



**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa**

**División de Ciencias Básicas e Ingeniería**

**Identificación de inhibidores de la actividad de la enzima superóxido  
dismutasa (SOD–Cu/Zn) del parásito *Taenia solium* mediante  
simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando (*docking*)**

**TESIS**

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Química)

**Presenta**

**Q. Ponciano García Gutiérrez**

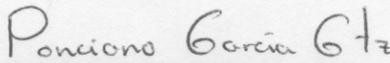
**Director de tesis: Dr. Arturo Rojo Domínguez**

México D. F., 2012

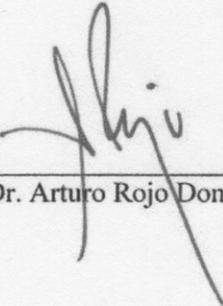
Jurado asignado

Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana  
Secretario: Dr. Rafael Zubillaga Luna  
Primer vocal: Dr. Abraham Landa Piedra  
Segundo vocal: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco  
Tercer vocal: Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde

Sustentante:

  
\_\_\_\_\_  
Q. Ponciano García Gutiérrez

Director de tesis:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Arturo Rojo Domínguez

El presente trabajo de tesis doctoral se realizó en el Área de Biofísicoquímica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Arturo Rojo Domínguez, y el Departamento de Microbiología y Parasitología de Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión del Dr. Abraham Landa Piedra. Esto fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por CONACyT por medio de una beca para estudios de posgrado.

Por este medio deseo agradecer a todas las personas que de alguna forma han contribuido a la realización del presente trabajo, ya que sin su ayuda posiblemente no se hubiera realizado. Con la finalidad de no omitir a alguien, he preferido no mencionar a alguien pero estoy seguro de que los que me han ayudado sabrán reconocerse entre estas personas.

Mi agradecimiento a

Dr. Arturo Rojo Domínguez

A mis padres y hermanos,

a María

## Índice

Abreviaturas	i
Resumen	1
Introducción	4
Capítulo 1. Antecedentes	8
1.1. Mecanismo de acción de algunos antihelmínticos contra teniosis y cisticercosis	9
1.2. La enzimas superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD–Cu/Zn) como posibles blancos para el diseño de antihelmínticos	10
1.3. Estructura tridimensional de la enzima SOD–Cu/Zn citosólica de <i>Taenia solium</i>	12
1.4. Simulación de acoplamiento molecular proteína–ligando ( <i>docking</i> ) y QSAR	14
Objetivo	16
Capítulo 2. Desarrollo experimental	17
2.1. Simulación del acoplamiento molecular proteína–ligando o <i>docking</i> de los compuestos que conforman la biblioteca LeadQuest <sup>®</sup> y antihelmínticos con la estructura tridimensional de <i>TsSOD–Cu/Zn</i>	18
2.2. Producción y purificación de la enzima recombinante <i>TsSOD–Cu/Zn</i>	20
2.3. Determinación de la actividad y ensayos de inhibición de la actividad de <i>TsSOD–Cu/Zn</i> y <i>HsSOD–Cu/Zn</i> por compuestos LeadQuest <sup>®</sup>	21
Capítulo 3. Resultados y discusión	24
3.1. Búsqueda de sitios potenciales de unión de ligandos en la estructura tridimensional del dímero de <i>TsSOD–Cu/Zn</i>	25
3.2. Búsqueda de conformeros estructurales de los compuestos que constituyen la base de datos LeadQuest <sup>®</sup> y los compuestos antihelmínticos	29
3.3. Simulación del acoplamiento molecular proteína–ligando o <i>docking</i> sobre la estructura tridimensional de <i>TsSOD–Cu/Zn</i>	32
3.4. Purificación de la enzima recombinante <i>TsSOD–Cu/Zn</i>	45
3.5. Ensayos de inhibición de la actividad de las enzimas <i>TsSOD–Cu/Zn</i> y <i>HsSOD–Cu/Zn</i> con compuestos LeadQuest <sup>®</sup>	50

Conclusiones y perspectivas	60
Bibliografía	63
Apéndice	70

## Abreviaturas

SOD	Superóxido dismutasa
<i>Ts</i> Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa Cu/Zn de <i>Taenia solium</i>
<i>Hs</i> Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa Cu/Zn de <i>Homo sapiens</i>
RMSD	Desplazamiento cuadrático medio ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )
PDB	Banco de datos de estructuras de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
DR-X	Difracción de rayos X
CNS	Sistema nervioso central ( <i>Central Nervious System</i> )
MOE	Software <i>Molecular Operating Environment</i>
DM	Dinámica molecular
NMR	Resonancia magnética nuclear ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
°C	Grados Celsius
Å	Ångström
cm	Centímetro
C $\alpha$	Carbono alfa
mm	milímetro
h	Hora
g	Gramo
mg	Miligramo
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad ( <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i> )
Da	Dalton
k	kilo
MM	Masa molecular
mL	Mililitro
mmol	Milimol
min	Minuto
Log $P$	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua
CHARMM	Campo de fuerzas CHARMM ( <i>Chemistry at HARvard Molecular Mechanic</i> )
Comp(s)	Compuesto(s)
T	Temperatura
t	Tiempo
DEAE-Sepharose	2-dietilaminoetanol unido covalentemente a polímero de sefarosa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Tris-HCl	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano
t. amb.	Temperatura ambiente
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
M	Concentración molar
PAGE-SDS	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas ( <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> )
P-L	Complejo proteína-ligando
mUA	Mili unidades de absorbancia
Ab <sub>S280nm</sub>	Absorbancia a una longitud de onda 280 de nanómetros

## Archivos cristalográficos, PDB ID

<b>3MND</b>	Estructura tridimensional de la enzima <i>TsCu/Zn</i> -SOD
<b>2V0A</b>	Estructura tridimensional de la enzima <i>HsCu/Zn</i> -SOD
<b>2AVI</b>	Estructura tridimensional del complejo avidina-biotina
<b>1XKK</b>	Estructura tridimensional del complejo EGFR-quinazolina

## **Resumen**

## Resumen

En el presente trabajo de tesis, se dan a conocer los resultados obtenidos al llevar a cabo la simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando (*docking*) de una quimioteca de aproximadamente 50 mil compuestos con potencial farmacológico (LeadQuest®) y la estructura tridimensional de la enzima dimérica superóxido dismutasa Cu/Zn del parásito *Taenia solium*, TsSOD-Cu/Zn. Este trabajo tiene el propósito de identificar compuestos líderes que permitan desarrollar inhibidores específicos de la actividad de la enzima del parásito sin afectar a la enzima homóloga en humano. Para tal fin, fueron construidos los confórmeros de los compuestos LeadQuest® con energías conformacionales igual o menores a 3 kcal/mol respecto de la más estable, constituyéndose una base de más de 2 millones de confórmeros. La simulación del acoplamiento se realizó sobre los 21 sitios potenciales de unión localizados en la superficie tridimensional de la enzima. Los complejos proteína-ligando con mejor puntaje fueron sometidos a una minimización local de la energía con la finalidad de mejorar las interacciones del ligando con los residuos de contacto en el sitio de unión. Una vez realizado lo anterior, la inspección visual de los complejos minimizados permitió seleccionar aquellos con interacciones intermoleculares con residuos no conservados en la enzima homóloga en humano.

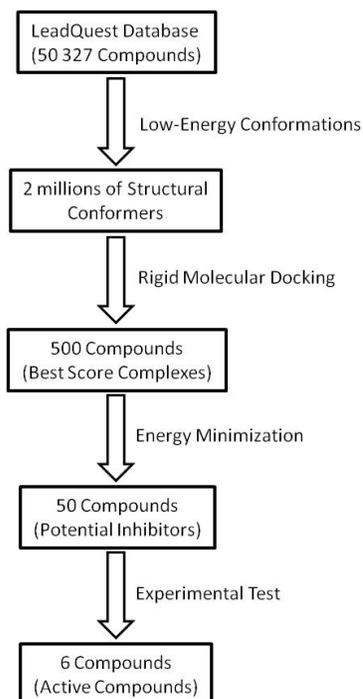
Ensayos de inhibición directa sobre la enzima recombinante SOD-Cu/Zn de *T. solium* pura, con algunos de los compuestos que presentaron buenos puntajes de formación de complejos proteína-ligando por simulación computacional, selectividad en la unión hacia residuos no conservados en la secuencia de SOD-Cu/Zn de humano, entre otros aspectos, mostraron inhibir parcial o totalmente la actividad de la enzima a concentraciones del orden micro molar. Particularmente, seis de los cincuenta compuestos seleccionados para realizar ensayos de inhibición presentaron actividad inhibitoria de TsSOD-Cu/Zn y sólo tres afectan la actividad de la enzima superóxido dismutasa de humano a las concentraciones ensayadas en este trabajo.

Adicionalmente, se realizó la simulación del acoplamiento molecular del albendazol y tiabendazol, ambos fármacos antihelmínticos, y la estructura tridimensional de la TsSOD-Cu/Zn. El estudio muestra que estos compuestos tienen afinidad por el sitio de la catálisis, al cual se unen mediante interacciones tipo puente de hidrógeno y metálica con el cobre catalítico.

## Abstract

We describe in this work a successful virtual screening using MOE™ package and experimental testing aimed to the identification of novel inhibitors of superoxide dismutase of the tape worm *Taenia solium* (*TsSOD–Cu/Zn*), a human parasite. After conformational search from LeadQuest® database of drug-like compounds, about 2 million structures from about 50 thousand original compounds were selected and then docked on 21 potential binding sites over the surface of X-ray diffraction structure of *TsSOD–Cu/Zn*. Docking results were screened looking for best protein-ligand complex scores and then, energy minimizations of complexes based on three steps methodology were carried out in order to include the possible structural effect of the ligand on the enzyme binding site. We then searched for ligand with receptor side-chains contacts not conserved in the human homologue structure, aimed to identify lead compounds for *in vitro* experiments over recombinant pure *TsSOD–Cu/Zn*. Several other criteria were considered as a second criterion to reduce the subset of potential ligands, for example, *LogP*, number of hydrogen bonds, shape complementarity, robustness of the results (poses found frequently), etc.

Six out of fifty experimentally tested compounds have shown  $\mu\text{M}$  inhibitory activities toward *TsCu/Zn–SOD*. Three of these compounds showed excellent species selectivity to *TsSOD–Cu/Zn* since they affect the activity of this enzyme but did not show inhibition in the homologous human enzyme when assayed *in vitro*.



## **Introducción**

## Introducción

*Taenia solium* (*T. solium*) es el agente causal de la cisticercosis en humanos y cerdos, así como de la teniosis en humanos. La neurocisticercosis humana es el establecimiento de las larvas de *T. solium* en el cerebro y constituye el padecimiento más grave ocasionado por este parásito.<sup>1</sup> Tanto la teniosis como la cisticercosis, constituyen un importante problema de salud pública en países en vías de desarrollo, y recientemente en los países desarrollados debido a la migración de población desde países subdesarrollados; el no tener un control sobre estas patologías puede derivar en importantes pérdidas económicas.<sup>2</sup> Con el objeto de interrumpir el ciclo biológico de *T. solium* se han propuesto medidas como mejorar la inspección sanitaria, observar medidas generales de higiene, someter a la carne infectada a una adecuada cocción o congelación, etc. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible introducir estas acciones en la población rural (la más vulnerable) de manera efectiva debido a la falta de educación, pobreza, y a la nulidad o insuficiencia de servicios básicos tales como el suministro de agua potable y electricidad. Hasta el momento, el control de las infecciones ocasionadas con helmintos como *T. solium* consiste en el uso de medicamentos como el albendazol, tiabendazol y prazicuantel. La adquisición de la resistencia es el principal problema que surge con el incrementado uso de antihelmínticos y sugiere una urgente necesidad de desarrollar tratamientos más efectivos, tanto en humanos como en el ganado porcino, principalmente.<sup>3</sup> Las características morfológicas y fisiológicas, así como el ciclo de vida de *T. solium* y los efectos nocivos a la salud del hospedero ocasionados por este parásito han sido discutidos ampliamente.<sup>4</sup>

Tal como otros organismos, *T. solium* es susceptible a la oxidación de membranas y ADN por las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el radical superóxido ( $O_2^-$ ).<sup>5</sup> Estas moléculas pueden ser producidas por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos propios del parásito y, en su caso, por células del sistema inmune del hospedero como parte del mecanismo efector en contra de los parásitos.<sup>6</sup> Diversos investigadores han sugerido que los parásitos son capaces de evadir el daño producido por las ERO, gracias a la acción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD). Es por ello, que el estudio de estas enzimas es muy importante ya que su inactivación mediante mecanismos inmunológicos o farmacológicos podría ayudar en la destrucción de *T. solium*.

Por otra parte, se conoce como simulación del acoplamiento molecular molécula blanco-ligando o *docking*,<sup>7</sup> a un conjunto de acciones destinadas a modelar mediante el uso de computadoras, la formación de diversos complejos a partir de las coordenadas atómicas de las especies a interactuar. Las moléculas blanco son generalmente proteínas implicadas en la enfermedad o dolencia o son importantes para el metabolismo del organismo en estudio, mientras que los ligandos son moléculas orgánicas pequeñas que se desea, se unan a la molécula blanco alterando su función. Las coordenadas

atómicas de las proteínas son obtenidas ya sea por la vía experimental (DRX y NMR, principalmente) o modeladas computacionalmente, mientras que para el caso del ligando, existen extensas bases de datos con información estructural de miles de compuestos con propiedades farmacológicas previamente sintetizados. Esta técnica está siendo ampliamente utilizada para la identificación o diseño de ligandos con posible actividad farmacológica, tanto por empresas privadas como por instituciones de investigación pública. La simulación va desde la identificación de un posible sitio de unión sobre la molécula blanco hasta la construcción y evaluación de los complejos moleculares teóricos resultantes. Los mejores modelos serán aquellos que involucren la menor energía (o un puntaje alto) de formación, de acuerdo a los parámetros de evaluación utilizados por los diferentes programas (*e.g.* FlexX, ICM, Pro\_LEDS, AutoDock, LUDI, GOLD, MOE\_Dock).

La metodología del *docking* podría dividirse en al menos tres etapas básicas. En la primera se requiere disponer de la estructura tridimensional de la molécula blanco, que debe ser acondicionada para los cálculos subsecuentes y sobre la que deberá identificarse el sitio de unión de una molécula de prueba (el probable ligando). La segunda etapa consiste en disponer de un archivo numeroso de ligandos (base de datos de fármacos potenciales) que, en general, son moléculas orgánicas con estructuras tridimensionales conocidas que se encuentran en condiciones adecuadas para simular su asociación al blanco. Finalmente, durante la tercera etapa se requiere contar con un algoritmo computacional que pueda tomar cada uno de los ligandos de la base de datos, encontrar la mayor cantidad de sus conformaciones de baja energía (típicamente decenas o centenas por cada compuesto) y colocarlos dentro de los sitios potenciales de unión. Este procedimiento requiere ensayar una gran cantidad de orientaciones para cada conformero con la finalidad de encontrar la colocación óptima, esto es, la de menor energía (o mayor puntaje). Aunque el sitio de unión es con frecuencia el sitio de la catálisis en el caso de las enzimas, algunos programas pueden buscar sitios alternos que generalmente corresponden a zonas cóncavas sobre la superficie del receptor. Algunos programas para realizar *docking*, permiten contemplar a la molécula del ligando como no rígida (*docking* no rígido) permitiéndole la rotación de enlaces durante la simulación del acoplamiento molecular, lo que permite acercarse más a la realidad, en donde las moléculas poseen flexibilidad y reactividad ante la interacción. En el caso óptimo, también es posible tratar a la molécula del receptor de manera flexible, aunque es sumamente costoso computacionalmente hablando.

Landa *et al.*<sup>8</sup> describieron la inhibición de la actividad de SOD-Cu/Zn de *T. solium* con albendazol y tiabendazol en concentraciones  $\mu\text{M}$ . De manera interesante, estos mismos experimentos de inhibición no tuvieron efecto sobre la actividad de SOD-Cu/Zn bovina, proteína homóloga a la de humano (93% de identidad). Con la elucidación reciente de la estructura tridimensional de SOD-Cu/Zn de *T. solium*,<sup>16</sup> se abre la posibilidad de realizar estudios computacionales de su interacción

con antihelmínticos para comprender las bases moleculares de su actividad, y con bibliotecas de compuestos con potencial farmacológico que conlleven al diseño de nuevas cabezas de serie (también llamados compuestos líder) en el proceso de desarrollo de fármacos con mayor actividad y selectividad que los actuales.

## **Capítulo 1**

### **Antecedentes**

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1. Mecanismo de acción de algunos antihelmínticos contra teniosis y cisticercosis

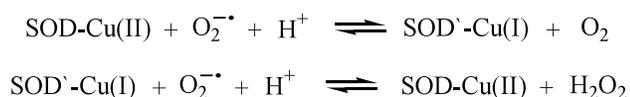
Hasta el momento, el control de las enfermedades ocasionadas por *T. solium* consiste primeramente, en el uso de medicamentos antihelmínticos de amplio espectro tales como el albendazol [metil(5-propiltio)-1*H*-benzimidazol-2-ilo)-carbamato], el prazicuantel [2-ciclohexanocarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-pirazino[2, 1-*a*]isoquinolin-4-ona] y la niclosamida [5-cloro-N-(2-cloro-4-nitro-fenil)-2-hidroxi-benzamida], más que en el uso de una vacuna o de alguna intervención quirúrgica para extraer al cisticerco. Los mecanismos de acción del albendazol y el prazicuantel han sido ampliamente discutidos.<sup>9</sup> Se sabe que el albendazol daña de forma selectiva los microtúbulos citoplasmáticos de las células de los helmintos pero no del huésped, ocasionando la ruptura de las células del parásito y la pérdida de la funcionalidad secretora y de absorción. El daño a los microtúbulos genera una acumulación de sustancias secretoras en el aparato de Golgi que hace que disminuya la captación de glucosa y la reducción de los depósitos de glucógeno. Como muchas de las sustancias presentes en el aparato de Golgi son enzimas proteolíticas que ya no son secretadas, éstas se liberan intracelularmente con la consecuente autólisis de la célula intestinal del helminto y con ello, su muerte. Por otra parte, el prazicuantel produce un aumento en la permeabilidad de la membrana celular al ión calcio que conlleva a una contracción muscular muy marcada, ocasionando una despolarización persistente que se manifiesta como parálisis espática del parásito con subsiguiente muerte. También puede causar vacuolización o desintegración del tegumento, lo que deja inerte al parásito. Finalmente, se cree que la niclosamida, al igual que la nitrobenzamida, tiene acción bloqueadora en el ciclo del ácido cítrico de los helmintos generando una acumulación de ácido láctico, además de interferir con el metabolismo de los carbohidratos.<sup>10</sup>

Aunque existen algunos otros fármacos comerciales de reciente introducción en contra de las parasitosis ocasionadas por helmintos, éstos no son efectivos para combatir la cisticercosis y teniosis y no constituyen líneas de fármacos diferentes a las ya existentes.<sup>1</sup> Adicionalmente, el uso indiscriminado o el empleo inadecuado de algunos fármacos contra helmintos ha generado adquisición de resistencia por parte de algunos de estos parásitos.<sup>1a), 11</sup> Estos dos últimos aspectos, aunados a la baja efectividad y a la existencia de reacciones secundarias por parte de fármacos de uso común contra la cisticercosis y teniosis, sugieren la necesidad de desarrollar medicamentos mucho

más potentes y específicos contra nuevas moléculas blanco que pudiesen contribuir de manera efectiva al combate de la cisticercosis y teniosis, y de las helmintosis en general sin causar reacciones secundarias.

