1	25,865%
MMV008956	<chem>CCOc1cc2CCNC(c3cc(OC)c(O)cc3Cl)c2cc1OCC</chem>	+1	59,202%
MMV396693	<chem>[n+](C)c2c(cccc2)nc(ccc(NCCO)c3)c13</chem>	+1	99,606%
Especie con carga positiva relevante, pero no mayoritaria			
MMV019871	<chem>Fc1ccc2[nH]c3c(NCCCN4CCOCC4)ncnc3c2c1</chem>	+1	37,628%
MMV008138	<chem>c12c(CC(C(O)=O)NC1c3ccc(Cl)cc3Cl)c4c(cccc4)[nH]2</chem>	0	58,098%
MMV665831	<chem>CCOC(=O)c1c(NC(=O)c2cccc2)sc3c(O)c(CN(CC)CC)ccc13</chem>	0	89,029%
		+1	9,744%
MMV665841	<chem>CCCc1cc(O)c2C3=C(CN(C)CC3)C(=O)Oc2c1</chem>	+1	20,355%
		0	14,923%
MMV006861	<chem>C1CN(CCO1)c2ccc(Nc3ccnc4cc5cccc5cc34)cc2</chem>	+1	34,206%

4.2. Docking de los compuestos seleccionados

El *docking* de las 55 estructuras generadas a partir de los 36 compuestos de la Tabla 1 se realizó con el programa rDock. Tal como se indicó en «Materiales y métodos», para cada ligando se obtiene una serie de soluciones (*pose*) junto a su correspondiente puntuación o *score*. Para el análisis de los resultados, se seleccionaron aquellas estructuras cuyas 5 primeras soluciones tengan una puntuación inferior a -25. Esta condición redujo el número de estructuras a la mitad, quedando limitada a 28.

Una de las características del hipotético inhibidor selectivo de la G6PD de *P. falciparum* es que debe ser competitivo respecto a G6P. Al visualizar mediante PyMOL las soluciones del *docking* obtenidas para cada una de estas 28 estructuras, observamos que 12 de ellas tienen prácticamente todas sus soluciones fuera del sitio de unión de la G6P. Ello indica que, independientemente del efecto que pueda provocar su unión a la proteína, difícilmente pueden ser inhibidores competitivos respecto a la G6P. Por ello, tras eliminarlas, quedan 16 estructuras, que corresponden a 11 ligandos diferentes (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de estructuras seleccionadas tras el análisis de *docking* del centro de unión de G6P. Se incluye la puntuación obtenida para las 10 primeras soluciones de cada estructura. También se incluyen las soluciones obtenidas para G6P, considerado como ligando de referencia.

	G6P	MMV006172.1	MMV006203.2	MMV006861	MMV008138.2
1	-36.499	-30.956	-31.988	-31.791	-28.910
2	-35.580	-30.854	-31.866	-30.689	-27.956
3	-34.484	-30.538	-31.774	-29.871	-27.802
4	-34.278	-30.464	-31.702	-29.384	-27.795
5	-33.284	-30.067	-31.574	-29.365	-27.652
6	-32.956	-29.968	-30.655	-29.020	-27.628
7	-32.518	-29.929	-30.503	-28.800	-27.614
8	-32.443	-29.819	-29.895	-28.715	-27.537
9	-32.325	-29.710	-29.280	-28.692	-27.384
10	-32.285	-29.564	-28.909	-28.418	-26.795

	MMV008138.3	MMV008138.4	MMV009063.1	MMV009063.2	MMV020439
1	-31.664	-29.514	-26.912	-31.704	-31.432
2	-30.960	-29.388	-26.591	-31.094	-29.887
3	-27.054	-29.294	-26.388	-28.808	-29.458
4	-27.000	-28.923	-26.062	-27.618	-28.581
5	-26.754	-28.909	-25.637	-27.379	-26.180
6	-26.741	-28.787	-25.186	-27.007	-25.947
7	-26.684	-28.786	-25.141	-26.170	-25.226
8	-26.620	-28.688	-24.898	-24.985	-24.472
9	-26.398	-28.677	-24.826	-24.382	-23.745
10	-26.333	-27.701	-24.808	-24.331	-23.742

	MMV020548.1	MMV020548.2	MMV020549.1	MMV020788.1	MMV665831.1
1	-29.605	-29.596	-28.864	-30.736	-43.151
2	-28.568	-27.067	-28.686	-30.080	-42.805

