

Identificación de inhibidores enzimáticos con actividad antiprotozoaria frente a *Leishmania*

Un ensayo de ultra-alta capacidad basado en levaduras identifica un benzazepano que inhibe la inositol-foforil-ceramida sintasa del parásito a concentraciones nanomolares y muestra actividad frente al protozoo.

La leishmaniasis es una enfermedad tropical negligida y endémica en más de 90 países, donde afecta a 12 millones de personas y pone en riesgo a otros 350 millones. Además de no existir ninguna vacuna para prevenir la enfermedad, ya sea esta cutánea (LC) o visceral (LV), su tratamiento es difícil porque se basa en un limitado número de fármacos cuyo mecanismo de acción es poco conocido y que frecuentemente causan efectos adversos serios. A esto se añade la aparición de resistencias que reducen aún más la eficacia de las terapias. Todo ello impone la necesidad de identificar dianas terapéuticas en vías metabólicas clave para la supervivencia del parásito. Recientes estudios de cribado fenotípico en diferentes cinetoplastidos patogénicos han proporcionado resultados desalentadores, lo que demuestra la importancia de que el cribado esté dirigido a una molécula específica. El enzima inositol-foforil-ceramida (IPC) sintasa (IPCS) ha sido considerado tradicionalmente una buena diana molecular porque el IPC es un esfingolípido infrecuente en mamíferos y porque existen ortólogos de la IPCS tanto en *Leishmania* como en las especies patogénicas de *Trypanosoma*. Sin embargo, la compleja estructura molecular del enzima ha dificultado su uso en plataformas de ensayo in vitro convencionales. Este problema ha sido resuelto utilizando un nuevo enfoque que aprovecha la capacidad de la IPCS del cinetoplastido de reemplazar la función del ortólogo AUR1p de *Saccharomyces (S.) cerevisiae*.

Aplicación de las levaduras en el descubrimiento de fármacos

La nueva estrategia no se basa en el uso de un mutante auxotrófico de *S. cerevisiae*, sino en el de una cepa de esta levadura que carece completamente de AUR1p, enzima que realiza las funciones equivalentes de la IPCS. La supervivencia de esta cepa está supeditada a la presencia de AUR1p alojada en un plásmido de expresión seleccionable por uracilo. La transformación de estas células de levadura con un plásmido transportador de la IPCS de *Leishmania (L.) major* o de AUR1p bajo el control del promotor de la galactosa permite el rescate con un análogo pirimidínico y la selección de una cepa en la que la expresión de IPCS es dependiente de galactosa. Una particularidad adicional de este nuevo ensayo es el aprovechamiento de la secreción natural de exo-beta-glucanasa durante el crecimiento de la levadura, un enzima que hidroliza un sustrato añadido, convirtiéndolo en fluorescente, lo que puede ser utilizado en la detección.

Seleccionando los compuestos de bajo peso molecular (<300 Da) y de polaridad favorable en el repositorio de Glaxo-SmithKline-Beecham, que incluye 1,8 millones de compuestos, se seleccionaron 19.669 moléculas, las cuales fueron sometidas a un contra-cribado dirigido a excluir las que no son inhibidoras de IPCS y a seleccionar las que actúan preferentemente sobre el enzima protozoario. Este contra-cribado preservó algunas moléculas altamente potentes, independientemente de su efecto sobre AUR1p. Los algo más de 4.000 compuestos resultantes fueron titulados en un ensayo de análisis de dosis en levaduras portadoras de IPCS o AUR1p, a fin de evaluar su

grado de selectividad. De los 500 compuestos altamente selectivos, 211 fueron llevados al cribado celular en un ensayo con amastigotes axénicos de *L. donovani*, de los cuales 70 mostraron una concentración semi-inhibitoria inferior a 10 micromolar. Tras el ensayo de citotoxicidad en células humanas y un cribado adicional de propiedades físico-químicas se seleccionaron 25 potenciales candidatos a desarrollo farmacéutico, los cuales fueron examinados en un ensayo con macrófagos humanos infectados con *L. donovani*, el mejor modelo in vitro actualmente disponible para examinar la actividad anti-*Leishmania*. Dos benzazapanos mostraron actividad en el rango micromolar bajo, sin impactar significativamente en la viabilidad de la célula hospedadora. Después de re-sintetizar los dos compuestos de valor en forma de bases libres se constató que ambos mantuvieron su actividad inhibitoria, si bien en diferentes grados.

El nuevo enfoque aprovecha la capacidad de la IPCS del cinetoplastido de reemplazar la función del ortólogo en la levadura

Verificación del mecanismo de acción

Con objeto de verificar la diana de los dos compuestos seleccionados se utilizó una forma mutante de *L. major* que carece de serina-palmitoiltransferasa (Ser-PTF). En esta cepa los inhibidores deberían ser inactivos. Sin embargo, uno de los compuestos inhibió el crecimiento en la misma medida que en la cepa portadora del plásmido codificante de la IPCS, lo que sugiere que el efecto sobre otras dianas puede contribuir a la actividad anti-*Leishmania* de este compuesto. Combinando las estructuras de los dos compuestos se obtuvo uno nuevo con elevada selectividad sobre el fenotipo salvaje de *Leishmania* pero inactivo en la cepa deficiente en Ser-PTF. El superior grado de inhibición de la IPCS de este compuesto en comparación con el parental fue demostrado en estudios celulares con *L. major*, si bien mostró ser inactivo frente a *L. donovani* en macrófagos. La selectividad del compuesto por la IPCS de *L. major* abre la posibilidad de utilizar los ortólogos de este enzima como diana terapéutica también en *Trypanosoma brucei*.

Conclusiones

Esta investigación demuestra la viabilidad del ensayo de cribado de ultra-alta capacidad basado en levaduras para la identificación de inhibidores altamente selectivos de proteínas de estructura compleja. 🐾

Fuente:

Jennifer L. Norcliffe et al. Identifying inhibitors of the *Leishmania* inositol phosphorylceramide synthase with antiprotozoal activity using a yeast-based assay and ultra-high throughput screening platform. *Scientific Reports*.