## 1.2. La enzima superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD–Cu/Zn) como posible blanco para el diseño de fármacos antihelmínticos

La enzima SOD–Cu/Zn cataliza rápidamente la dismutación en dos pasos del radical tóxico superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Este proceso involucra una reacción de reducción y luego de oxidación del átomo de cobre en el sitio de la catálisis como se muestra a continuación:



Se sabe que la mayoría de las células en los organismos eucariontes contienen enzima SOD–Zn/Cu y también, que ésta juega un papel importante en la protección de los elementos intracelulares contra posibles daños oxidativos. En eucariontes las SOD normalmente existen como homodímeros con cada una de las subunidades conformada por aproximadamente 150 residuos y masa molecular alrededor de 16 kDa, aunque en procariontes las SOD pueden ser también monoméricas. Existe un alto valor de identidad entre secuencias de SOD de varias especies examinadas hasta el momento, siendo entre las de mamíferos tales como rata, humano, caballo y cerdo alrededor de 80%. Los residuos implicados directamente en la unión de los átomos de metal catalíticos están completamente conservados entre las SOD, es decir, son sitios conservados.

Una de las posibles rutas de acción en la búsqueda de nuevos fármacos contra los helmintos, la constituye el uso de enzimas antioxidantes en los parásitos (*i. e.* superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas, catalasas y peroxirredoxinas) como posibles blancos para moléculas orgánicas que pudieran formar complejos de alta afinidad, a través de los cuales se consiga inhibir su actividad. En este sentido, Landa *et al.*<sup>8</sup> reportaron la inhibición parcial y total de la actividad de la superóxido dismutasa citosólica de cobre y zinc de *T. solium* (*TsSOD–Cu/Zn*) por algunos derivados del bencimidazol: el albendazol y el tiabendazol. De manera interesante, la enzima SOD–Cu/Zn de *Bos taurus* (*B. taurus*), homóloga de la de humano, no se ve afectada por estos fármacos a las concentraciones ensayadas en los experimentos de inhibición. No obstante que las concentraciones empleadas por los autores en los ensayos de inhibición directa sobre la SOD–Cu/Zn, son más altas que la concentración que alcanzan estos fármacos en el organismo, estos estudios abren la posibilidad

de desarrollar tanto derivados de las moléculas originales como el de encontrar nuevas sustancias con mucho mayor actividad inhibitoria de la SOD–Cu/Zn de *T. solium*. El interés por inhibir a las enzimas antioxidantes radica en el hecho de que, al igual que todos los organismos aerobios, los helmintos requieren de estas moléculas para limitar el daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO), moléculas radicalarias que contienen en su estructura átomos de oxígeno y que son generadas tanto por la reducción incompleta del O<sub>2</sub> durante la respiración de la mitocondria, como por una serie de reacciones metabólicas en el citoplasma, retículo endoplasmático, membrana citoplasmática y peroxisomas. El daño ocasionado por las ERO, tales como el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (HO<sup>·</sup>), consiste en que estas especies reaccionan con algunas macromoléculas biológicas ocasionando oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, despolimerización de polisacáridos y mutación del ADN, entre otras consecuencias.<sup>12</sup> Adicionalmente a las ERO sintetizadas de forma endógena, los organismos parasitarios tienen que hacer frente a las ERO generadas por los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del hospedero durante el fenómeno conocido como estallido respiratorio, uno de los mecanismos efectores utilizado por las células del sistema inmune en contra de los organismos patógenos.<sup>12, 13, 14</sup> Se ha visto que los organismos patógenos deficientes en enzimas que puedan metabolizar especies radicalarias, exhiben consecuencias como una disminución en su crecimiento, incremento en su mutagénesis, hipersensibilidad a oxidantes y un menor grado de supervivencia.<sup>5</sup> Dentro de esas enzimas, hemos decidido fijar nuestra atención particularmente en la SOD–Cu/Zn citosólica de *T. solium*. Ésta es una metaloenzima homodimérica de 152 residuos por subunidad (masa molecular de 15 905 Da) con estructura tridimensional caracterizada por DRX y que al igual que todas las superóxido dismutasa, cataliza la dismutación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.

Hasta el momento no existen reportes de trabajos de investigación en los que se considere a las superóxido dismutasa de helmintos como blanco para la formación de complejos molécula blanco-ligando de alta afinidad y especificidad, en el diseño de fármacos contra la helmintosis o más específicamente, contra *T. solium*. Con la reciente elucidación de la estructura de rayos X de la SOD–Cu/Zn de *T. solium* y el inicio de la caracterización de sus propiedades enzimáticas, se abre la posibilidad de aplicar el protocolo de simulación del acoplamiento molecular proteína ligando o *docking* con extensas bases de datos de compuestos, hacia la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico contra la cisticercosis y la teniosis. La estrecha similitud en la secuencia de aminoácidos entre distintas SOD–Cu/Zn de helmintos<sup>15</sup> (e. g. la enzima de tenia con la de *Schistoma mansoni* muestra 71% de identidad), permitiría la búsqueda de inhibidores y su eventual evolución hacia fármacos de amplio espectro para su uso como antihelmínticos.

### 1.3. Estructura tridimensional de la enzima SOD–Cu/Zn citosólica de *Tenia solium*

Recientemente, Santoyo-Hernández *et al.*<sup>16</sup> resolvieron la estructura tridimensional de la enzima citosólica recombinante *TsSOD–Cu/Zn* (PDB ID 3MND) a una resolución 2.2 Å. La *TsSOD–Cu/Zn* es un homodímero de 152 residuos y masa molecular de 15 905 Da por monómero. Estos monómeros interactúan a través de una extensa área de contacto principalmente por interacciones hidrofóbicas, aunque también algunas interacciones hidrofílicas podrían estar estabilizando la estructura cuaternaria.

Cada monómero adopta plegamiento de barril β tipo sándwich formado por ocho hebras β (β1–β8) dispuestas antiparalelamente y conectadas por siete lazos o loops (L1–L7). El sitio activo en cada monómero incluye al ión catalíticamente activo Cu(II) y al ión estructural Zn(II) separados 6.1 y 6.3 Å en el monómero A y B, respectivamente. La Figura 1.1 muestra la estructura tridimensional de la *TsSOD–Cu/Zn* en representación de isosuperficie y de cintas, así como la nomenclatura adoptada para esta familia de proteínas en un monómero.<sup>17</sup>

En ambos monómeros el ión Cu(II) está coordinado a cuatro residuos de histidina (H43, 45, 60 y 117) en un geometría de tetraedro distorsionado. La H60 hace un puente entre el ión cobre y el zinc. A su vez el Zn(II) está enlazado a otras dos histidinas (H68 y 77) y al D80, perteneciente al barril β. Moléculas de agua están ubicadas a 2.4 y 2.9 Å del Cu(II) en el monómero A y B, respectivamente.

El Cu(II) está situado al fondo de un canal de 8 Å de profundidad, 18 de largo y 5 de espesor. Dos lazos, el electrostático (L7) y el de unión del Zn (L4) junto con algunos residuos del barril β, conforman las paredes de este canal activo que asiste al radical superóxido desde la superficie de la enzima hasta el sitio catalítico. Varios residuos cargados positivamente en el lazo electrostático crean un gradiente de carga que conducirá al sustrato hasta el Cu(II).<sup>17</sup> Los residuos involucrados son la H128, E129, T134 y R140. El canal queda completado por las cadenas laterales de la K123 y el E124 en el barril β.

La superposición sólo los monómeros A de las estructuras tridimensionales de las enzimas superóxido dismutasa Cu/Zn de humano y *T. solium* (PDB ID 2V0A y 3MND, respectivamente), muestra un valor de RMSD de 0.7 Å considerando sólo los átomos Cα, y de 1.5 Å cuando se superponen los dímeros (monómero A y B), también considerando sólo los átomos Cα (Figura 1.2). Esto pone de manifiesto que a pesar de haber una homología en secuencias baja entre ambas enzimas, la similitud estructural entre ellas es alta.

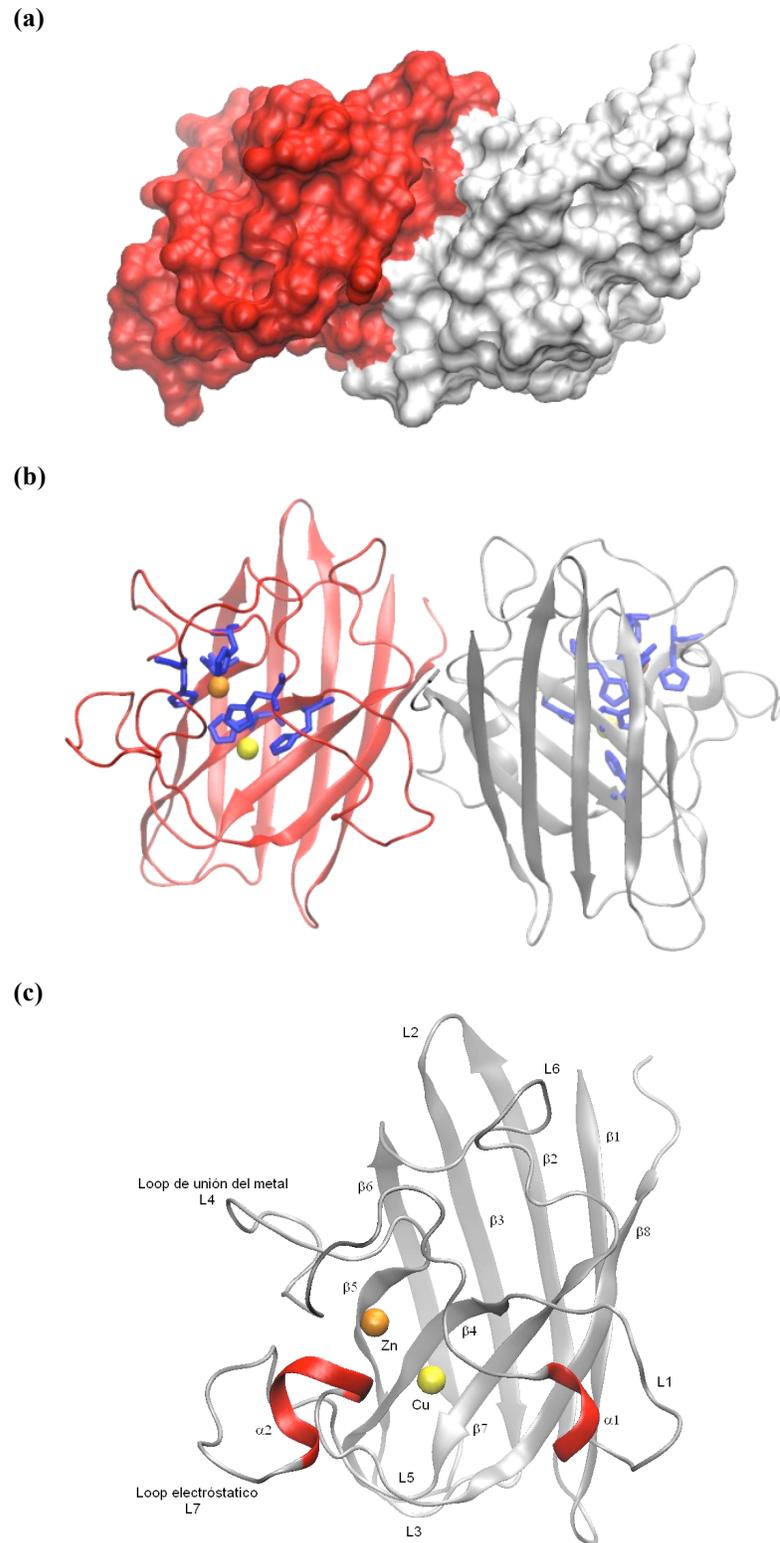


Figura 1.1. Estructura tridimensional de la enzima recombinante superóxido dismutasa Cu/Zn de *T. solium* obtenida por DRX. (a) Representación de isosuperficie. En color rojo el monómero A y en color gris el monómero B. (b) Representación en cintas. Cada monómero posee un sitio activo y han sido resaltados los residuos y átomos de metal que lo conforman. (c) Monómero de la *TsSOD-Cu/Zn*. La estructura consta de ocho hebras  $\beta$  ( $\beta 1$ – $\beta 8$ ) que conforman un sándwich  $\beta$  unidas por siete lazos (L1–L7). Se describe la nomenclatura canónica para las enzimas superóxido dismutasa.

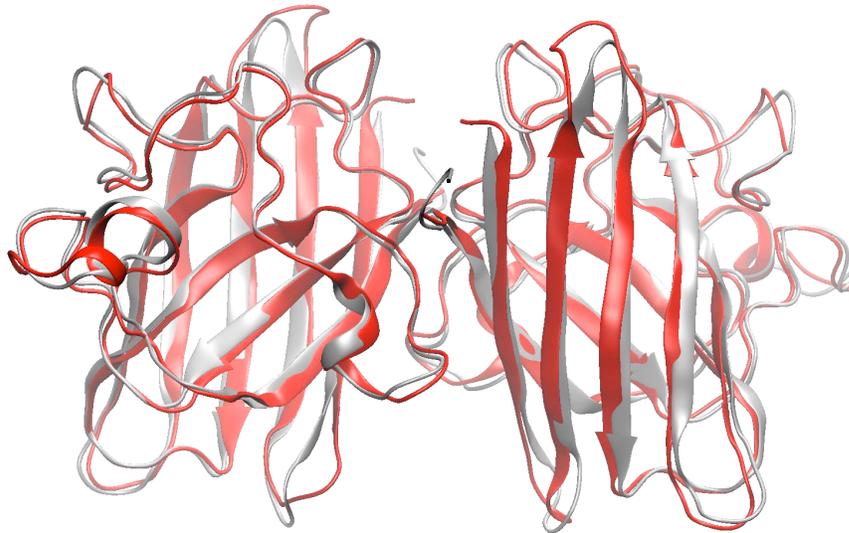


Figura 1.2. Alineamiento estructural de las enzimas superóxido dismutasa de *T. solium* (PDB ID 3MND, en color rojo) y de *H. sapiens* (PDB ID 2V0A, en color gris). Se aprecia la alta similitud estructural. El RMSD considerando ambos dímeros, pero sólo los  $C\alpha$ , es de 1.56 Å. Para ambas estructuras, el monómero de la izquierda es el A y el de la derecha el B.

Ambas enzimas presentan cuatro interacciones tipo puente de hidrógeno conservadas en la región interfacial entre los residuos I148, G48 y G111 e implicados en la estabilización de estructura cuaternaria.

#### 1.4. Simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando (*docking*) y QSAR

Tanto el *docking* como el QSAR, son métodos modernos de la bioinformática para el diseño de fármacos que persiguen tres objetivos generales: 1) descubrir nuevos compuestos líderes (probables fármacos), 2) optimizar a los fármacos ya existentes y, 3) seleccionar, de entre un grupo dado de moléculas, a los candidatos que tienen mayor probabilidad de convertirse en inhibidores exitosos para ser ensayados experimentalmente. Desde sus primeras aplicaciones al diseño de fármacos, estas herramientas computacionales han contribuido significativamente al desarrollo de fármacos que se han aprobado para su uso clínico. Uno de los primeros casos de éxito lo constituyó el antibacteriano norfloxacina.<sup>19</sup> Estudios de QSAR ayudaron al desarrollo de este fármaco que se comercializó con el nombre de Noroxin. Ejemplos de otros fármacos que se han sido comercializados con la asistencia de métodos computacionales de *docking* y QSAR, lo constituyen: el losartan (Cozaar)<sup>20</sup> y el eprosartan (Teventen)<sup>21</sup> para el tratamiento de la hipertensión, la dorzalamida (Truspot)<sup>22</sup> en el tratamiento del

glaucoma, el indinavir (Crixivan)<sup>23</sup> para el tratamiento del SIDA y el zolmitriptan (Zoming)<sup>24</sup> para el tratamiento de la migraña.

Además de éstos y otros casos de compuestos que han llegado a ser comercializados con la asistencia de métodos computacionales, actualmente son bastante comunes las publicaciones de trabajos de investigación en donde se hace uso de herramientas computacionales en la búsqueda de ligandos de receptores específicos y de nuevas moléculas líder que den lugar a inhibidores potenciales.<sup>25-32</sup>

## Objetivo

En este trabajo de investigación se plantea aplicar el protocolo de simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando o *docking*, tanto de una base de datos de más de cincuenta mil compuestos con potencial farmacológico (LeadQuest<sup>®</sup>) como de algunos fármacos antihelmínticos, sobre la estructura tridimensional de la SOD–Cu/Zn del parásito *Taenia solium* encaminado al diseño de moléculas que inhiban su actividad enzimática mediante la formación de complejos proteína-ligando de alta afinidad. Para el caso de los compuestos LeadQuest<sup>®</sup>, la efectividad de las moléculas que resulten líderes en los ensayos *in silico*, será evaluada mediante experimentos de laboratorio directamente sobre la proteína recombinante pura.

## **Capítulo 2**

### **Desarrollo experimental**

## Capítulo 2

### Desarrollo experimental

#### 2.1. Simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando o *docking* de los compuestos que conforman la biblioteca LeadQuest<sup>®</sup> y antihelmínticos con la estructura tridimensional de TsSOD–Cu/Zn

En este trabajo, las tareas de modelado molecular, asignación de carga eléctrica parcial a cada átomo, búsqueda de conformeros estructurales y sitios potenciales de unión de ligandos, así como de minimización de la energía, visualización molecular y *docking* fueron realizadas en ambiente MOE 2007.09 (Molecular Operating Environment, [www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com)) a menos que se indique lo contrario. Minimizaciones de la energía se realizaron hasta un RMSD (Root Mean Square Deviation) menor o igual a 0.001 usando el campo de fuerzas CHARMM27, parametrizado para moléculas de masa molecular alta como las proteínas, o MMFF94x, parametrizado para moléculas orgánicas pequeñas como los ligandos.

La quimioteca LeadQuest<sup>®</sup> proporcionada por Exelgen ([www.tripos.com](http://www.tripos.com)), contiene las coordenadas bidimensionales de la estructura química de más de 50 mil compuestos orgánicos con potencial farmacológico. En un primer paso, esta base de datos fue sometida a un proceso de filtración con la finalidad de eliminar aquellos compuestos que no cumplieran con los criterios de las reglas de Lipinski (Lipinski's Rule of Five)<sup>68</sup> y algunos otros, así como el de eliminar moléculas de agua, sales y otros disolventes que pudieran estar presentes (*MOE\_ImportDatabase*). Las estructuras que sí cumplían con las restricciones fueron trasladadas a 3D seguido de la búsqueda de sus conformeros. Esta última tarea se realizó con ayuda de la función *MOE\_ConformerSearch* y utilizando el campo de fuerzas MMFF94x. La búsqueda de conformeros fue restringida a aquellas conformaciones con energía menor o igual a 3 kcal/mol respecto a la estructura más estable, evaluada una vez que fueron sometidas a minimización de la energía. Lo anterior dio origen a una nueva base de datos de aproximadamente 2 000 000 de conformeros de los 51 068 compuestos que conforman la quimioteca LeadQuest<sup>®</sup>.