3	-27.818	-26.989	-28.217	-27.020	-42.375
4	-27.251	-26.567	-27.674	-26.302	-42.152
5	-27.235	-26.083	-26.855	-26.246	-40.757
6	-26.557	-25.874	-26.568	-26.124	-40.571
7	-26.372	-25.501	-25.832	-25.600	-40.309
8	-25.970	-25.456	-25.540	-25.428	-40.230
9	-24.878	-25.344	-25.442	-25.160	-39.181
10	-24.802	-25.220	-25.092	-25.091	-39.125

	MMV665831.2	MMV665841.1
1	-48.574	-28.679
2	-45.727	-28.334
3	-44.236	-27.388
4	-43.951	-27.282
5	-43.722	-27.144
6	-43.529	-27.042
7	-43.420	-26.658
8	-43.397	-25.552
9	-43.032	-25.353
10	-43.018	-24.983

Cabe indicar que el *docking* de G6P, utilizado como compuesto de referencia, condujo a una solución satisfactoria, por cuanto refleja la orientación encontrada en la estructura cristalográfica disponible para G6PD de *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 1) (Ruiz-Carmona, 2014). Por otra parte, la puntuación obtenida (-36.499) puede utilizarse como una referencia para valorar la puntuación de las estructuras ensayadas como potenciales inhibidores.

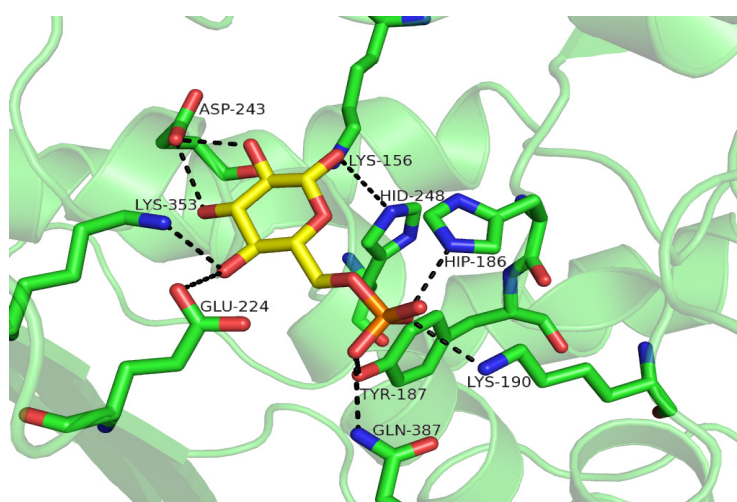


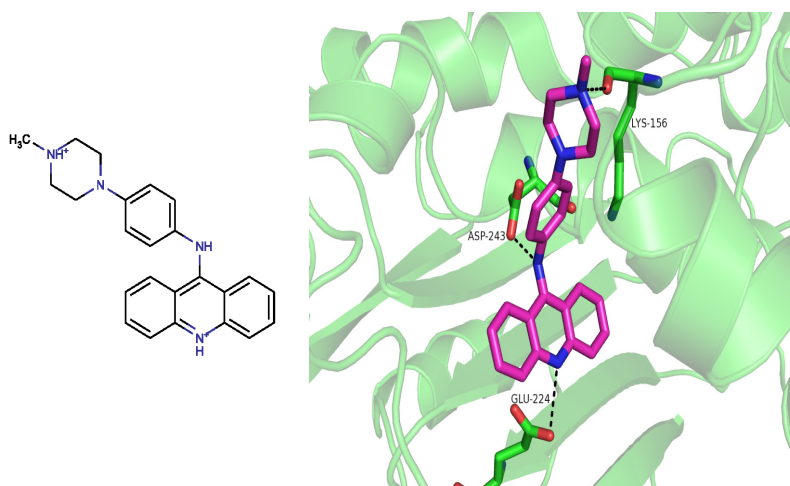
Figura 1. Interacciones entre la G6P y la G6PD.