Respecto a las moléculas de antihelmínticos albendazol y tiabendazol, éstas fueron construidas con *MOE\_Build*, su energía optimizada usando el campo de fuerzas MMFF94x y generados sus variantes conformacionales (*MOE\_ConformerSearch*) con  $E_{\text{conf}}$  de hasta 4 kcal/mol.

Los sitios potenciales de unión de ligandos sobre la superficie de la estructura tridimensional de la enzima *TsSOD*-Cu/Zn, esto es, los sitios sobre los que se realizó el *docking*, fueron calculados utilizando la función *MOE\_SiteFinder* y confirmados con el servidor CASTp.<sup>28</sup>

Previo al *docking* de la biblioteca de conformeros generada *in house*, la estructura de rayos X de *TsCu/Zn-SOD* (PDB ID 3MND)<sup>16</sup> debió de ser preparada, primero eliminando todas las moléculas de agua, luego adicionando y optimizando la posición de los átomos de hidrógeno, asignando cargas parciales a todos los átomos usando el campo de fuerzas CHARMM27 y, finalmente, asignando una carga de 2<sup>+</sup> a los átomos de Cu y Zn.

El *docking* de cada uno de los conformeros sobre la estructura de *TsSOD*-Cu/Zn, se llevó a cabo empleando la función *MOE\_Dock*, con las estructuras rígidas y utilizando el campo de fuerzas CHARMM27 y la función de evaluación del puntaje *affinity* implementada en MOE. En una primera aproximación, se ensayaron y evaluaron 15 mil orientaciones de prueba para la colocación de cada uno de los ligandos sobre los 21 sitios potenciales de unión de ligandos localizados sobre la superficie de *TsSOD*-Cu/Zn; sólo los diez mejores complejos proteína-ligando de los 15 mil simulados para cada conformero con base al puntaje, fueron guardados para su análisis posterior. Una segunda simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando, pero sólo utilizando los compuestos cuyo puntaje de *docking* en la primera etapa fue *affinity* ≤ -7.5 unidades, se realizó utilizando 100 mil orientaciones de prueba en lugar de las 15 mil originales pero también, conservando sólo los diez mejores complejos con base al puntaje. En todos los casos, la función de búsqueda de orientaciones y acomodo de los conformeros en los sitios potenciales de unión fue *AlphaSiteTriangle*. El propósito de esta segunda simulación fue refinar los complejos para obtener mejores puntajes y lograr un reordenamiento de los mismos en función de la afinidad predicha. De los resultados obtenidos en esta última simulación del acoplamiento molecular, se seleccionaron los compuestos que obtuvieron un puntaje *affinity* ≤ -8.6 y se les realizó una minimización de la energía conjugada empleando los campos de fuerza CHARMM27 y/o MMFF94x según sea el caso (ver sección de Resultados y discusión para más detalles). Después de llevar a cabo la minimización de la energía de los complejos con mejor puntaje, o de aquellos compuestos con alta frecuencia entre los complejos modelados y almacenados, se seleccionaron cincuenta compuestos de acuerdo con criterios como: energía de interacción entre el ligando y la molécula receptora; número de interacciones tipo puente de hidrógeno formados con cadenas laterales de la molécula blanco ausentes en la SOD humana; complementariedad geométrica, hidrofóbica y electrostática; masa molecular menor a 600 Da; Log*P* estimado (CS ChemDraw Ultra<sup>®</sup>, [www.cambridgesoft.com](http://www.cambridgesoft.com)) menor a cuatro, entre otros criterios. Estos compuestos, junto con 10 controles negativos (compuestos con puntajes medianos y bajos, derivados del estudio de *docking*) fueron adquiridos con la empresa

Excelgen Inc. y probados como inhibidores de la actividad de la SOD de tenia mediante experimentos directos con la enzima. Sólo los compuestos con actividad inhibitoria contra *TsSOD*-Cu/Zn fueron usados para realizar estudios de *docking* (100 000 orientaciones de prueba seguido de minimización de la energía) e inhibición *in vitro* sobre la estructura tridimensional de SOD (PDB ID 2V0A) y enzima pura de humano (Sigma), respectivamente, con la finalidad de conocer la afinidad hacia ésta por parte de los compuestos activos.

## 2.2. Producción y purificación de la enzima recombinante *TsCu/Zn*-SOD

Una muestra de bacterias *Escherichia coli* BL21 transformadas con el vector pRSET conteniendo ADNc que codifica para *TsSOD*-Cu/Zn, se incubó a 37°C y agitación de 250 rpm por una noche en suficiente medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y en presencia de ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Una alícuota de este cultivo se diluyó en proporción 1:50 en 500 mL de medio LB fresco con ampicilina en concentración igual a la del primer cultivo. El nuevo cultivo se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación descritas anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica igual a  $DO_{600nm} = 0.6$ . En este momento se adicionó suficiente sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , Aldrich 99%), sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ , Aldrich 99%) e isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 0.17, 0.17 y 1 mM, respectivamente. El medio resultante se incubó por cuatro horas más. Al final, el medio fue centrifugado a 3 500 rpm durante diez minutos y temperatura ambiente y el precipitado fue suspendido en 20 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) frío y la disolución resultante, fue centrifugada nuevamente a las mismas condiciones que la primera vez. Ahora, el precipitado de bacterias es suspendido en 15 mL de amortiguador de Tris-HCl 50 mM y pH 7.5 y la disolución resultante, fue sonicada a 4 watts (Sonics-Vibracell) seis veces durante un minuto, con intervalos de un minuto entre cada una ( $6 \times 1 \times 1$ ), tiempo en el que la disolución fue enfriada en baño de hielo-agua. Al final de la sonicación, la disolución resultante es centrifugada a temperatura ambiente por diez minutos a 13 000 rpm. El sobrenadante o extracto soluble fue concentrado hasta un volumen de 5 mL empleando un equipo Amicon® equipado con una membrana de corte molecular de 10 000 Da (NMWL= 10 000 Da, Millipore). Este concentrado fue inyectado para la separación de sus componentes biológicos en una columna DEAE-Shepadex de intercambio aniónico (HiPrep 16/10 DEAE FF) acoplada a un equipo ÄKTA™ Prime, previamente equilibrada con el mismo amortiguador del concentrado. El programa de elución consistió en un gradiente lineal 0-20% de NaCl 1 M a partir del mililitro 30 y hasta el 110 para luego incrementarse al 100% entre el mililitro 110.1 y el 130, manteniéndose así hasta el final de la elución. Los diferentes volúmenes de eluyente colectados y etiquetados como picos cuando fue posible, fueron concentrados hasta

aproximadamente 2 mL utilizando el equipo Amicon<sup>®</sup>. La determinación de la cantidad de proteína se realizó por el método del ácido bicinonínico (BCA-PIERCE) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Los picos que mostraron actividad de SOD, fueron sometidos a cromatografía empleando la misma columna de intercambio iónico, previamente dializadas en amortiguador Tris-HCl 50 mM pero ahora a condiciones ligeramente alcalinas (pH 8.9), y la columna equilibrada con suficiente cantidad de este amortiguador.

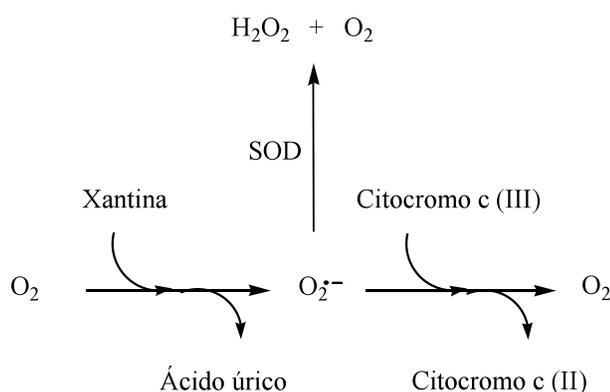
Para el análisis de los picos se utilizó la técnica de electroforesis en geles PAGE-SDS de acrilamida al 12% descrita por Laemmli.<sup>22</sup> Todos los experimentos de electroforesis fueron realizados en un equipo MiniProtean (BIO-RAD) a 90 volts por el tiempo necesario para que el frente de elución llegara a 1 cm antes del límite inferior del gel. Cuando fue posible, los geles fueron cargados con muestras de 5.0 µg de extracto crudo de proteínas y 3.0 µg de proteína pura. Los experimentos Western-Blot o ensayos de inmunotransferencia, se realizaron de acuerdo al método de Towbin *et al.*<sup>23</sup> Brevemente, alrededor de 3 µg de proteínas puras y 5 µg de extracto crudo fueron incubados durante cinco minutos con una solución de azul de bromofenol al 0.2%, glicerol al 20% y 200 mM de mercaptoetanol. Las muestras fueron cargadas en un gel de acrilamida previamente preparado y corrido con amortiguador de electroforesis 1X (Tris-Base 25 mM, glicina 250 mM, 0.1% de SDS). Al terminar la corrida, los geles fueron retirados para ser teñidos con azul de Coomassie durante 30 min y desteñidos con una solución de ácido acético al 10%. Para los ensayos de inmunotransferencia, se utilizaron los geles de acrilamida para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 100 V utilizando una cámara de transferencia (BIO-RAD). Las membranas fueron cortadas en tiras de aproximadamente 2 mm, las cuales fueron bloqueadas con una solución de PBS-Tween 0.5% y leche en polvo al 0.5%. El complejo Ab:Ac fue detectado mediante la adición de un segundo anticuerpo presente en el suero, el anti-IgG de conejo unido a la peroxidasa, a una disolución de 1:20 000. Finalmente, las muestras fueron nuevamente lavadas y reveladas usando 0.5 mg de 3-3'-diaminobenzidina y 20 µL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% durante 15 min a temperatura ambiente.

### **2.3. Determinación de la actividad y ensayos de inhibición de la actividad de TsSOD-Cu/Zn y HsSOD-Cu/Zn por compuestos LeadQuest<sup>®</sup>**

La actividad de la SOD fue determinada indirectamente por su efecto en la inhibición de la reducción del citocromo c,<sup>69</sup> ver Esquema 1. Brevemente, el O<sub>2</sub><sup>•</sup> es generado por el sistema enzimático xantina-xantina-oxidasa que en un ensayo control (ausencia de SOD) reduce

completamente al citocromo c ocasionando un cambio colorimétrico que es detectado a 550 nm. Cuando el mismo ensayo se lleva a cabo en presencia de SOD, parte del  $O_2^-$  es transformado por acción de la enzima a  $O_2$  y  $H_2O_2$  originando que el citocromo c sólo sea reducido parcialmente (dependiendo de la actividad de la SOD y de la cantidad adicionada al ensayo, el citocromo c se reduce poco o mucho), produciendo un cambio colorimétrico de menor intensidad que el observado en ausencia de superóxido dismutasa. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en 50% la reducción del citocromo c una vez transcurridos 2 min de iniciada la reacción. En este mismo sentido, se define como actividad específica al número de unidades de SOD por mg de muestra.

A un tubo de ensayo conteniendo 840  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8 (Aldrich 99.0% de pureza), 125  $\mu$ L de xantina (Aldrich, 99.99% de pureza) 0.4 mM y 12.5  $\mu$ L de citocromo c 0.8 mM (Aldrich 99% de pureza) se le adiciona suficiente disolución de xantina oxidasa ( $t= 0$  min, Aldrich, 98% de pureza) para tener una lectura de  $Abs_{550nm} = 0.10-0.12$  una vez transcurridos dos minutos de iniciada la reacción ( $t= 2$  min, alrededor de 20  $\mu$ L de una disolución con concentración 4 mg/400  $\mu$ L). Una vez fijada la cantidad de xantina oxidasa necesaria para tener valores de  $Abs_{550nm}$  en el intervalo indicado, la actividad de la SOD es determinada en ensayos similares al anteriormente descrito sólo que agregando una cantidad conocida de SOD a cada uno de ellos antes de la adición de xantina oxidasa. La cantidad de SOD utilizada en cada determinación, así como el número de ellas, deberán de ser adecuadas para construir una curva típica de actividad (para una muestra muy activa de  $TsSOD-Cu/Zn$ , la cantidad de ésta que producirá una disminución del 50% de la reducción del citocromo c está alrededor de 0.5  $\mu$ g).



Esquema 1. Determinación de la actividad de la SOD mediante la reacción de reducción del citocromo c (III) por el radical superóxido. Esta reacción puede ser inhibida por la presencia de la enzima superóxido dismutasa ya que ésta lleva a cabo la reacción de dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. El radical superóxido es producido por el sistema xantina-xantina-oxidasa.

Este método es también utilizado en ensayos de inhibición de la actividad de la *TsCu/Zn-SOD* (o *HsCu/Zn-SOD*) en los que 10 U de enzima son incubados por 30 min y T= 37°C con diferentes concentraciones de los compuestos: a) KCN o NaN<sub>3</sub> para los experimentos de determinación del co-factor, b) anticuerpos IgG anti-*TsCu/Zn-SOD* (sólo en el caso de la *TsSOD-Cu/Zn*) para los experimentos de inmunotransferencia, y; c) compuestos LeadQuest<sup>®</sup> para los ensayos de inhibición por *docking*. Los compuestos LeadQuest<sup>®</sup> tienen una pureza mayor al 95% de acuerdo con el fabricante. Se prepararon soluciones con concentración de 10 mM de todos los compuestos LeadQuest<sup>®</sup> en DMSO. Finalmente, todos los ensayos de inhibición fueron realizados por triplicado.

## **Capítulo 3**

### **Resultados y discusión**

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

#### 3.1. Búsqueda de sitios potenciales de unión de ligandos en la estructura tridimensional del dímero de *TsSOD*–Cu/Zn

Un primer requisito para llevar a cabo la simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando, es establecer las regiones en la estructura tridimensional del receptor sobre las que se dirigirá la simulación de unión de ligandos. Estos sitios potenciales de unión de ligandos son, usualmente, concavidades hidrofóbicas constituidas por las cadenas laterales de residuos de aminoácidos altamente empaquetados sobre la superficie de la proteína, aunque muchas otras veces también, el sitio de unión a su sustrato natural o sitio de la catálisis y cavidades ocultas al solvente o internas.<sup>33</sup> El sitio de la catálisis de la *TsSOD*–Cu/Zn es una región bastante conservada en residuos entre las SOD conocidas, desde bacterias hasta mamíferos incluyendo al humano. En estas circunstancias, diseñar un inhibidor específico para la enzima SOD de tenia podría resultar difícil o imposible si el estudio está dirigido al sitio de la catálisis. En la figura 2.1 está representado un alineamiento múltiple realizado con ClustalW (herramienta de alineamiento múltiple, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) de secuencias de SOD de varios organismos. En él puede observarse la conservación de los residuos que interactúan con los cofactores metálicos Cu y Zn y que en conjunto constituyen el sitio de la catálisis (*i. e.* H43, 45, 60, 68 y 117, así como D80, sombreados con líneas gruesas grises); la Arg140, implicada en el reconocimiento y luego en la canalización del radical superóxido hacia el sitio de la catálisis, también está conservada. Se observan cinco motivos altamente conservados localizados en las posiciones <sup>40</sup>HGFHVHEFGDTT<sup>51</sup>, <sup>56</sup>SAGAHFNP<sup>63</sup>, <sup>76</sup>RHVGD LGN<sup>83</sup>, <sup>121</sup>DDLGLG<sup>126</sup> y <sup>134</sup>TGNAGGRVACGII<sup>146</sup> y que en su mayoría forman parte de algún lazo, por ejemplo, la región comprendida entre los residuos 134-146 corresponde al lazo electrostático. De este mismo alineamiento se obtiene que el porcentaje de identidad entre la secuencia de *TsSOD*–Cu/Zn y la de mamíferos como el humano, jabalí y bovino es 57.9, 57.2 y 56.6%, respectivamente; de 71% con el trematodo *S. mansoni* y sólo de 54.6, 53.9 y 53.3% con los nematodos *F. hepatica*, *B. mayali* y *O. volvulus*.

El propósito de MOE\_*SiteFinder* es calcular posibles sitios activos en el receptor a partir de las coordenadas tridimensionales de moléculas de proteína. No obstante que existen métodos que hacen uso de energías de interacción entre una molécula de prueba y el receptor para localizar sitios

energéticamente favorables, *MOE\_SiteFinder* utiliza métodos geométricos para localizar concavidades sobre la superficie de un proteína: la posición relativa y la accesibilidad de los átomos del receptor junto con una clasificación aproximada del tipo químico de los átomos, son suficientes.

```

Ts      --MKAVCVMRGEEGVKGVVHFTQAGD--AVKVHAEFEGLKPGKHGFHVHE 46
Sm      --MKAVCVMTGTAGVKGVVKTQETDNGPVHVHAEFSGLKAGKHGFHVHE 48
Fh      -----MSGSSGVQGTVKFVQSESTSPVQIKVDINGLKPQKHGFHVHA 42
Bt      MATKAVCVLKGDPVQGTIHFQAKGD--TVVVVTSITGLTEGDHGFHVHQ 48
Ss      MATKAVCVLKGDPVQGTIYFELKGEK--TVLVTGTIKGLAEGDHFHVHQ 49
Hs      MATKAVCVLKGDPVQGTIINFQKESNGPQVWVSGSIKGLTEGLHGFHVHE 50
Bp      MSANRIAVLRGDN-VSGIIRFKQEKESPTTISGEIKGLTPGLHGFHVHQ 49
Ov      MSTNAIAVLRGDT-VSGIIRFKQDKEGLPTTVTGEVKGLTPGLHGFHIIHQ 49
          : *  *.* : *  .  .. :  .  ** *  ****.*

Ts      FGDTTQGCTSAHAHFNPHGKNGHAPDAAERHVGDLGNVTAGADGKATLDL 96
Sm      FGDTTNGCTSAGAHFNPTKQEHGAPEDSIRHVGDLGNVVAGADGNVAVNA 98
Fh      YGDTTNGCISAGPHFNPTGVDHGGPSDSVRHVGDLDGNVEANQNGLAHVEF 92
Bt      FGDNTQGCTSAHFNPLSKKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKNGVAIVDI 98
Ss      FGDNTQGCTSAHFNPEPKKHGGPKDQERHVGDLGNVTAGKDGVAIVYI 99
Hs      FGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGVAIVSI 100
Bp      YGDTTNGCISAGPHFNPNKTHGGPTDEMRHVGDLGNIVAGADGTAHIDI 99
Ov      YGDTTNGCISAGPHFNPNKTHGDRTEIRHVGDLGNIEAGADGTAHISI 99
          :*. * **  **.* ****  **  *****: * . : * *

Ts      TDKMISLTGEHRSVIGRSLVIVHVDPDDLGLGG---HELSLITGNAGGRVAC 143
Sm      TDKLISLNGSHSIIGRTMVIHENEDDLGRGG---HELKVTGNAGGRVAC 145
Fh      TDSVISLSGVNSVIGRAMVVHENEDDLGRGG---HEQSKITGNAGGRVAC 139
Bt      VDPLISLSGEYSIIGRTMVVHEKPDDLGRGG---NEESTKTGNAGSRVAC 145
Ss      EDSVIALSGDHSIIGRTMVVHEKPDDLGRGG---NEESTKTGNAGSRVAC 146
Hs      EDSVISLSGDHCIIGRTLVVHEKADDLGKGG---NEESTKTGNAGSRVAC 147
Bp      SDKHVQLLGPNSIIGRSLVVHADQDDLKGVGDKKDESLKTGNAGARVAC 149
Ov      SDQHIQLLGPNSIIGRSIVVHADQDDLKGVGAKKDESLKTGNAGARVAC 149
          *  : * *  .:***::*.*  .  **** *  :: *  *****.*.*

Ts      GIIGIAKSE 152
Sm      GVIGLAAE- 153
Fh      GVIGLTE-- 146
Bt      GVIGIAK-- 152
Ss      GVIGITQ-- 153
Hs      GVIGIAQ-- 154
Bp      GIVAVSAAS 158
Ov      GIVAIGAAS 158
          *:::

```

Figura 2.1. Alineamiento de la secuencia de *TsSOD-Cu/Zn* (La secuencia ha sido etiquetada como Ts en el alineamiento, código GenBank Q8WRF5) con la de otras especies: *Schistosoma mansoni* (Sm, Q01137), *Fasciola hepatica* (Fh, Q9XY94), *Bos taurus* (Bt, P00442), *Sus sacrofa* (Ss, P04178), *Homo sapiens* (Hs, P00441), *Brugia pahangi* (Bp, P41962) y *Onchocerca volvulus* (Ov, P24706). El alineamiento múltiple se realizó haciendo uso del servidor ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)). El símbolo (\*) indica que en esa posición los residuos son cien por ciento idénticos; el símbolo (:) indica posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas; finalmente, el símbolo (·) indica sustituciones menos conservativas. Los residuos que conforman el sitio de unión así como el residuo altamente conservado R140, se encuentran sombreados y en negritas, respectivamente.

Podríamos resumir la función de *SiteFinder* en tres puntos principales: a) Identificar regiones de empaquetamiento atómico alto; b) Filtrar aquellos sitios que estén muy expuestos al solvente tales como las protuberancias, y; c) Filtrar sitios de unión de moléculas de agua empleando el concepto de átomos hidrofóbicos e hidrofílicos.<sup>34</sup> Estos sitios activos, además de ser de ayuda para proponer posibles sitios de unión de ligandos en un estudio de *docking*, también son útiles para sugerir mutaciones en experimentos de mutagénesis dirigida.

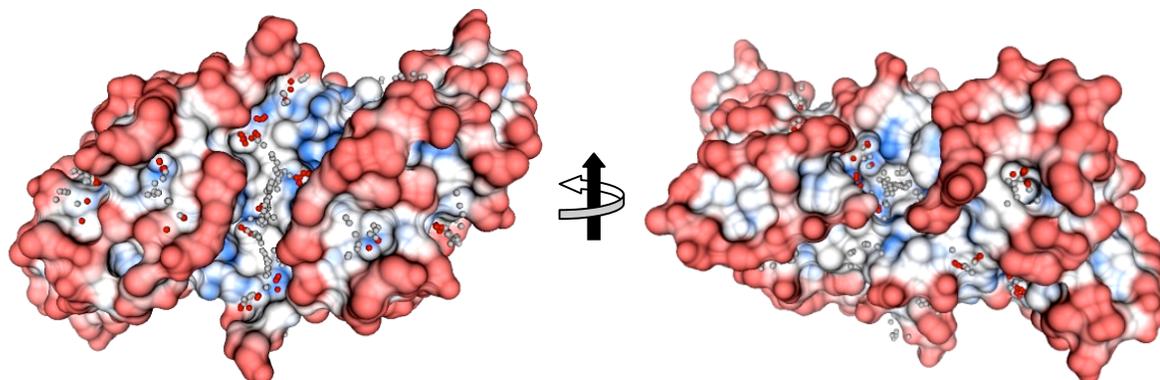
En este trabajo se identificaron 21 sitios potenciales de unión de ligandos que fueron etiquetados como sitio 1, sitio 2, etc., todos ellos concavidades de diversos tamaños y con características hidrofóbicas/hidrofílicas que se encuentra distribuidos uniformemente sobre la superficie de la estructura 3D de *TsSOD*-Cu/Zn. En la Figura 2.2 están presentadas diferentes perspectivas de la estructura tridimensional de *TsSOD*-Cu/Zn en donde pueden apreciarse los sitios potenciales de unión de ligandos localizados con *MOE\_SiteFinder* y verificados con CASTp ([sts.bioengr.uic.edu/edu/castp/calculation.php](http://sts.bioengr.uic.edu/edu/castp/calculation.php)).<sup>35</sup> CASTp es un servidor ampliamente utilizado cuya tarea se enfoca, al igual que *MOE\_SiteFinder*, en identificar concavidades en superficies accesibles al solvente y cavidades hacia el interior de una proteína dada la estructura tridimensional. En la figura 2.2(a), algunos sitios potenciales de unión están indicados y delimitados por colecciones de pequeñas esferas coloreadas llamadas *AlphaCenters*. Estas esferas coloreadas representan a su vez, los centros de otras de mayor tamaño que reciben el nombre de *AlphaSpheres* asociadas a conjuntos de cuatro átomos cercanos en el espacio y que definen, junto con el resto de las demás esferas, los sitios potenciales de unión. Las esferas rojas indican regiones hidrofílicas y las grises regiones hidrofóbicas. Es importante mencionar que no se localizaron cavidades internas en la estructura tridimensional del dímero de *SOD*-Cu/Zn de tenia con los parámetros utilizados en *MOE\_SiteFinder* y CASTp.

En la Tabla 2.1 se encuentran algunos descriptores para los diez primeros sitios potenciales de unión de ligandos, los de mayor tamaño. Una lista completa de estos descriptores para los 21 sitios se encuentra en la Tabla 1 del apéndice. Particularmente, la cuarta columna lista los residuos de aminoácidos cuyos átomos, ya sea de la cadena principal y/o lateral, participan en la conformación de los sitios potenciales de unión. La columna dos indica en número los átomos que constituyen el sitio activo, es decir, los átomos que podrían interactuar con la molécula del ligando una vez posicionada en el sitio y habiendo probado varias posiciones y orientaciones.

Los sitios 1 y 2 son los de mayores dimensiones ya que más átomos o residuos los constituyen, pero a la vez son también los que más átomos hidrofóbicos presentan dándoles características propicias para la unión de ligandos no tan pequeños y con propiedades, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Ambos sitios se ubican en la región interfacial en el dímero de *TsSOD*-Cu/Zn (Figura

2.2(b)) pero mientras cualquiera de ellos puede observarse directamente o de frente, el otro sitio se sitúa en parte de atrás y es posible verlo si se gira la estructura 180° sobre el eje longitudinal. El sitio 1 tiene forma extendida mientras que el 2 es más compacto. Es importante destacar que estos sitios potenciales de unión, al igual que otros en la lista, no están estrictamente conservados en secuencia entre *TsSOD*-Cu/Zn y *HsSOD*-Cu/Zn y se convierten en blancos atractivos para el diseño de inhibidores específicos.

(a)



(b)

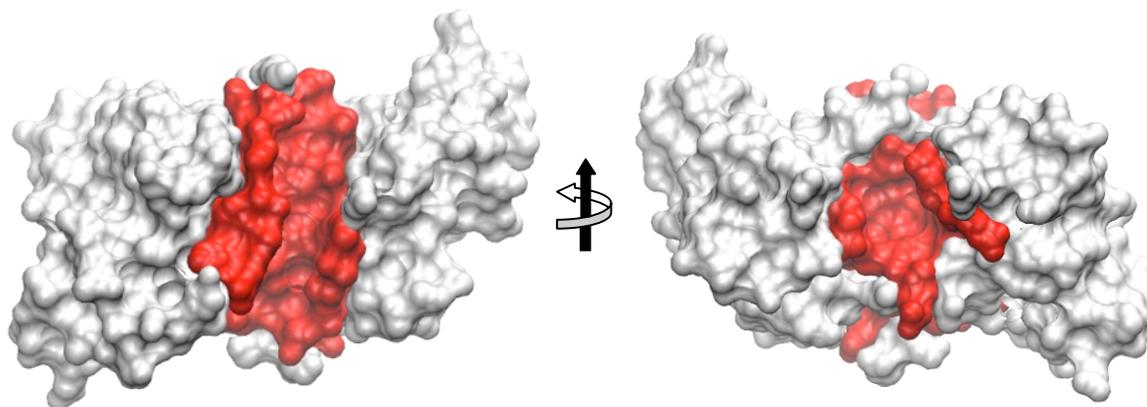


Figura 2.2. Sitios potenciales de unión de ligando sobre la superficie de la *TsSOD*-Cu/Zn. (a) Representación de isosuperficie generada con Surfaces and Maps de MOE mostrando los sitios potenciales de unión de ligandos identificados con las aplicaciones *MOE\_SiteFinder* y *CASTp*. Las esferas grises y rojas en las concavidades definen los sitios potenciales de unión de ligandos. Las zonas en color rojo en la superficie indican regiones protuberantes, las de color azul regiones polares y las de color blanco regiones hidrofóbicas. (b) En ambas figuras, al frente en el centro, pueden distinguirse los sitios 1 y 2, respectivamente. Estos sitios son importantes por su tamaño, ubicación y propiedades fisicoquímicas y por la preferencia de unión observada por los compuestos *LeadQuest*<sup>®</sup> hacia la formación de complejos. *MOE\_SurfacesandMaps* puede calcular la forma de la superficie externa de una macromolécula, definida por los radios de van der Waals de todos los átomos de la molécula o por el “volumen de exclusión del solvente”, más allá del cual no puede penetrar una molécula de agua.

Sitio	Tamaño	Hyd	Residuos
1	226	30	Cadena A: M1 K2 F61 L103 T104 G105 E106 H107 S108 V109 I110 R112 I148 A149 K150 S151 E152. Cadena B: M1 K2 A3 E46 F47 L103 T104 G105 S108 I110 G111 R112 I148 A149 S151
2	159	18	Cadena A: C5 V6 M7 R8 G9 E10 T50 G53 C54 C143 G144 I145. Cadena B: C5 V6 M7 R8 T50 C143 G144 I145
3	61	14	Cadena B: E11 V13 G34 L35 K36 H40 V118 V141
4	73	13	Cadena A: K2 A149 K150 S151. Cadena B: F47 D49 T55 S56 A57 G58
5	129	12	Cadena A: H43 H45 G58 A59 H60 N62 K66 N67 H68 H77 H117 L130 L132 I133 T134 N136 A137 G138 G139 R140 Cu
6	87	12	Cadena B: K66 P71 D72 A73 A74 R76 L81 L96 T97 D98 K99 M100
7	71	10	Cadena A: P71 D72 A73 A74 R76 L81 L96 T97 D98 K99 M100
8	59	10	Cadena A: K39 A70 P71 D72 L81G82 N83 L94 L96 L123
9	55	9	Cadena B: K14 G15 V16 E31 F32 E33 K91 A92 T93
10	51	8	Cadena A: K14 G15 V16 E31 F32 E33 K91 A92 T93

Tabla 2.1. Algunos descriptores para los diez primeros sitios potenciales de unión de ligandos, de los 21 localizados en la superficie del dímero de  $T_3\text{Cu}/\text{Zn}$ -SOD identificados con la aplicación MOE *SiteFinder* y confirmados mediante el servidor CASTp. La columna *Tamaño* indica el número de átomos que constituyen las paredes del sitio; la columna *Hyd* indica cuántos de los átomos indicados en la columna *Tamaño* son hidrofóbicos o átomos de C e H, y; la columna *Residuos* indica los aminoácidos cuyos átomos están implicados en la conformación del sitio en formato cadena:residuo-nombre.

En general, el resto de los sitios potenciales de unión son de menor tamaño, regiones más accesibles al solvente y en algunos casos, sitios conservados respecto a la enzima homóloga en humano. No obstante estas diferencias, todos representan en una primera aproximación sitios atractivos para dirigir sobre ellos el *docking* de la quimioteca LeadQuest<sup>®</sup> y de los compuestos antihelmínticos.

### 3.2. Búsqueda de conformeros estructurales de los compuestos que constituyen la base LeadQuest<sup>®</sup> y los compuestos antihelmínticos

Las moléculas (incluyendo las proteínas) no son especies rígidas, si no por el contrario, éstas poseen dinamismo conformacional que, en general, se incrementa al aumentar la temperatura del sistema en que se encuentran. En los sistemas vivos este dinamismo se da de manera natural y es

indispensable para que haya reconocimiento molecular, por ejemplo, proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN, etc., en otras palabras para que haya funcionalidad.

Modelar las conformaciones estructurales que puede sufrir la proteína y el ligando sobre la marcha o en tiempo real, durante la simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando resulta bastante costoso computacionalmente hablando. Por el contrario, no modelarlas puede ser mucho menos costoso, pero al ser ésta una aproximación más simplista, los modelos resultantes podrían ser más imprecisos aún. Respecto al ligando, los cambios conformacionales pueden ser incorporados mediante dos procedimientos principalmente: a) permitiendo la flexibilidad a través de la rotación de los enlaces sencillos del ligando una vez que éste ha sido posicionado en el posible sitio de unión en la estructura 3D del receptor o; b) mediante el *docking* rígido de los conformeros pre-construidos del ligando(s) contenidos en una base de datos. Una desventaja importante de los métodos que tratan la flexibilidad del ligando sobre la marcha, es que sufren de muestreo redundante de las conformaciones.<sup>36</sup> Como ya se mencionó, una aproximación en la simulación conformacional de los ligandos es que previo al proceso de modelado de complejos proteína-ligando se construyan los conformeros de los ligandos y que éstos sean sobre los que se modele su interacción con el receptor.<sup>37</sup>

No obstante que nuestro trabajo puede clasificarse como de *docking* rígido en el sentido de que tanto las estructuras del receptor y ligando permanecen fijas durante la simulación del acoplamiento proteína-ligando, previamente llevamos a cabo una búsqueda de conformeros estructurales representativos de cada uno de los 51 068 compuestos que conforman la base de datos LeadQuest®.<sup>38</sup>

Una hipótesis es que construyendo los conformeros de cada uno de los compuestos antes del *docking*, usando algoritmos y parámetros más intensos y completos que los que se usan en *docking* flexible, obtendremos conformeros mejor evaluados en términos de su energía conformacional cubriendo una gama más extensa de modelos.

MOE\_*ConformerImport* es una herramienta que permite construir conformaciones de baja energía a partir de las coordenadas 2D de una colección grande de compuestos, por ejemplo LeadQuest®. La metodología de búsqueda de conformaciones *high-throughput fragment-based* implementada en MOE<sup>34</sup> nos permitió generar aproximadamente dos millones de conformeros con energía  $E_{\text{conf}} \leq 3.0$  kcal/mol a partir de los 51 068 compuestos originales, esto es, aproximadamente cuarenta conformeros por compuesto. Al respecto, Perola *et al.*<sup>39</sup> llevaron a cabo un estudio teórico del cálculo de la energía conformacional de decenas de ligandos (bioactivos) unidos a su receptor en complejos proteína-ligando cuya estructura 3D ha sido descrita. Concluyen que el 80% (o 50%) de los ligandos que contienen de 1 a 3 enlaces rotables (o de 4 a 6) tienen energía conformacional igual o menor a,  $E_{\text{conf}} = 3.0$  kcal/mol. Con el objetivo de no generar un número muy grande de conformeros, hemos

adoptado en este trabajo ese mismo límite de energía conformacional, esperando contar con un número significativo de conformaciones biológicas relevantes. Esta nueva base fue usada para realizar *docking* sobre los sitios potenciales de unión encontrados en la superficie de la estructura de TsSOD–Cu/Zn. En la Figura 2.3 se muestran los conformeros estructurales para uno de los miles de compuestos de la base LeadQuest<sup>®</sup>, el compuesto **3**. Cabe mencionar que la diversidad o número de conformeros (algunas veces también llamados rotámeros) que pueden construirse a partir de la estructura de un compuesto dado, depende del número de enlaces rotables (enlaces sencillos) presentes, pues ni los enlaces dobles y triples y anillos permiten giros. Es así como el número de conformeros disminuye notablemente cuando la molécula está constituida por varios ciclos aromáticos ya que éstos no poseen flexibilidad, sino más bien son rígidos y de geometría planar. Para el compuesto del ejemplo se encontraron 37 conformeros que cumplieran con el límite impuesto de energía conformacional. En este compuesto, el ácido 4-(4-metoxi-fenil)-3-metil-piperazin-1-carboxílico(4-dietilamino-fenil)-amida, los anillos aromáticos permanecen planos y las torsiones están localizadas en los sustituyentes etilo en la amina, el enlace tioacetamida, el anillo de piperazina y en el grupo metoxi.

Es importante mencionar que previo a la generación de los conformeros, la base LeadQuest<sup>®</sup> fue sujeta a un proceso de depuración cuya finalidad fue eliminar compuestos con grupos reactivos y algunos complementos no deseados pero frecuentemente encontrados en muchas quimiotecas tales como:

- Moléculas de sales y solventes como cloruro de sodio, acetato de sodio, agua, hexano, etc.
- Grupos reactivos como: haluro de formilo, haluro de acilo, formaldehído, éster alifático, cetona alifática, alquilamina, haluro de alquilo, anhídrido, aziridina, azida, 1,2-dicarbonil, epóxido, halo pirimidina, isocianato, aceptores tipo Michael, perhalo-cetona, éster fosfonato, éster sulfonato, haluro de sulfonilo, tiourea, vinilcetona, peróxido, tioperoxido, carbonilo  $\beta$ -heterosustituido, fósforo con pares de electrones libres, enlaces N-N/O-S simples.
- Desprotonar ácidos y protonar bases.
- Eliminar las moléculas que no satisfagan los criterios de las Reglas de Lipinski:<sup>68</sup> compuestos con más de 12 grupos donadores y aceptores de hidrógeno; compuestos cuya masa molecular superara los 600 Da; compuestos que contengan más de 7 enlaces rotables (enlaces sencillos); compuestos con cadenas alifáticas con más de seis enlaces; compuestos con valores de  $\text{Log}P$  estimado fuera de  $-4 < \text{Log}P < 8$  de acuerdo con el modelo de Wildman and Crippen.
- Eliminar aquellas moléculas con más de cuatro centros quirales.
- Eliminar compuestos que contengan átomos de metales de transición y, en general, compuestos con elementos del grupo *d*.