Con respecto a las estructuras extraídas de Malaria Box, tan solo en 3 de ellas hemos escogido como óptima aquella solución con una puntuación más favorable, des-

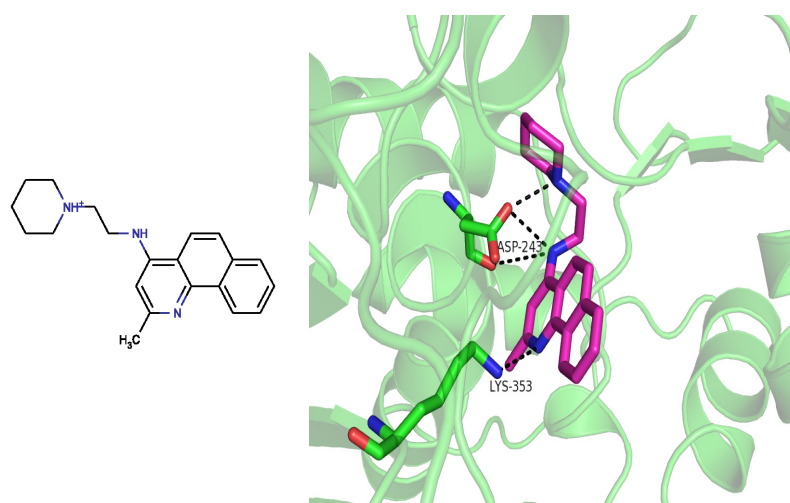
pués de haber inspeccionado visualmente su interacción en el centro de unión de G6P. En las 13 restantes hemos escogido una solución asociada a una puntuación inferior. Ello obedece al hecho de que las funciones de puntuación empleadas en los métodos de *docking* tienen una precisión limitada debido a su carácter empírico, siendo necesario validar mediante inspección visual la estructura más representativa. Así, en algunos casos las soluciones con mejor puntuación presentaban la estructura, bien fuera del sitio de unión de la G6P, o bien aparentemente con escasas interacciones atractivas con los residuos del dominio de unión a la G6P.

La Figura 2 muestra la disposición de las 16 estructuras indicadas en la Tabla 2 en el centro de unión de G6P, remarcando las interacciones de puente de hidrógeno establecidas entre ligando y receptor.

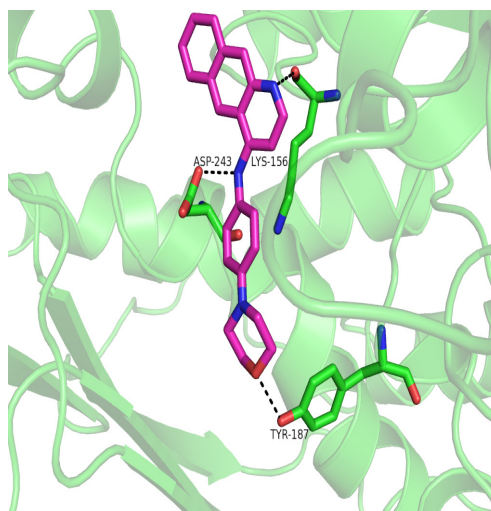
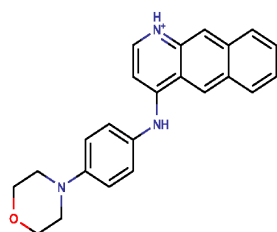
MMV006172.1



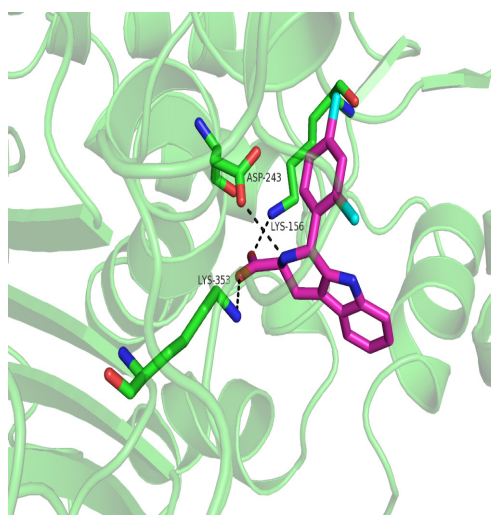
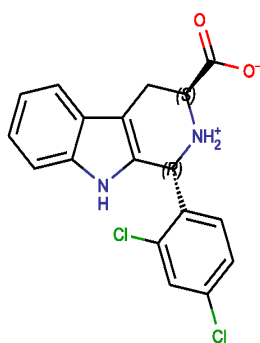
MMV006203.2



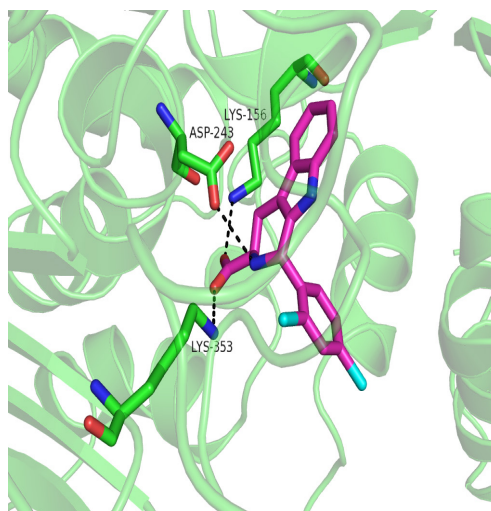
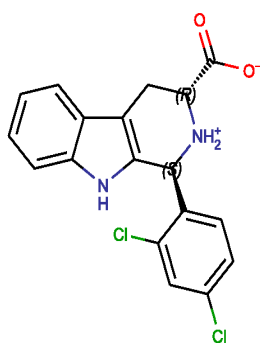
MMV006861



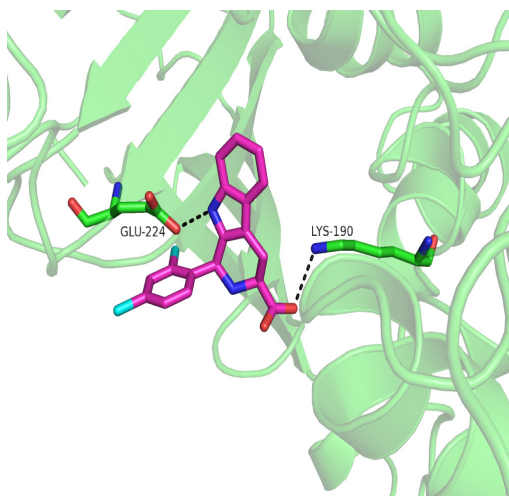
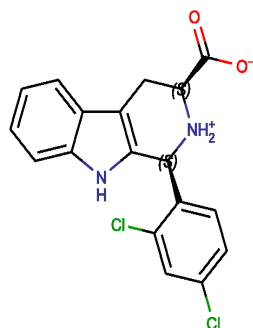
MMV008138.2



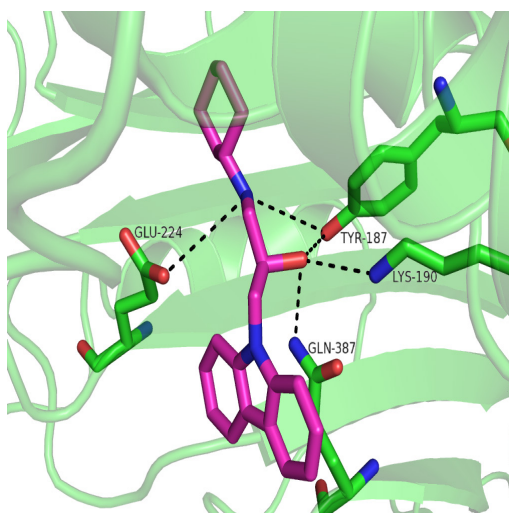
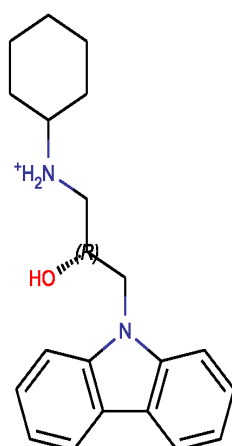
MMV008138.3



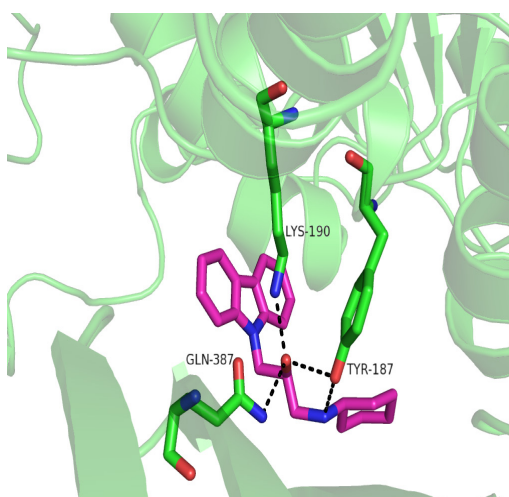
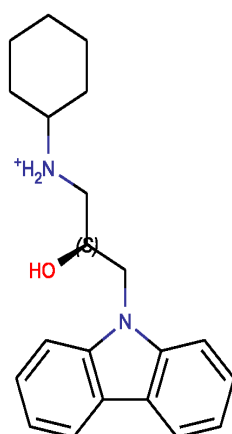
MMV008138.4