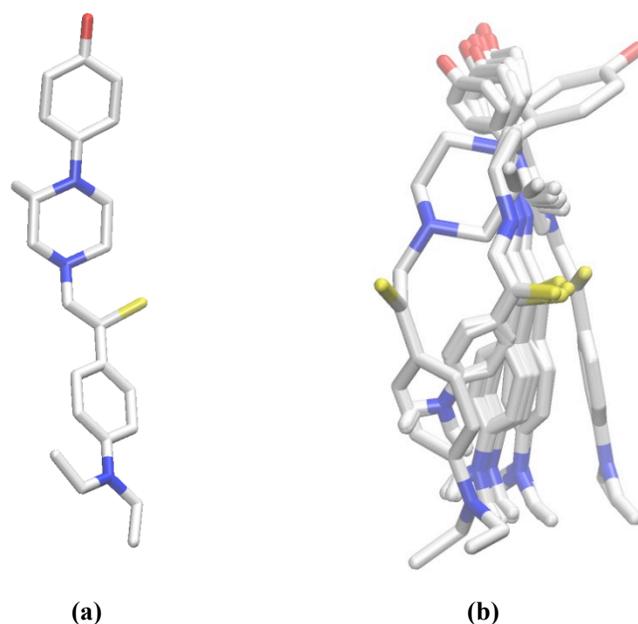


Figura 2.3. Construcción de conformeros estructurales para el compuesto **3** con la función *MOE\_ConformerSearch* utilizando el campo de fuerzas MMFF94x. (a) Estructura tridimensional minimizada del compuesto **3**. (b) Algunos conformeros estructurales del compuesto **3**. El número de conformeros construidos con  $E_{\text{conf}} \leq 3$  kcal/mol fue de 37. Las torsiones están localizadas en los sustituyentes etilo en la amina, el enlace tioacetamida, el anillo de piperazina y en el grupo metoxi.

La construcción de las moléculas y modelado de los conformeros de los compuestos antihelmínticos se llevó a cabo con las herramientas *MOE\_Build* y *MOE\_ConformerSearch*, respectivamente. El número de conformeros para cada molécula, todos ellos con  $E_{\text{conf}} \leq 4$  kcal/mol con respecto a la geometría más estable fue de 38 para el albendazol y 33 para el tiabendazol. El campo de fuerza empleado para estimar las energías fue MMFF94x, parametrizado para moléculas orgánicas pequeñas. En general, las moléculas de antihelmínticos son rígidas y pequeñas, de ahí que el número de sus conformeros no fuera grande.

### 3.3. Simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando o *docking* sobre la estructura tridimensional de *TsSOD-Cu/Zn*

#### *Docking* de la base LeadQuest®

En una primera etapa, la simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando entre cada uno de los 2 millones de conformeros de los 51 068 compuestos LeadQuest® y los 21 sitios potenciales de unión de ligandos localizados sobre la superficie de *TsSOD-Cu/Zn* (Figura 2.2(a)), se llevó a cabo probando 15 000 orientaciones (o *poses*) de prueba para cada uno de los conformeros. Cada una de

estas orientaciones constituye un complejo proteína-ligando modelado que es evaluado con una función de asignación de puntaje llamada *affinity*, pero sólo la información de los diez mejores complejos con base al puntaje es almacenada para su posterior análisis. La función *affinity* estima la contribución entálpica a la energía libre de unión usando la función lineal siguiente:

$$affinity = C_{hb}f_{hb} + C_{ion}f_{ion} + C_{mlig}f_{mlig} + C_{hh}f_{hh} + C_{hp}f_{hp} + C_{aa}f_{aa}$$

El término *f* evalúa contactos específicos entre átomos y coeficiente *C* pondera la contribución del término *f* a la estimación de *affinity*. Los términos individuales son: *hb*, interacción entre pares de especies donador de hidrógeno-aceptor de hidrógeno; *ion*, interacciones iónicas; *mlig*, ligación metálica; *hh*, interacciones hidrofóbicas; *hp*, interacciones entre átomos hidrofóbicos y polares; *aa*, interacción entre dos cualquiera átomos.

Es así como al final de esta primera etapa tenemos  $3 \times 10^{10}$  complejos proteína-ligando modelados (15 000 orientaciones  $\times$  2 005 145 conformeros), pero sólo la información de  $2 \times 10^7$  modelos fue guardada (10 complejos  $\times$  2 005 145 conformeros).

Los mejores puntajes se obtienen cuando conformeros de diferentes moléculas se unen a los sitios 1 y 2, mientras que sin excepción, los puntajes medianos y bajos se obtienen cuando los ligandos se unen a cualquier otro sitio potencial de unión. En un complejo con bajo puntaje por ejemplo, el ligando queda expuesto mayoritariamente al solvente y sólo unos cuantos átomos interactúan con los de la cavidad debido a la incompatibilidad en dimensiones. En una segunda etapa, los conformeros de los ligandos con puntaje *affinity* mejor que -7.5 fueron sometidos nuevamente a *docking* ahora únicamente en los sitios 1 y 2, pero probando 100 mil orientaciones con la intención de abarcar un mayor número de posiciones posibles. Este procedimiento permitió obtener complejos con mejores puntajes. Es de esperarse que un primer criterio de filtrado en la búsqueda de inhibidores de la actividad de la TsSOD-Cu/Zn haya sido el puntaje de *docking*. Los complejos proteína-ligando con puntajes *affinity* mejor que -8.6 fueron sometidos a una minimización de la energía local con la intención de mejorar las interacciones entre el ligando y receptor además de encontrar mínimos de energía de interacción: los conformeros son construidos ya sea por procesos sistemáticos o estocásticos con optimización de la energía, pero tratados como ligandos aislados y otro mínimo de energía proteína-ligando podría ser localizado permitiendo la optimización de las interacciones mediante reajustes geométricos en el complejo. El número de complejos proteína-ligando modelados que cumplieran con la restricción del puntaje *affinity* fue de 3 200, equivalentes a 180 distintos compuestos con puntajes que alcanzaban *affinity*= -9.9. Las posiciones de los conformeros en los modelos resultantes para una misma molécula con un RMSD menor a 1.5 Å se consideraron la misma.

Para la minimización de la energía probamos y evaluamos tres diferentes protocolos con el objetivo de optimizar las interacciones proteína-ligando. En el primer método, la molécula del receptor es considerada como rígida y sólo es permitido el movimiento de relajación del ligando (MMFF94x). En el segundo método, los residuos del sitio activo ( $\leq 4.5 \text{ \AA}$ ) y el ligando son minimizados energéticamente en el mismo paso mientras que el resto del receptor permanece rígido (MMFF94x/CHARMM27). Finalmente, en el método 3 todos los residuos a una distancia de  $4.5 \text{ \AA}$  respecto del ligando son sujetos a minimización de la energía manteniendo la estructura del receptor y ligando rígidas, luego, el ligando es relajado manteniendo las nuevas posiciones de los residuos y el resto del receptor fijo. El proceso termina cuando los residuos a  $4.5 \text{ \AA}$  del ligando son sometidos a minimización de la energía manteniendo, igual que la primera vez, el resto del receptor y ligando fijos (MMFF94x/CHARMM27). Este último método de minimización de tres pasos fue el que mejor optimizó los contactos proteína-ligando mediante re-arreglos geométricos de las cadenas laterales de los residuos en el sitio de unión y los átomos del ligando, reflejados en la energía potencial calculada. En la Tabla 2.2 se describe la energía de interacción de 25 de los 180 compuestos cuyos complejos proteína-ligando fueron sometidos a minimización de la energía, y en la Figura 2.4 está esquematizado el proceso de minimización en tres pasos del compuesto **3**.

La búsqueda de confórmeros y la minimización de energía en tres pasos implementada en este trabajo tienen la intención de simular parte de la respuesta conformacional que sufren la enzima y el ligando en el proceso de reconocimiento molecular proteína-ligando en sistemas biológicos. Con base a los resultados de minimización de la energía, un conjunto de cincuenta compuestos fueron seleccionados para realizar ensayos de inhibición directa con la enzima recombinante *TsSOD*-Cu/Zn pura. Los criterios aplicados para seleccionar estos cincuenta compuestos entre los mejores puntajes de *docking*, son: que la energía de interacción proteína-ligando después de la minimización de la energía en tres pasos mejorara; nos quedamos con los compuestos que formaron el mayor número de interacciones tipo puente de hidrógeno con el receptor; se tomó en cuenta la hidrofobicidad de los ligandos; se prefieren los compuestos de masa molecular menor a 500 Da; selectividad en la unión hacia la estructura de *TsSOD*-Cu/Zn sobre la de *HsSOD*-Cu/Zn; y robustez de la predicción y frecuencia de los compuestos entre los mejores puntajes *affinity*. Respecto a la hidrofobicidad, nos inclinamos por los compuestos más hidrofílicos pues es común que compuestos con valores bajos de hidrofobicidad sufran agregación cuando pasan de su disolución en DMSO a disoluciones acuosas que implican los ensayos *in vitro*. Para incrementar la selectividad, dimos preferencia a los compuestos que después de la minimización de energía de los complejos mantenían contactos con las cadenas laterales de residuos no conservados. Finalmente, robustez hace referencia a la frecuencia con que confórmeros de un mismo compuesto están entre los mejores puntajes. Adicionalmente a los cincuenta compuestos seleccionados como potenciales inhibidores de la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn

para realizar experimentos *in vitro*, fueron seleccionados diez compuestos más como control negativo. Entre éstos están compuestos con bajo puntaje de *docking*. Las estructuras y los puntajes de *docking* de los sesenta compuestos están descritos en las tablas 2 y 3 del apéndice. Entre las características fisicoquímicas principales de los compuestos seleccionados están: masa molecular comprendida entre 430 y 560 Da; Log*P* estimado menor de 5.5; no más de 10 grupos donadores/aceptores, estabilidad química, solubilidad en DMSO y alto grado de pureza. En general, el conjunto de los sesenta compuestos muestra una extensa diversidad de grupos funcionales.

### **Docking de antihelmínticos**

Experimentos de inhibición *in vitro* de *TsSOD*-Cu/Zn con antihelmínticos muestran que concentraciones de tiabendazol de 10, 100, 200 y 500  $\mu\text{M}$  reducen su actividad enzimática 14, 37, 52 y 100%, respectivamente, mientras que concentraciones de 10, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  de albendazol la reducen 14, 23, 32 y 100%, respectivamente. El tiabendazol no tiene efecto sobre la actividad de *BtSOD*-Cu/Zn (enzima homóloga a la de humano) en las concentraciones ensayadas, mientras que el albendazol reduce su actividad 25% a una concentración de 300  $\mu\text{M}$ .<sup>8</sup> Los datos de inhibición obtenidos se muestran gráficamente en la Figura 2.5(a) y los correspondientes valores de  $\text{IC}_{50}$  han sido incluidos para interpretar mejor los resultados. Para comparar, la Figura 2.5(b) muestra gráficamente el efecto de los mismos compuestos antihelmínticos sobre *BtSOD*-Cu/Zn. El resultado más sobresaliente es que la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn es significativamente inhibida por el albendazol y tiabendazol con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 206 y 212  $\mu\text{M}$ , respectivamente, mientras que la inhibición de *BsSOD*-Cu/Zn no se presenta o es consistentemente baja. Se observa diferente comportamiento de la inhibición de la enzima de tenia con los antihelmínticos aunque los dos son igual de efectivos y podrían estar actuando como inhibidores competitivos.

El albendazol y el tiabendazol comparten la estructura base del bencimidazol, son moléculas de tamaño pequeño y neutras (MM 265.34 y 218.29 Da, respectivamente) y son en general, estructuras rígidas (Figuras 2.6(a) (b) y (c)). Ambos compuestos poseen sustituyentes en la posición 2, metil carbamato para el albendazol y 4-tiazolil para el tiabendazol. Adicionalmente el albendazol posee un grupo propilsufanilo en la posición 5.

Cmp.	Puntaje de docking	Antes de minimizar la energía			Después de minimizar la energía		
		E <sub>interac</sub>	vdW	elec	E <sub>interac</sub>	vdW	elec
1	-8.6	39.77	22.80	16.97	-70.18	-37.56	-32.52
2	-8.7	336.95	326.47	10.48	-60.70	-37.70	-22.99
3	-8.8	10.48	-2.37	12.85	-73.42	-35.01	-38.41
4	-9.0	163.17	152.62	10.55	-62.56	-41.78	-20.78
5	-9.0	163.38	158.58	4.80	-47.37	-33.43	-13.94
6	-8.9	78.03	51.23	26.80	-23.18	15.53	-7.65
7	-8.9	2036.0	2009.0	27.11	-59.08	-46.81	-13.27
8	-9.3	57.56	50.04	7.52	-69.07	-37.42	-31.64
9	-9.4	32.18	17.30	14.81	-76.45	-34.49	-41.96
10	-9.9	99.64	93.45	6.19	-73.07	-31.41	-41.66
11	-9.8	8.19	-3.08	11.27	-88.01	-42.40	-45.63
12	-9.1	47.02	45.42	1.59	-78.03	-38.06	-40.23
13	-9.7	38.33	6.80	31.53	-80.45	-33.57	-46.80
14	-9.2	-25.24	-19.06	-6.18	-59.77	-37.07	-22.70
15	-9.0	9.16	0.057	9.11	-69.47	-30.99	-38.47
16	-9.2	31.96	21.28	10.68	-73.74	-26.93	-46.80
17	-9.5	63.83	46.08	17.74	-64.24	-29.32	-34.92
18	-9.0	5.38	4.63	0.74	-71.72	-32.57	-39.15
19	-9.3	23.69	11.33	12.36	-50.75	-40.03	-10.72
20	-9.0	1071.86	1052.11	19.73	-55.46	-28.21	-27.25
21	-9.1	148.9	135.73	13.17	-76.96	-38.92	-38.04
22	-9.5	-1.94	-7.82	5.88	-65.80	-31.05	-34.75
23	-8.7	-13.10	-24.46	11.35	-47.60	-35.02	-12.57
24	-9.0	51.84	41.11	10.73	-94.79	-33.62	-61.17
25	-9.0	45.38	56.84	-1146	-97.48	-34.12	-63.36

Tabla 2.2. Energías de interacción y puntajes de *docking* antes y después de minimización la energía para 25 de los mejores puntajes proteína-ligando seleccionados para su análisis. Los algoritmos *docking* tienen como finalidad, enriquecer el número de hits a partir de una base de datos de ligandos potenciales más que predecir cuantitativamente energías de unión o el ranking de unión exacto de compuestos. En lugar de ello, los procedimientos de *docking* han demostrado ser complementarios a los experimentos *in vitro*, como lo hemos demostrado aquí. vdW y elec son, respectivamente, la contribución van der Waals y electrostática a la energía total en kcal/mol.

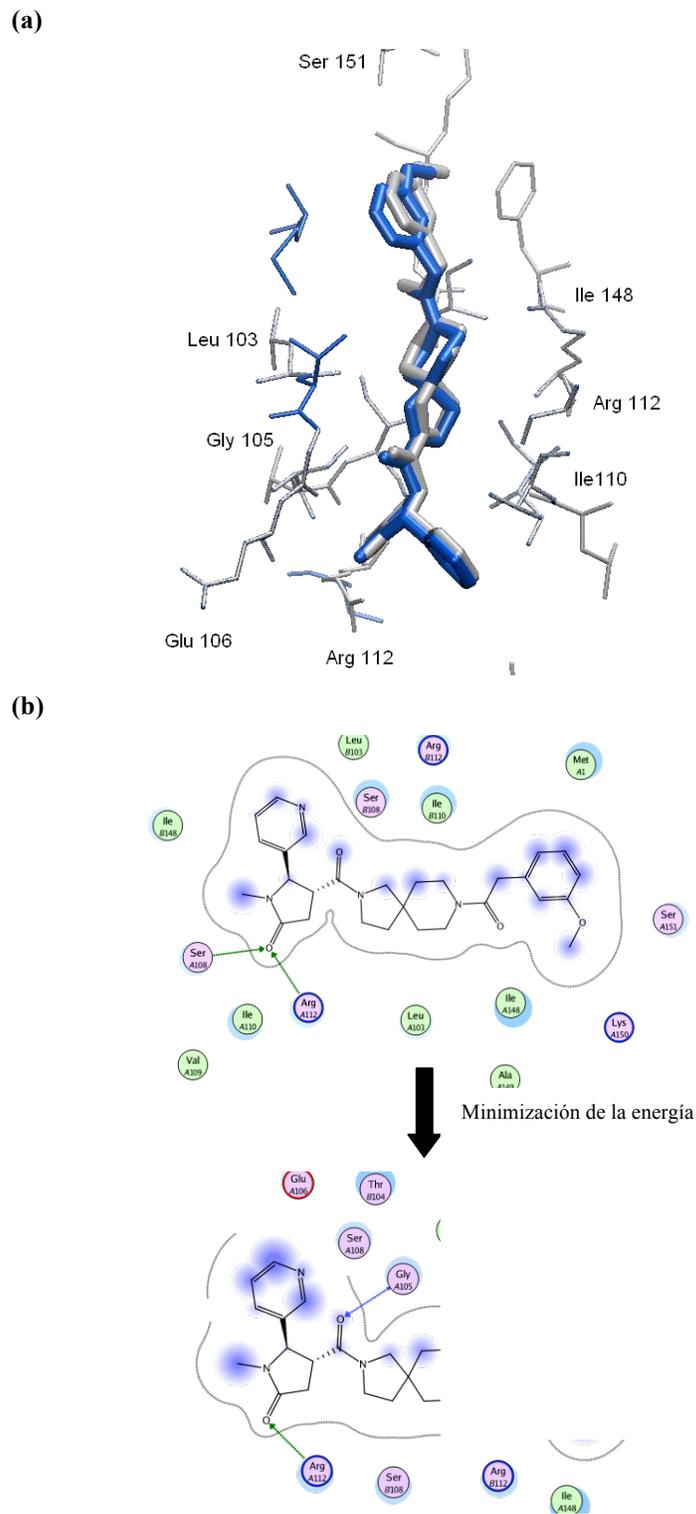


Figura 2.4. Minimización de energía en tres pasos (método 3, ver Desarrollo experimental) de un complejo proteína-ligando. Han sido mimimizadas las interacciones del compuesto **15** con los residuos a 4.5 Å de distancia respecto del ligando en el sitio 1. (a) Representación tridimensional de la superposición del ligando antes y después de la optimización de las interacciones en el sitio de unión. (b) Representación bidimensional de las interacciones del ligando con los residuos a 4.5 Å en el sitio de unión antes y después de la minimización de la energía. Se muestran las interacciones tipo puente de hidrógeno mediante flechas.