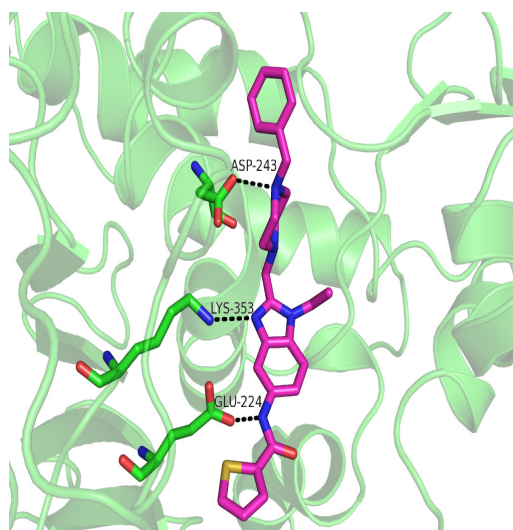
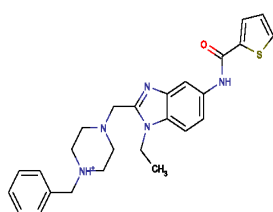
MMV009063.1



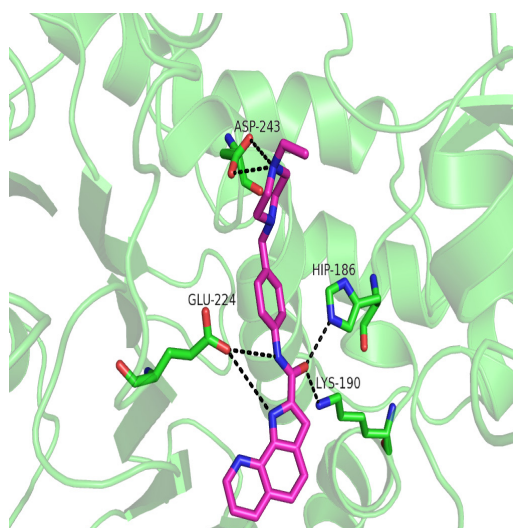
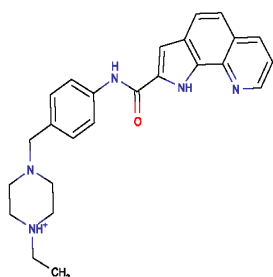
MMV009063.2



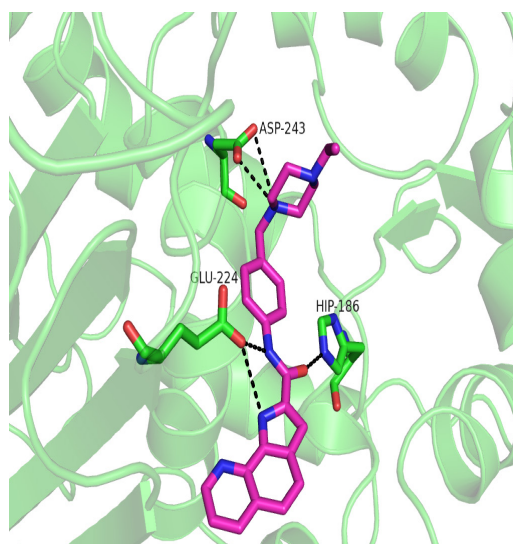
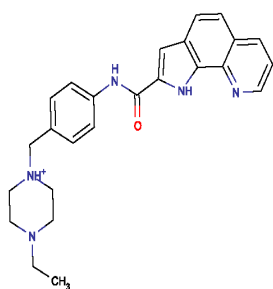
MMV020439



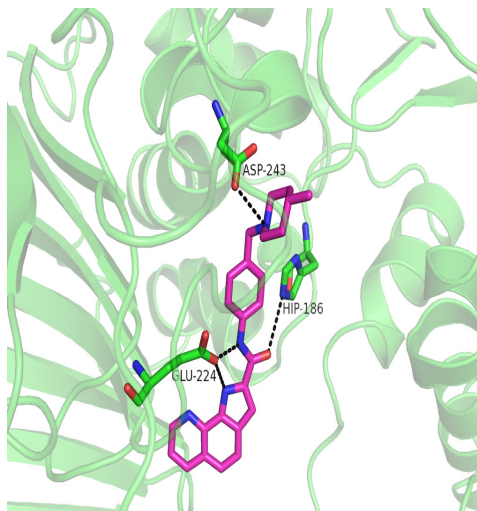
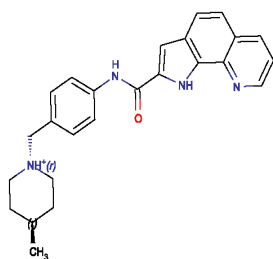
MMV020548.1



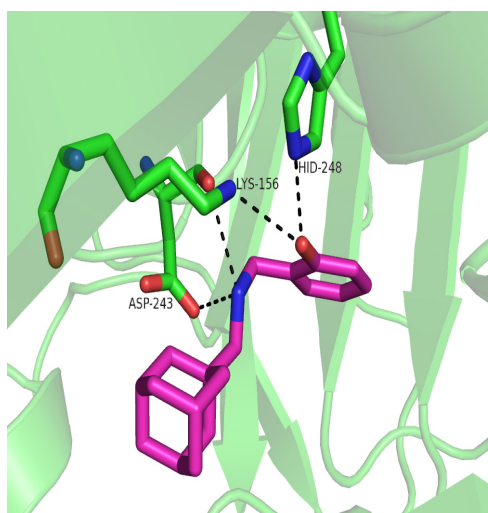
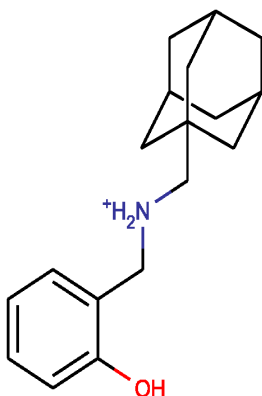
MMV020548.2



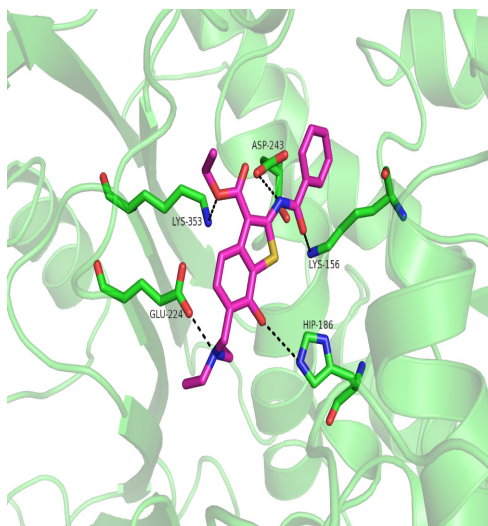
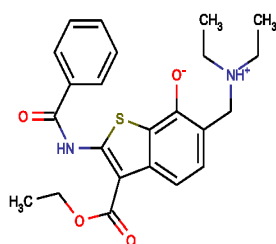
MMV020549.1



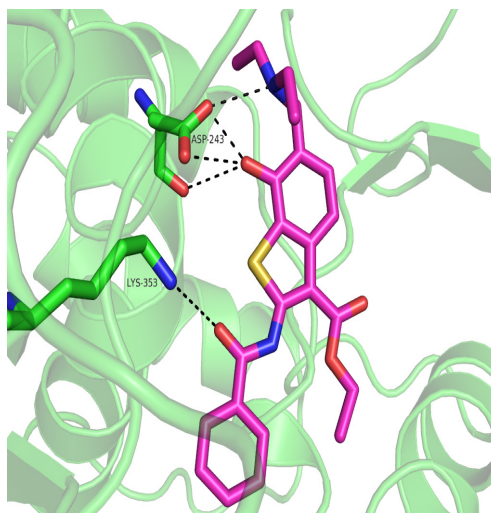
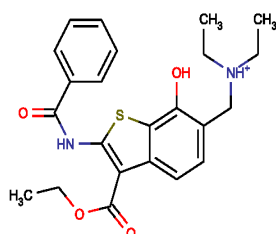
MMV020788.1



MMV665831.1



MMV665831.2



MMV665841.1

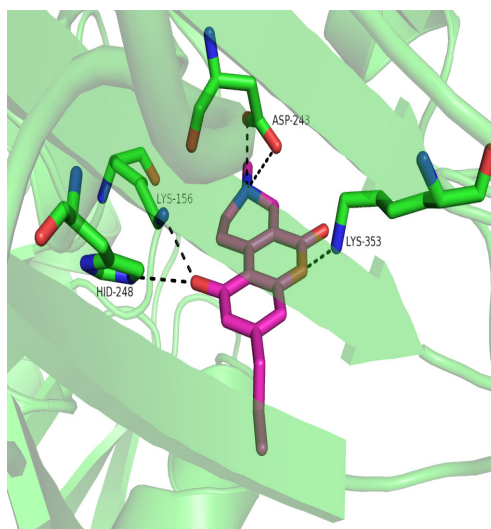
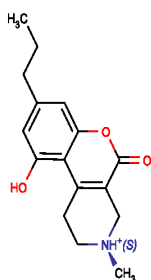


Figura 2. Representación del modo de unión de los compuestos seleccionados en el centro de unión de G6P.