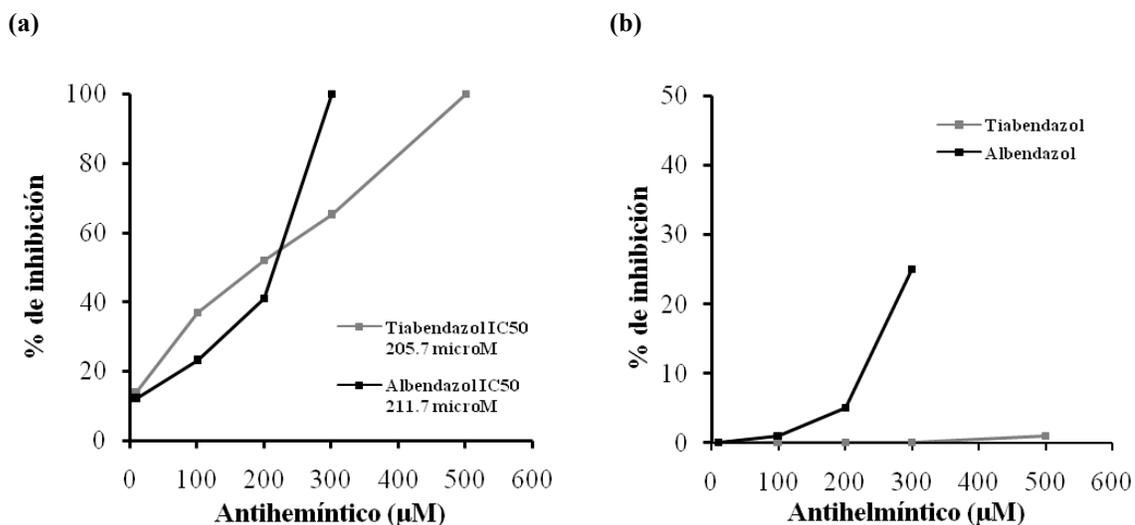


Figura 2.5. Inhibición *in vitro* de SOD-CuZn de (a) *T. solium* y (b) *B. taurus* con los compuestos antihelmínticos albendazol y tiabendazol. Los valores presentados son la media de tres determinaciones independientes. Los ensayos de inhibición fueron realizados por el método de la xantina-xantina-oxidasa. Los valores de IC<sub>50</sub> fueron calculados a partir de un ajuste polinomial de la gráfica Log[Antihelmíntico] vs % de inhibición a las concentraciones ensayadas (10, 100, 200, 300 y 500 μM).

Son ampliamente conocidos los compuestos de coordinación de Cu(II) con diversos ligantes heterocíclicos aromáticos y no aromáticos monodentados y polidentados incluyendo al bencimidazol,<sup>40</sup> e incluso formando complejos con actividad antitumoral.<sup>41</sup> Recientemente,<sup>42</sup> han sido sintetizados una serie de complejos de Cu(II) con albendazol como ligando y donde éste actúa como ligante bidentado a través del O (C=O) del carbamato y el nitrógeno (NH) del anillo de bencimidazol. La estructura sugerida por difracción de rayos X para [CuCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O(HABZ)] es piramidal cuadrada y donde el número de coordinación para el cobre es 5. Complejos de Cu(II) con el ligante tiabendazol también han sido sintetizados.<sup>43-46</sup> El cobre (II) tiene una configuración 3d<sup>9</sup> capaz de formar compuestos con números de coordinación 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con geometrías trigonal plana, tetraédrica cuadrada plana, octaédrica distorsionada bipiramidal trigonal, octaédrica, pentagonal bipiramidal y dodecaedro distorsionado, respectivamente.<sup>47</sup>

Son escasos los trabajos dirigidos al diseño de inhibidores de la actividad de enzimas superóxido dismutasa a pesar de ser estas proteínas posibles blancos para tratamiento de varias parasitosis.<sup>48</sup> En este sentido, ha sido descrita la síntesis de derivados del benzo[g]ftalazina funcionalizados con anillos de piradizina sustituidos con cadenas alquil-aminadas así como de derivados 1, 4-dialquilaminobenzo[g]ftalazinas con actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).<sup>49-51</sup> Estos compuestos actúan complejando al centro metálico de los sitios activos de SOD-Fe de *T. cruzi*. Con base en la definición de ligando, el albendazol y tiabendazol bien podrían actuar como ligandos

mono o polidentados a través de los varios heteroátomos con pares de electrones libres que poseen (N, O y S).

MOE\_*FlexibleAlignment* permite determinar, mediante un alineamiento flexible de las estructuras 3D de las moléculas, características comunes a dos o más moléculas orgánicas con actividad biológica similar. El alineamiento es cuantificado en términos de la tensión interna generada en las estructuras y la maximización de las características moleculares comunes durante la superposición de las moléculas. Algunas de las propiedades atómicas tomadas en cuenta son: la hidrofobicidad, aromaticidad, carga parcial, volumen, acidez y basicidad, etc. Dos moléculas con actividad biológica y propiedades atómicas similares probablemente se unen a su receptor del mismo modo u orientación. El alineamiento flexible de ambos antihelmínticos indica que las propiedades fisicoquímicas son complementarias a lo largo de las estructuras cuando queda superpuesta la estructura de bencimidazol (Figura 2.7).

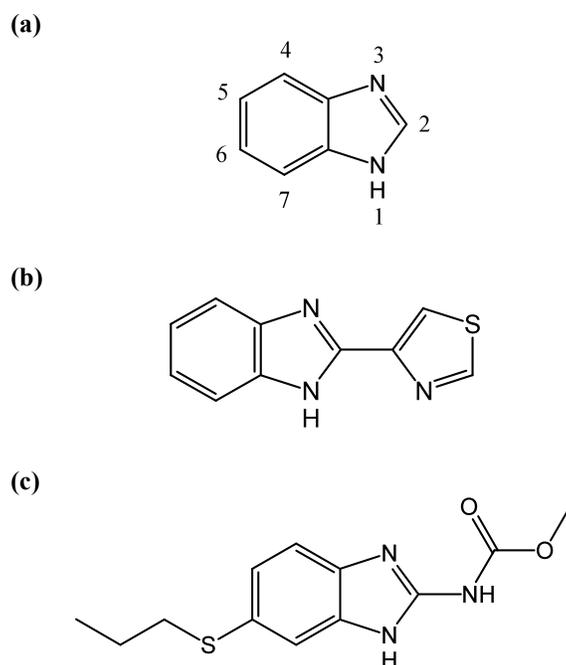


Figura 2.6. Estructura química de algunos derivados del bencimidazol que han mostrado actividad inhibitoria experimental de SOD-Cu/Zn de *Taenia solium*. (a) Estructura de bencimidazol, 1*H*-bencimidazol. (b) Tiabendazol, 2-(4-tiazolil) bencimidazol y (c) Albendazol, metil-5-(propiltio)-2-bencimidazolcarbamato.

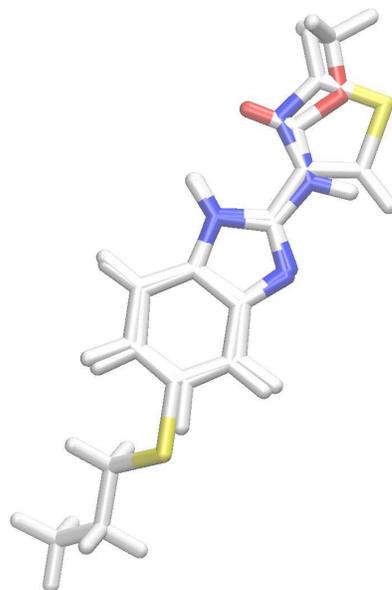


Figura 2.7. Alineamiento flexible usando MOE\_*FlexibleAlignment* de las estructuras 3D del albendazol y tiabendazol. El cálculo muestra que existen propiedades físicas y químicas similares cuando la estructura de bencimidazol común en ambas se superpone. Esto último podría sugerir que la actividad inhibitoria de ambos compuestos sobre *TsSOD-Cu/Zn* esté llevándose mediante el mismo mecanismo de unión al receptor.

El análisis de los resultados obtenidos con *docking* con los compuestos antihelmínticos sobre los 21 sitios potenciales de unión de ligandos, localizados en la superficie de la estructura tridimensional de *TsSOD-Cu/Zn*, indica que ambos compuestos tienen preferencia por los sitios potenciales de unión 13 y 14 que son los sitios de la catálisis en los monómeros A y B, respectivamente: los mejores puntajes *affinity* se obtienen cuando el albendazol y tiabendazol se posicionan en el sitio de la catálisis en donde ambos compuestos encuentran excelente complementariedad geométrica e interacciones intermoleculares tipo puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, y un enlace al centro metálico Cu(II) (*affinity* ≤ -8.5). Los puntajes *affinity* conseguidos cuando los ligandos se unen a cualquier otro sitio potencial de unión son siempre mayores, es decir, los complejos resultantes se consideran menos favorables (*affinity* ≥ -8.5). Particularmente, los sitios 13 y 14 son concavidades hidrofóbicas bien definidas e idóneas para alojar compuestos, también hidrofóbicos como el albendazol y tiabendazol (solubilidad del albendazol y tiabendazol 0.56 y 30 mg/L a 20°C, respectivamente<sup>52</sup>). Una propuesta consenso de unión del albendazol y tiabendazol al sitio 13 es la que se muestra en las Figuras 2.7 y 2.8. La unión de estas mismas moléculas al sitio 14 es similar y sin diferencias importantes.

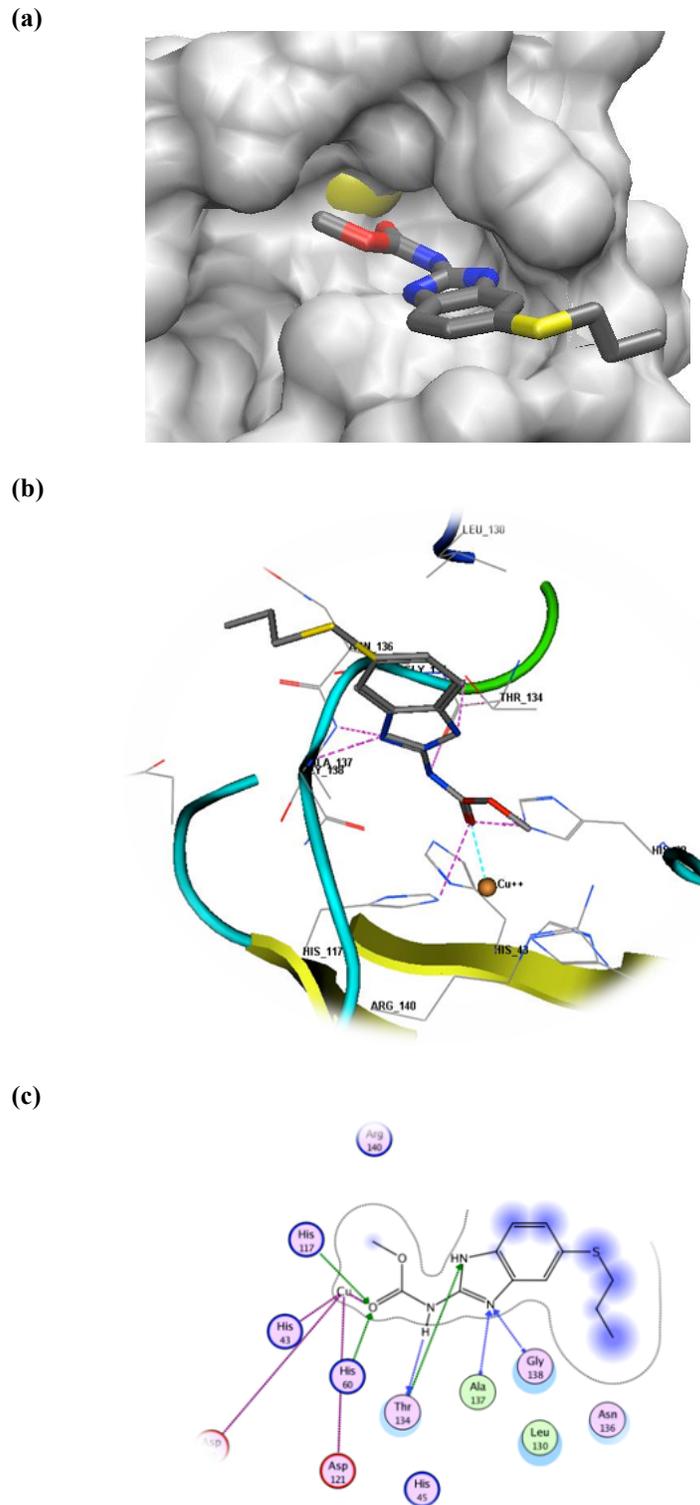
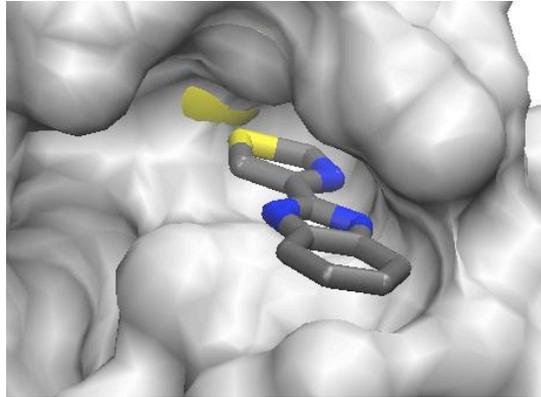
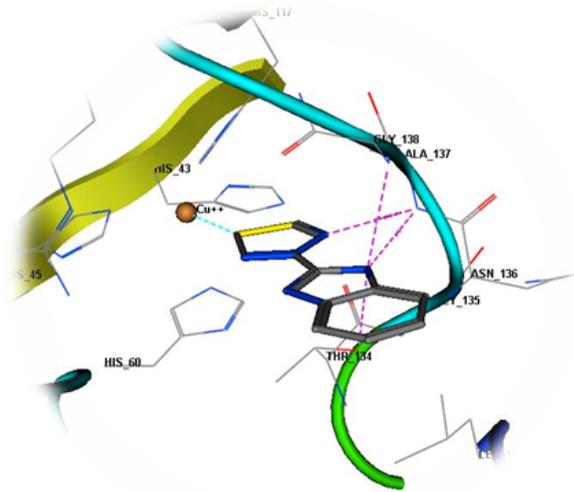


Figura 2.8. Unión complementaria del albendazol y la estructura tridimensional de *TsSOD*-Cu/Zn. (a) y (b) El albendazol se ajusta a la cavidad del sitio de la catálisis sobre la superficie de la estructura tridimensional de la *TsSOD*-Cu/Zn mediante varias interacciones no covalentes con ésta. (c) Representación 2D de la interacción del albendazol en el sitio de unión. Las flechas azules y verdes indican interacciones tipo puente de hidrógeno y las líneas rojas interacciones metal-átomo.

(a)



(b)



(c)

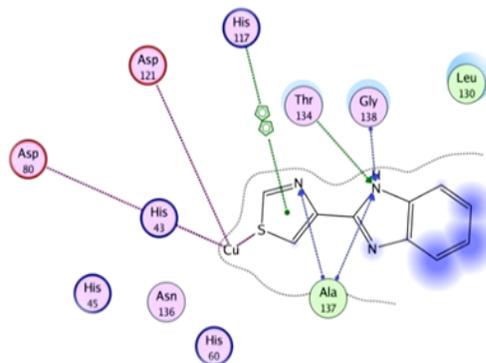


Figura 2.9. Unión complementaria del tiabendazol y la estructura tridimensional de *TsSOD*-Cu/Zn. (a) y (b) El albendazol se ajusta a la cavidad del sitio de la catálisis sobre la superficie de la estructura tridimensional de la *TsSOD*-Cu/Zn mediante varias interacciones no covalentes con ésta. (c) Representación 2D de la interacción del albendazol en el sitio de unión. Las flechas azules y verdes indican interacciones tipo puente de hidrógeno y las líneas rojas interacciones metal-átomo.

La figura 2.8(a) muestra el sitio de unión del albendazol en representación de isosuperficie y la orientación en que se une el ligando al sitio de la catálisis de *TsSOD*–Cu/Zn. El albendazol está orientado hacia adentro de la cavidad con el grupo carbamato interaccionando con el ión cobre. Una representación más detallada de la unión es la Figura 2.8(b). En esta última es posible apreciar las interacciones intermoleculares que se forman entre el albendazol y el receptor: seis interacciones tipo puente de hidrógeno y una metálica, principalmente. El enlace metálico entre el O (C=O) en el albendazol y el Cu(II) con distancia de enlace de 2.9 Å podría estar encausando la unión del albendazol a ese sitio en la orientación predicha. Los enlaces de coordinación del Cu(II) con los nitrógenos del grupo imidazol ( $d_{\text{Cu-His60}}$  2.4 Å,  $d_{\text{Cu-His45}}$  2.2 Å,  $d_{\text{Cu-His43}}$  2.2, Å  $d_{\text{Cu-His117}}$  2.2 Å) de los cuatro residuos de histidina permanecen en el modelo resultante y forman, junto al del albendazol, una geometría bipiramidal cuadrada distorsionada respecto al cobre. Todos los residuos de interacción (4.5 Å) en la enzima de tenia están conservados en bovino (*i.e.* H45, H61, H118, L131, T137, G138, N139, A140, G141, G142, R140) pero este mismo sitio de unión en bovino es una cavidad menos profunda y más amplia y no está favorecida la unión de ligandos como albendazol y tiabendazol (Figura 2.10). Los resultados de *docking* del albendazol y tiabendazol sobre el sitio de la catálisis en la enzima de bovino, no incluyen modelos de unión en los que estas moléculas formen interacciones metálicas con el ión cobre. Los puntajes de unión para ambos ligandos son menores que los obtenidos cuando el receptor es *TsSOD*–Cu/Zn (*affinity* ≥ 6), y la unión predicha posiciona a los ligandos a lo largo del canal electrostático por el que viaja el radical superóxido hacia el Cu(II), a unos 10 Å de él, y las interacciones intermoleculares se reducen a uno o dos interacciones tipo puente de hidrógeno con residuos conservados entre el tiabendazol y el albendazol, respectivamente.

La Figura 2.8(c) es una representación bidimensional de las interacciones del albendazol con los residuos a una distancia menor de 4.5 Å en el sitio de unión en *TsSOD*–Cu/Zn después de la minimización de la energía en tres pasos (ver Desarrollo experimental). Se muestran las interacciones tipo puente de hidrógeno y metálica mediante flechas y líneas coloreadas, respectivamente.

La unión del tiabendazol a su sitio de unión preferente en una orientación representativa se muestra esquemáticamente en la Figura 2.9. *MOE\_FlexibleAlignment* predecía que el tiabendazol podría tener preferencia por el sitio de unión del albendazol, y unirse en la misma orientación dadas las propiedades físicas y químicas semejantes. Una interacción metálica entre el azufre del anillo del tiazolilo y el Cu(II) se presenta con una distancia de unión de 2.2 Å. El sitio de la catálisis en la plastocianina, una proteína cúprica involucrada en la cadena de transporte de electrones, se puede describir como una estructura piramidal trigonal distorsionada: el plano trigonal de la base piramidal está compuesto por dos átomos de N (N1 y N2) de diferentes histidinas y un S (S1) de una cisteína, y el S (S2) de una metionina axial forma el ápice.<sup>70</sup> Las distancias de enlace que se observan en los

enlaces Cu-S1 y Cu-S2 son 2.07 y 2.08 Å, respectivamente. Adicional al enlace de azufre en el albendazol y el Cu(II), se presentan tres interacciones tipo puente de hidrógeno.