5. Discusión

La tabla con las puntuaciones de los diferentes ligandos, comparadas con las del ligando de referencia (G6P), es muy indicativa. En ella podemos apreciar la gran diferencia entre las puntuaciones máximas (en valor absoluto) del ligando de referencia y las de los ligandos a evaluar. Por poner un ejemplo, si exceptuamos los ligandos MMV665831.1 y MMV665831.2, las 10 mejores puntuaciones del ligando de referencia son menores que -32, mientras que la puntuación óptima de todos los ligandos (salvo los dos anteriores) nunca llega a ser inferior a -32. Todos estos ligandos, salvo los dos mencionados anterior-

mente, parten con una desventaja sustancial al presentarse como candidatos a inhibidores competitivos de la G6PD, puesto que un buen inhibidor competitivo debería mostrar puntuaciones similares al ligando natural (G6P) o incluso mejores.

Las dos mejores puntuaciones corresponden a MMV665831.1 y MMV665831.2, que, de hecho, son dos formas con distinta carga de la misma molécula: la forma zwitteriónica (MMV665831.1) se presenta en un 89,0% a pH = 7,4, mientras que la forma con carga positiva (MMV665831.2) se presenta en un 9,7% a este pH. Debe hacerse notar que la forma zwitteriónica implica la desprotonación del grupo hidroxilo, que llevaría a la formación de una interacción intramolecular entre cargas opuestas. No obstante, tal como se apuntó anteriormente, debe tenerse la precaución de no sobrestimar la confianza en las poblaciones relativas de ambas especies, pues parece razonable esperar que la estructura MMV665831.2 tenga un mayor peso en solución acuosa a pH fisiológico.

Con MMV665831.1, las cuatro primeras soluciones del *docking*, previas a la que muestro en el dibujo, quedaban alejadas del sitio de unión a la G6P, pero la quinta solución muestra una molécula encajando razonablemente bien con el dominio de unión a la G6P, con cinco interacciones por puente de hidrógeno. A esta solución le corresponde una puntuación de -40.757, cuatro unidades inferior que la obtenida para G6P, que involucra una interacción electrostática entre el grupo amino terciario protonado con el residuo Glu224 y una interacción del grupo amida con los residuos Asp-243 y Lys-156.

MMV665831.2, que presenta una carga formal +1, se orienta de forma opuesta a la solución obtenida para MMV665831.1. Así, la posición de ambas moléculas en el sitio de unión a la G6P está prácticamente invertida (téngase como referencia el Asp-243 y la Lys-353 en la proteína, y el grupo fenilo y la amina terciaria protonada como ambos extremos del ligando). Las dos primeras soluciones de MMV665831.2 son muy similares, mostrando interacciones entre la amina terciaria protonada y el residuo Asp-234, así como entre el grupo carbonilo de la amida y el residuo Lys-353.

Con excepción de estas dos estructuras, hay 4 estructuras con una puntuación ligeramente superior a la de G6P: MMV006172.1, MMV006203.2, MMV008138.3 y MMV009063.2, cuya puntuación se halla entre -32 y -30. Además, dichas soluciones se hallan entre las 3 primeras orientaciones predichas por el programa de *docking*:

- a) La unión de MMV006172.1, con dos cargas positivas, involucra interacciones con los residuos Glu-224 y Asp-243, así como con el oxígeno carbonílico de Lys-156.
- b) La interacción de MMV006203.2, con una carga positiva, involucra la interacción electrostática con el residuo Asp-243 y un puente de hidrógeno entre el nitrógeno del sistema tricíclico y el residuo Lys-353.
- c) La fijación de MMV008138.3, sin carga formal, está mediada por contactos electrostáticos con los residuos Lys-156, Lys-353 y Asp-243.
- d) Finalmente, MMV009063.2, con carga +1, involucra contactos con Tyr-187, Gln-387 y Lys-190.