Finalmente, la avidina es una glicoproteína tetramérica de unión a biotina. Las cuatro subunidades de la proteína son idénticas y cada una de ellas puede unirse a biotina con elevada afinidad y especificidad, siendo uno de los enlaces no covalentes más fuertes que se conocen ( $K_D \sim 10^{-15}$  M). El lapatinib es un inhibidor de la tirosina quinasa que interrumpe la vía del receptor de crecimiento EGFR y en forma de ditosilato de lapatinib es un medicamento usado en la quimioterapia para el cáncer de seno y otros tumores sólidos. Están reportadas las estructuras tridimensionales de los complejos avidina-biotina y de lapatinib-EGFR, PDB ID 2AVI y 1XKK, respectivamente. Estos complejos fueron usados para validar nuestro procedimiento de *docking*. Las moléculas y los conformeros de los ligandos biotina y lapatinib fueron construidos como se hizo para los derivados del albendazol. Luego, se llevó a cabo la simulación del acoplamiento molecular seguido de minimización de la energía sólo del ligando, y los resultados fueron valores *affinity* de -11.3 y -10.1 para el lapatinib y biotina, respectivamente, mientras que los valores de RMSD respecto a la posición determinada cristalográficamente fueron de 1.5 y 1.01 Å. Esto último sugiere que las posiciones modeladas para ambos ligandos son muy parecidas a la experimental.

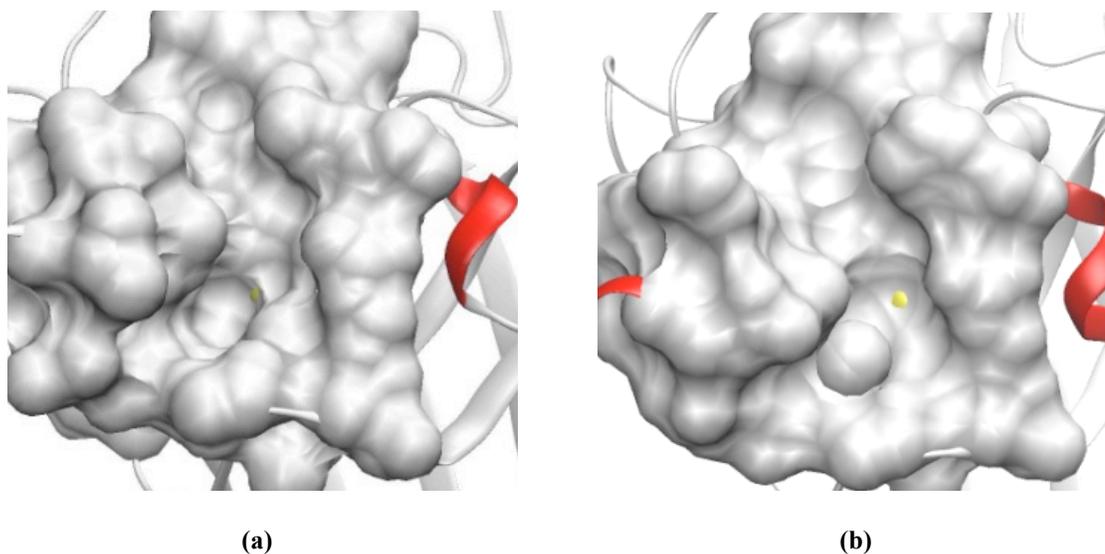


Figura 2.10. Representación de isosuperficie de los sitios de la catálisis en los monómeros A de: (a) estructura tridimensional de *TsSOD*-Cu/Zn y, (b) de *BtSOD*-Cu/Zn.

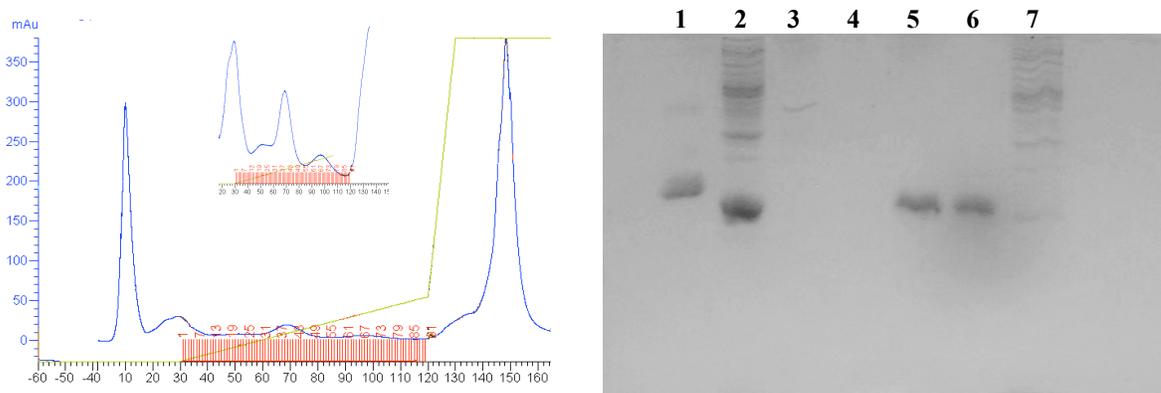
### 3.4. Purificación de la enzima recombinante *TsSOD*-Cu/Zn

El extracto soluble obtenido de un cultivo de bacterias *E. coli*-BL21 transformadas con actividad de SOD, se hizo pasar a través de una columna cromatográfica de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex) equilibrada con amortiguador de fosfatos pH 7.5, ver Materiales y métodos para más detalles. En la Figura 2.11 está representado de manera esquemática, el seguimiento de la purificación de la enzima *TsSOD*-Cu/Zn por cromatografía FPLC y geles PAGE-SDS. La figura 2.11(a) corresponde al cromatograma y al gel PAGE-SDS con los resultados obtenidos de esta primera cromatografía. En esta figura el eje de las abscisas representa el volumen de eluyente, el de las ordenadas la absorbancia de la muestra medida a una longitud de onda de 280 nm ( $Abs_{280nm}$ ) y la línea verde la concentración de solución de NaCl 1 M usada para desprender a las proteínas unidas a la columna (gradiente salino). En el cromatograma pueden apreciarse dos picos sobresalientes de intensidades 300 y 400 mUA, hacia el inicio y final respectivamente. Otros picos de menor intensidad se localizan entre los más sobresalientes y que, junto con el pico de 400 mUA constituyen la parte unida a la columna. Para su posterior análisis, fueron reunidas las fracciones que constituían a cada uno de los picos y fueron etiquetadas como pico 1, pico 2, etc. La secuencia de la *TsSOD*-Cu/Zn contiene cinco residuos de fenilalanina y ninguno triptófano y tirosina, razón por la cual su coeficiente de absorción estimado<sup>53</sup> a  $\lambda = 280$  nm es bajo,  $\epsilon_{280} = 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Para una proteína común como la seroalbúmina bovina de 607 residuos y que contiene treinta residuos de fenilalanina, 21 de tirosina y 3 de triptófano tiene un valor del coeficiente de absorción de  $\epsilon_{280} = 43\,824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Esto nos indica que la señal de absorbancia de una muestra de *TsSOD*-Cu/Zn será mucho menor a la de una muestra de seroalbúmina bovina a la misma concentración.

En el gel PAGE-SDS, el carril 1 ha sido cargado con muestra de SOD-Cu/Zn de humano con masa molecular aproximada de 17 kDa, la cual servirá como referencia para estimar masas moleculares; el carril 2 contiene muestra del lisado celular que se hizo pasar a través de la columna DEAE-Sephadex pH 7.5. En este último carril pueden apreciarse varias bandas correspondientes a proteínas de masa molecular variada sobresaliendo por su intensidad, una de masa molecular aproximada de 16 kDa que podría corresponder a la SOD de tenia sobre-expresada. Los carriles 3 y 4 contienen fracciones no unidas a la columna (pico 1 y 2, respectivamente) y que fueron eluidas con el primer lavado a la columna. El resto de los carriles, los carriles 5, 6 y 7, contienen muestras de proteínas que se unieron a la columna (picos 3, 4 y 5, respectivamente) con diferente fuerza y que tuvieron que ser eluidas con un gradiente de solución salina. En los carriles 5 y 6 sólo es posible apreciar una única banda de masa molecular aproximada de 16 kDa: ambas muestras presentan actividad de SOD, pero baja respecto a la esperada para una muestra de *TsSOD*-Cu/Zn pura. La baja actividad catalítica en estas dos muestras sugiere que pudieran estar contaminadas. En la Figura 2.12

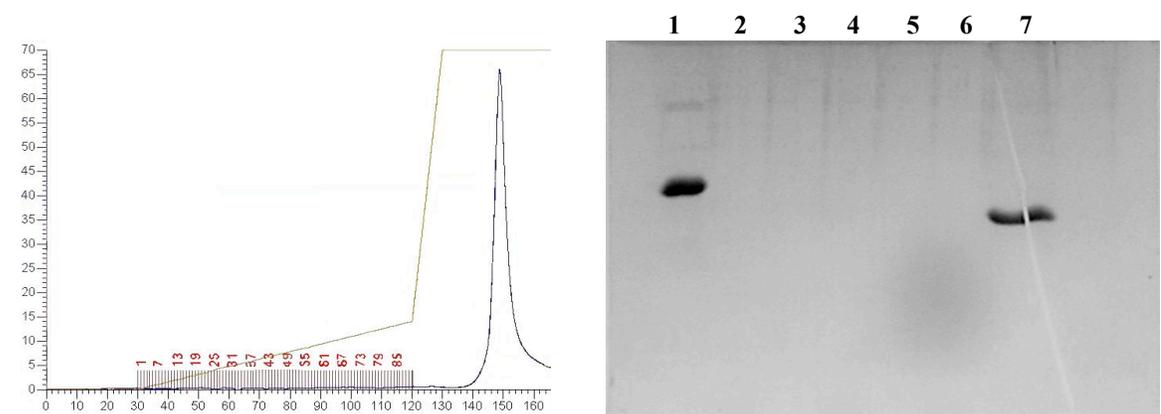
se muestran las curvas de determinación de las actividades de diferentes fracciones de SOD. Finalmente, la muestra contenida en el carril 7, correspondiente al pico 5 y eluida con 100% de solución salina, contiene el resto de proteínas que también se unieron a la columna pero con mucho más fuerza. Las muestras están constituidas por proteínas de masa molecular variada (de 10 a 100 kDa) pero ninguna de ellas en cantidades mayores a la de masa molecular aproximada de 16 kDa descrita anteriormente.

(a)



Carril 1: SOD-Cu/Zn de humano, MM 16 kDa. 2: Lisado de células *E. coli* BL21 transformadas. 3: Pico 1. 4: Pico 2. 5: Pico 3. 6: Pico 4. 7: Pico 5.

(b)



Carril 1: SOD-Cu/Zn de humano, MM 16 kDa. 2: Fracciones 1-20. 3: Fracciones 21-40. 4: Fracciones 41-60. 5: Fracciones 61-80. 6: Fracciones 81-90. 7: Pico 1

Figura 2.11. Seguimiento de la purificación de SOD-Cu/Zn de *T. solium*. (a) Extracto soluble de células *E. coli* BL21 transformadas pasado por una columna DEAE-Sephadex de intercambio aniónico (pH 7.5) y PAGE-SDS al 12% de los picos del cromatograma. (b) Cromatografía DEAE-Sephadex de intercambio aniónico (pH 8.9) y PAGE-SDS al 12% aplicados a las Picos 3 y 4 obtenidos en la primera cromatografía. La línea verde en los cromatogramas representa el gradiente salino.

Se decidió juntar las muestras correspondientes a los picos 3 y 4 y cromatografiarlas en la misma columna, pero ahora equilibrada con amortiguador de fosfatos pH 8.9. La figura 2.11(b) corresponde al cromatograma y PAGE-SDS de la segunda cromatografía.

El cromatograma de esta segunda columna muestra un pico bastante intenso al 100% de gradiente salino (volumen de elución entre 140 y 160 mL aproximadamente). En el gel PAGE-SDS, el carril 7 que contiene muestra del pico 1 presenta una única banda de masa molecular aproximada de 16 kDa.

La actividad específica de esta muestra, determinada por el método de xantina-xantina-oxidasa, fue de 2 857.1 (Figura 2.12(c)). Este valor en la actividad específica es congruente con el descrito por Castellanos *et al.*<sup>8</sup> para la SOD-Cu/Zn recombinante de *T. solium* y con un valor de la actividad específica de 2 900 U/mg, comparable con la de otros organismos eucariontes tales como la de humano y bovino.<sup>54</sup> La actividad de la muestra de *HsSOD*-Cu/Zn calculada por el mismo método fue de 4 000 U/mg de proteína.

Con la finalidad de determinar el tipo de co-factor de la enzima purificada, se realizaron ensayos de inhibición con concentraciones crecientes de dos inhibidores específicos de enzimas SOD, el KCN, inhibidor específico de la enzima dependiente de Cu y Zn y, el NaN<sub>3</sub>, inhibidor específico de la de Mn. Ambos inhibidores actúan fijándose fuertemente a los cofactores metálicos impidiendo que se realice la catálisis. Los resultados indican que el KCN inhibe el 95% de la actividad enzimática de las muestras cuando la concentración del inhibidor es igual a 10 mM, mientras que a las mismas concentraciones, el NaN<sub>3</sub> no afecta la actividad de la enzima. Se concluyó que la enzima purificada es de tipo Cu/Zn. La bacteria *E. coli* también expresa dos enzimas SOD a saber, la SOD-Cu/Zn y SOD-Mn con masas moleculares aproximadas de 17 y 23 kDa, respectivamente, y por lo tanto, en caso de una co-purificación se esperaría observar más de una banda en un gel PAGE-SDS. Además se sabe que la SOD-Cu/Zn se encuentra anclada al periplasma de la bacteria<sup>55</sup> por lo que suponemos que esta proteína se encuentra en la fracción insoluble de la expresión.

Como prueba definitiva para la identificación de la enzima purificada, se realizó un experimento de inmunotransferencia con anticuerpos específicos para *TsSOD*-Cu/Zn. La Figura 2.13 muestra el reconocimiento de los anticuerpos específicos IgG hacia una banda de aproximadamente 16 kDa, contenida en una muestra de lisado de *E. coli* transformadas e inducidas y por la correspondiente a la muestra de la SOD-Cu/Zn purificada, ahora denominada *TsSOD*-Cu/Zn. El rendimiento del proceso de purificación fue de 5 mg/L totales como producto de la expresión.

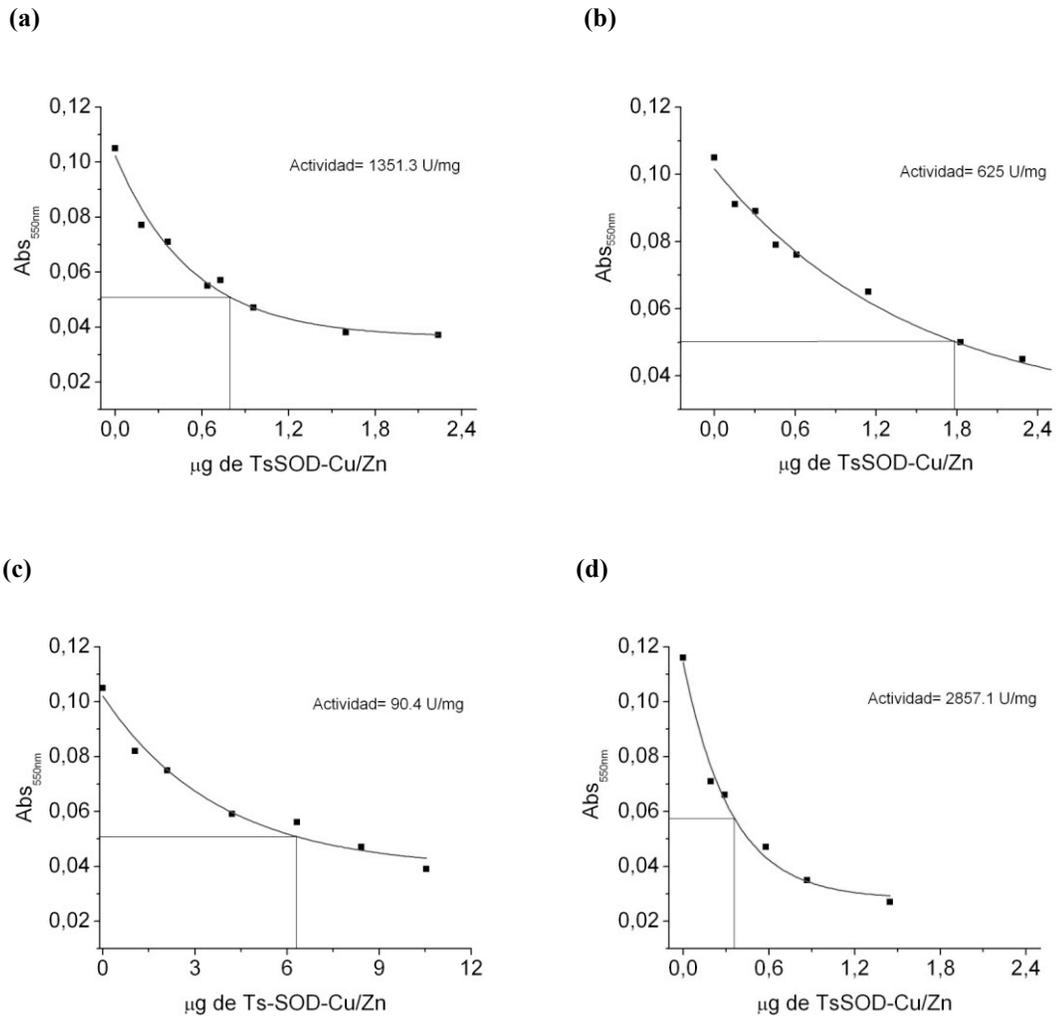


Figura 2.12. Determinación de las unidades de actividad específica de la *TsSOD-Cu/Zn* de *T. solium* obtenidas en las diferentes etapas de la purificación. En la gráfica se observa el efecto del incremento de la concentración de SOD sobre la reducción del citocromo c. Una unidad de actividad se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% la reducción del citocromo c. Actividad específica de (a) Pico 3, (b) Pico 4 y (c) Pico 5 obtenidos en la cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sephadex pH 7.5 y, (d) Pico 1 obtenido de la cromatografía de intercambio aniónico DEAE-Sephadex pH 8.9. En la figura (d) la flecha indica que 0.346 µg de proteína equivalen a 1 U de SOD por lo que la actividad específica de esa muestra de proteína es 2 857 U/mg.

Una característica importante aprovechada durante la purificación de la *TsSOD-Cu/Zn* fue la alta solubilidad que presenta, ya que esto nos permitió separarla de la mayoría de las proteínas no solubles de *E. coli*, obteniendo una buena cantidad de proteína desde el primer sobrenadante producto de la centrifugación de las bacterias liofilizadas. La cantidad total de *TsSOD-Cu/Zn* pura, con actividad específica 2 857 U/mg fue de 2.02 mg.