Así pues, con la excepción de MMV009063.2, la unión de los ligandos con mejor potencial como posibles inhibidores competitivos de G6P está mediada por cuatro residuos esenciales, que corresponden a Glu-224, Asp-243, Lys-156 y Lys-353. Ello manifiesta la elevada polaridad del centro de unión de G6P, lo cual puede representar una dificultad añadida para la identificación de inhibidores con elevada potencia y selectividad.

6. Conclusión

El proceso de cribado y selección presentado en esta memoria ha permitido conducir a la identificación de cinco compuestos descritos en Malaria Box como posibles inhibidores del enzima G6PD de *Plasmodium falciparum*. Dichos compuestos responden a los códigos MMV665831, MMV006172, MMV006203, MMV008138 y MMV009063.

Dado que es sabido que dichos compuestos presentan una eficacia antimalárica, sería deseable confirmar su posible interacción en el centro de unión del enzima. Con esta finalidad, aunque excede el objetivo de este trabajo, se prevé la realización de simulaciones de dinámica molecular, que permitirían analizar la estabilidad estructural y energética del complejo ligando-receptor. Si dichas simulaciones confirman la estabilidad del complejo, se recomendaría la compra de dichos compuestos para proceder a su evaluación farmacológica frente a esta diana, aprovechando la colaboración mantenida entre el equipo de investigación y el grupo del profesor José María Bautista, de la Universidad Complutense de Madrid.

Finalmente, este trabajo aporta la información necesaria para definir criterios que ayuden a seleccionar aquellas interacciones relevantes con el enzima, permitiendo la exploración de nuevos compuestos con motivos estructurales diferentes.

7. Bibliografía

- ATAMNA, H., PASCARONA, G. y GINSBURG, H. (1994). «Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites». *Mol Biochem Parasitol*, 67(1): 79-89.
- CALLAWAY, E. (2007). «Malaria research should go ‘back to basics’». *Nature*, 449: 266-271.
- CLARKE, J. L., SCOPES, D. A., SODEINDE, O. y MASON, P. J. (2001). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. A novel bifunctional enzyme in malaria parasites. *Eur J Biochem*, 268(7): 2013-2019.
- CROOKE, A., DIEZ, A., MASON, P. J. y BAUTISTA, J. M. (2006). «Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase – 6-phosphogluconolactonase». *FEBS J*, 273(7): 1537-1546.
- DUFFY, S. y AVERY, V. M. (2012). «Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening». *Am J Trop Med Hyg*, 86(1): 84-92.
- GUINDO, A., FAIRHURST, R. M., DOUMBO, O. K., WELLEMS, T. E. y DIALLO, D. A. (2007). «X-Linked G6PD Deficiency Protects Hemizygous Males but Not Heterozygous Females against Severe Malaria». *PLoS Med*, 4(3): 516-522.
- JORTZIK, E., MAILU, B. M., PREUSS, J., FISCHER, M., BODE, L., RAHLFS, S. et al. (2011). «Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from *Plasmodium falciparum*». *Biochem J*, 436(3): 641-650.
- KIM, Y. y SCHNEIDER, K. A. (2013). «Evolution of Drug Resistance in Malaria Parasite Populations». *Nature Education Knowledge*, 4(8): 6-18.
- KOTAKA, M., GOVER, S., VANDEPUTTE-RUTTEN, L., AU, S. W. N., LAM, V. M. S. y ADAMS, M. J. (2005). «Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase». *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61(5): 495-504.
- LORENZ, V. y KARANIS, P. (2011). «Malaria vaccines: looking back and lessons learnt». *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(1): 74-78.
- MASON, P. J., BAUTISTA, J. M. y GILSANZ, F. (2007). «G6PD deficiency: the genotype-phenotype association». *Blood Rev*, 21(5): 267-283.

- NAYLOR, C. E. , ROWLAND, P., BASAK, A. K., GOVER, S., MASON, P. J., BAUTISTA, J. M. *et al.* (1996). «Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme». *Blood*, 87(7): 2974-2982.
- PREUSS, J., JORTZIK, E. y BECKER, K. (2012). «Glucose-6-Phosphate Metabolism in *Plasmodium falciparum*». *IUBMB Life*, 64(7): 603-611.
- RUIZ-CARMONA, S., ALVAREZ-GARCIA, D., FOLOPPE, N., GARMENDIA-DOVAL, A. B., JUHOS, S., SCHMIDTKE, P. *et al.* (2014). «rDock: A fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids». *PLoS Comput Biol*, 10(4): e1003571.