Estudios previos de caracterización de *TsSOD-Cu/Zn* muestran que esta proteína tiene una masa molecular de alrededor de 30 kDa por lo que se establece que la proteína es dimérica con subunidades de aproximadamente 15.5 kDa. Este resultado es congruente con otros estudios, ya que

se sabe que las SOD–Cu/Zn de eucariontes son activas solamente como dímeros mientras que las de procariontes son activas solamente como monómeros.<sup>55</sup>

Estudios recientes realizados con la enzima *TsSOD*–Cu/Zn recombinante pura demuestran que la actividad no se ve afectada por el incremento de la temperatura en el intervalo entre 10-37°C después de incubar a la proteína por 30 min. No obstante, a 80°C la actividad decrece abruptamente (20% de actividad residual) a los cinco minutos de calentamiento para luego mantenerse constante hasta los 30 min. La actividad se pierde después de diez minutos de incubación a una temperatura de 100°C. De manera interesante, la adición de iones Cu(II) o Zn(II) al ensayo incrementa la estabilidad de la enzima de tal modo que la actividad prácticamente no se ve afectada a 80°C durante 30 min. Experimentos de cromatografía de filtración en gel, espectrometría de masas y dispersión dinámica de luz, también en presencia de un exceso de iones Zn(II) o Cu(II), demostraron que la proteína puede oligomerizar.<sup>16</sup> Una vez obtenidos estos resultados, una tarea importante en el desarrollo de este trabajo fue confirmar la reproducibilidad de la purificación.

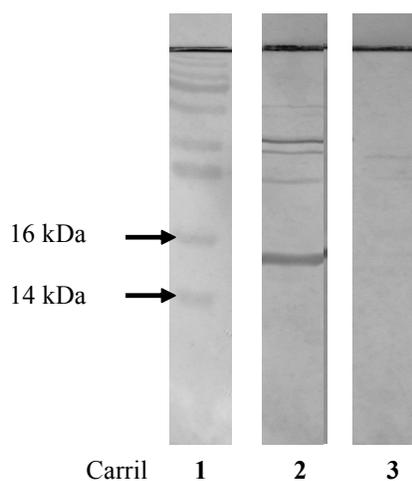


Figura 2.13. Caracterización de la enzima recombinante *TsSOD*–Cu/Zn. Inmunotransferencia con anticuerpos anti-*TsSOD*–Cu/Zn contra: carril 2, extracto crudo de *E. coli*-BL21 transformadas e inducidas con IPTG; carril 3, *TsSOD*–Cu/Zn recombinante pura. Carril 1, marcadores de masa molecular.

### Resumen de la purificación.

Paso	Vol. (mL)	Conc. de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total	Veces purificada
Extracto crudo	5	8.30	41.5	345.3	14 329.9	-----
1 <sup>ra</sup> DEAE (pH 7.5)	5	1.07	5.35	1 351	7 227.1	4.0
2 <sup>da</sup> DEAE (pH 8.9)	5	0.41	2.0	2 857	5 856.6	8.3

### 3.5. Ensayos de inhibición de la actividad de las enzimas *TsSOD-Cu/Zn* y *HsSOD-Cu/Zn* con compuestos LeadQuest<sup>®</sup>

El albendazol es un fármaco de la familia de los bencimidazoles que ha sido utilizado ampliamente en el tratamiento de la cisticercosis. Su mecanismo de acción no está totalmente comprendido, aunque se sabe que pudiera estar actuando como inhibidor de la polimerización de actina afectando la formación del citoesqueleto. Adicionalmente a lo anterior, otros estudios indican que algunos bencimidazoles y otros compuestos derivados de la pirimidina son capaces de inhibir la actividad de las enzimas fumarato deshidrogenasa y las SOD de algunos parásitos.<sup>56-58</sup> Los experimentos no son determinantes pues se utilizan extractos crudos de parásitos y no se sabe si los fármacos están actuando directa o indirectamente sobre las enzimas. Nuestro grupo de investigación describió previamente la inhibición de la *TsSOD-Cu/Zn* por dos bencimidazoles comerciales, el tiabendazol y el albendazol. Los resultados indicaron que a concentraciones de 500 mM y 300 mM de tiabendazol y albendazol, respectivamente, se consigue inhibir casi la totalidad de la actividad de la enzima. A estas mismas concentraciones los compuestos no tienen efecto alguno sobre la actividad de *BtSOD-Cu/Zn*.<sup>8</sup> Esta diferencia en actividad inhibitoria sugiere que existen contrastes estructurales que pueden aprovecharse para el desarrollo de inhibidores específicos para la enzima *TsSOD-Cu/Zn*.

Durante el *docking*, estas diferencias estructurales junto con otras características fueron aprovechadas para seleccionar un conjunto de cincuenta compuestos con potencial actividad inhibitoria de la *TsSOD-Cu/Zn*. Es así como todos los compuestos candidatos fueron evaluados como potenciales inhibidores de la actividad de *TsSOD-Cu/Zn* a varias concentraciones siendo la

mayor de 100  $\mu\text{M}$ ; sólo seis mostraron actividad inhibitoria  $> 30\%$  a las concentraciones ensayadas. Dado que el interés de este trabajo es encontrar compuestos que inhiban selectivamente a la *TsSOD*-Cu/Zn, fue evaluada la actividad de estos seis compuestos más activos sobre la enzima homóloga humana *HsSOD*-Cu/Zn.

En la Figura 2.14 se aprecia el efecto que tienen diferentes concentraciones de cada uno de los seis compuestos LeadQuest<sup>®</sup> más activos sobre la actividad enzimática de la *TsSOD*-Cu/Zn. En la Tabla 2.3 están representadas las estructuras químicas de estos seis compuestos: se escribe el nombre IUPAC de cada uno de ellos; el puntaje para el mejor complejo proteína-ligando modelado con cada compuesto; el  $\text{IC}_{50}$  para los casos en que se determinó, y; el sitio activo de unión más frecuente con base al *docking*.

Concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  del compuesto **2** reducen la actividad catalítica de la *TsSOD*-Cu/Zn en 13 y 73%, respectivamente. Para este mismo compuesto y concentraciones, la actividad de la enzima homóloga en humano no se ve afectada. Más sobresaliente es el resultado obtenido con el compuesto **4** que disminuye la actividad de la *TsSOD*-Cu/Zn de tenia en 95% cuando su concentración es 50  $\mu\text{M}$ , y de 53% cuando la concentración es 30  $\mu\text{M}$ ; a las mismas condiciones experimentales, la actividad de la *HsSOD*-Cu/Zn no se ve afectada. Cabe mencionar que el aumento de la concentración de este compuesto (compuesto **4**), por ejemplo a 75 o 100  $\mu\text{M}$ , conlleva aparición de turbidez en el medio de reacción impidiendo determinar su efecto sobre la actividad de las enzimas superóxido, tanto de humano como de tenia.

El compuesto **3** en concentración igual a 100  $\mu\text{M}$ , inhibe completamente la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn. No obstante lo anterior, no fue posible ensayar su efecto sobre la enzima de humano debido a la formación, también, de turbidez en el medio.

Los compuestos **1**, **5**, **6** y **7** provocan moderada inhibición de la actividad enzimática de la *TsSOD*-Cu/Zn a concentración igual a 100  $\mu\text{M}$  pero afectando en el mismo orden la actividad de enzima homóloga en humano. El resto de los 60 compuestos seleccionados como potenciales inhibidores muestran actividad baja o ninguna y son considerados como no activos. También para todos los compuestos, ensayos a concentración igual o mayor a 200  $\mu\text{M}$  conlleva la aparición de turbidez en el medio de reacción haciendo imposible determinar su efecto sobre la actividad de las enzimas superóxido de humano y tenia a concentraciones mayores a ese valor.

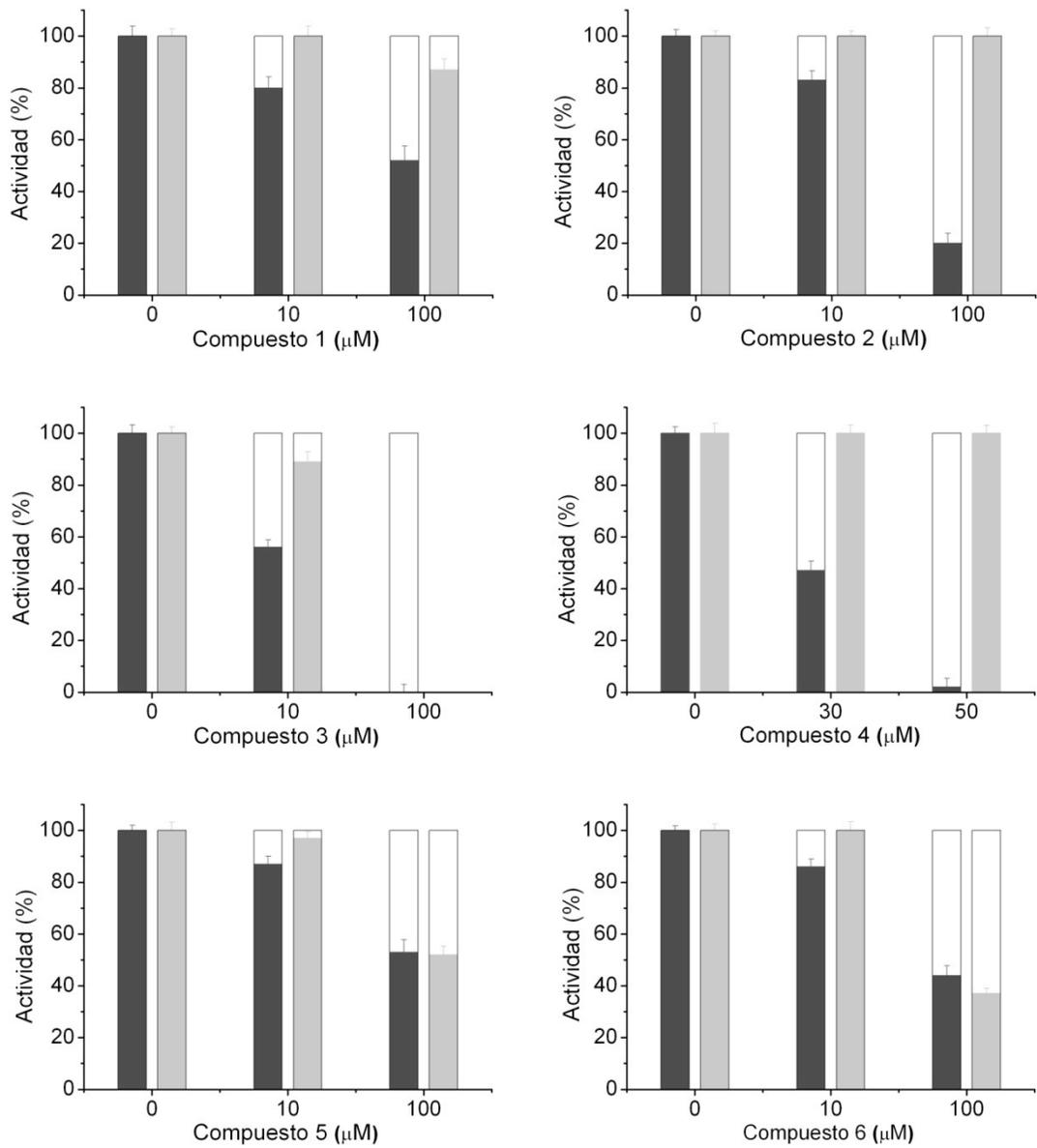


Figura 2.14. Inhibición de la actividad de las enzimas *TsSOD-Cu/Zn* y *HsSOD-Cu/Zn* por los seis compuestos LeadQuest® (Exelgen) con más actividad inhibitoria determinada por el método de la xantina-xantina-oxidasa. Las enzimas SOD-Cu/Zn de taenia (barras negras) y humano (barras grises) fueron incubadas en ausencia y presencia de 10, 30, 50 o 100 μM de inhibidor por un periodo de 30 min a una temperatura de 37°C.

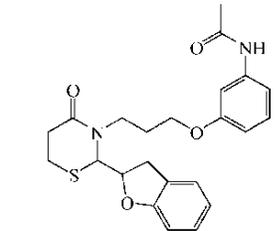
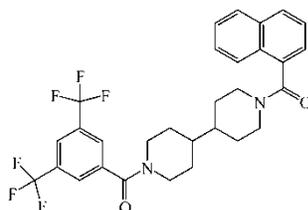
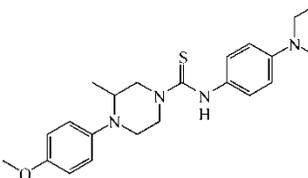
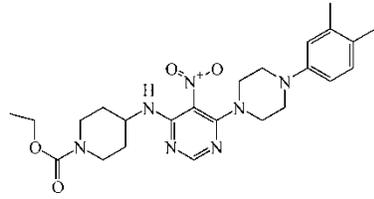
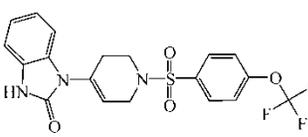
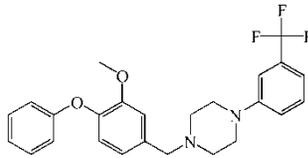
Comp	Estructura	Puntaje de unión a SOD de tenia (y de humano)	Sitio de unión	IC <sub>50</sub> (μM)	Nombre
1		-8.6 (-5.5)	1	-*	N-(3-{3-[2-(2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)-4-oxo-[1,3]tiazin-3-yl]-propoxy}-fenil)-acetamida
2		-8.7 (-6.0)	1, 2	25.3	(3,5-bis-trifluorometil-fenil)-[1'-(naftalen-1-carbonil)-[4,4']bipiperidinil-1-il]-metanona
3		-8.8 (-6.1)	1	9.8	4-(4-Metoxi-fenil)-3-metil-piperazin-1-carbotioicacid (4-dietilamino-fenyl)-amida
4		-9.0 (-6.0)	1	23.4	4-{6-[4-(3,4-Dimetil-fenil)-piperazin-1-il]-5-nitropirimidin-4-ilamino}-piperidin-1-carboxil acido etil ester
5		-9.0 (-6.3)	1, 2	-*	1-{1-[4-(2,2,2-Trifluoroetil)-benzenesulfonyl]-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il}-1,3-dihidrobencimidazol-2-ona
6		-8.7 (-5.9)	1, 2	-*	1-(4-Benziloxi-3-metoxibenzil)-4-(3-trifluorometilfenil)-piperazina

Tabla 2.3. Estructura, puntaje de la unión a SOD de tenia y humano, sitio de unión, actividad biológica y nombre IUPAC de los compuestos LeadQuest<sup>®</sup> identificados por simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando y que mostraron actividad inhibitoria *in vitro* frente a *TsSOD*-Cu/Zn. \* Los IC<sub>50</sub> sólo fueron determinados si el % de inhibición fue > 50 cuando la concentración del compuesto fue de 100 μM.

En la Tabla 2 del apéndice se encuentra una lista de los cincuenta compuestos seleccionados como potenciales inhibidores de la actividad de la *TsSOD*-Cu/Zn y en Tabla 3, también del apéndice, se enlistan los compuestos con puntajes de *docking* bajos y que sirvieron como testigos negativos en nuestro estudio. En esas tablas puede observarse el valor estimado de  $\text{Log}P$  para todos ellos. El valor más bajo de  $\text{Log}P$  lo posee el compuesto **40** con  $\text{Log}P= 0.6$ , mientras que el más alto lo posee el compuesto **47** con  $\text{Log}P= 5.5$ . Para dar una idea de las características hidrofóbicas/hidrofílicas de estos compuestos tenemos a la acetamida, una amida derivada del ácido acético que tiene una solubilidad de 2 g/mL y un valor de  $\text{Log}P$  de -1.16, se considera un compuesto hidrofílico. Por su parte, el 2, 2',4, 4', 5-pentaclorobifenilo es considerado un compuesto lipofílico, aunque puede disolverse en pocas cantidades en agua, que posee un valor de  $\text{Log}P$  de 6.41.<sup>71</sup>

El  $\text{IC}_{50}$  obtenido para los compuestos **2**, **3** y **4** (23.9, 10.9 y 25.9  $\mu\text{M}$ , respectivamente, Figura 2.15) confirma que estos tres compuestos son buenos inhibidores, resultando ser los dos últimos específicos hacia la *TsSOD*-Cu/Zn. Puede notarse que su actividad es dependiente de la concentración, con un comportamiento sigmoidal.

Con base a los estudios experimentales de inhibición de la actividad de la *TsSOD*-Cu/Zn con los 60 compuestos LeadQuest<sup>®</sup>, podemos decir que los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6** representan positivos verdaderos del *docking*. Seis compuestos activos en ensayos *in vitro* de los 50 seleccionados como potenciales inhibidores de la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn representan un éxito de 12%  $[(6/50)\times 100]$ , lo que demuestra la utilidad de la metodología y procedimiento de *docking*. El resto de los compuestos ensayados *in vitro*, incluyendo los controles negativos, presentaron muy baja o actividad nula y fueron considerados inactivos. Finalmente, el análisis de los compuestos activos revela que existe diversidad estructural entre ellos, sin embargo, los compuestos **3**, **4** y **6** comparten el grupo funcional piperazina mientras que el resto de los compuestos pueden considerarse derivados de la sulfonamida, bipiperidinilo y de la tiazinanona. No existe una mayor relación estructural en ellos y cada uno constituye una línea de partida para la derivatización de otros posibles inhibidores. Claramente, su capacidad inhibitoria es consecuencia de las interacciones alcanzadas y la complementariedad geométrica que alcanza cada uno de ellos en los sitios de unión.

Con base a los resultados de *docking*, los compuestos **2**, **5** y **6** se unen indistintamente al sitio 1 y 2 para valores de  $\text{affinity} > -7.5$  donde la interacción con residuos conservados y no conservados es fuerte. Para este mismo valor de  $\text{affinity}$ , los compuestos **1**, **3** y **4** sólo se unen al sitio 1. En la Figura 2.16 están señalados los residuos que interaccionan (4.5 Å) con los compuestos **1**-**6** en el sitio de unión 1, y aquellos implicados en la formación de interacción tipo puente de hidrógeno están resaltados. Para el compuesto **4**, quien presenta la mayor actividad inhibitoria frente a *TsSOD*-Cu/Zn y es inactivo con *HsSOD*-Cu/Zn en los intervalos de concentración ensayados, unido al sitio 1 en la

orientación más comúnmente encontrada ( $RMSD < 0.5 \text{ \AA}$ ,  $affinity < -7.5$ , Figura 2.17) forma una interacción tipo puente de hidrógeno entre el átomo de N en el anillo de pirimidina y el O del hidroxilo del residuo no conservado SB108 (serina 108 de la cadena B). Adicionalmente, está el que se forma entre el grupo CO del éster en el ligando y el NH en el MB1, también un residuo no conservado. Sumado a estas interacciones específicas, están las de tipo dipolo-dipolo y van der Waals entre el resto de la estructura del inhibidor y las cadenas laterales de los residuos que interaccionan con él debido a la excelente complementariedad geométrica: El grupo piperazina está interaccionando con MA1, KA2, LA103, SA108, LA110 e LA148 mientras que el anillo de pirimidina está rodeado por LB103, TB104 e IB110. Aunque las interacciones van der Waals son consideradas como las de menor energía entre las interacciones intermoleculares conocidas, sumadas todas ellas pueden llegar a tener una importancia considerable. En general, la selectividad podría ser la suma de interacciones de corto y largo alcance en donde los residuos no conservados M1, T104, S108, K150 y S151 juegan un papel importante. Esquemas de interacción de los compuestos **1**, **2**, **3**, **5** y **6** en la orientación más frecuente y después de minimizar la energía en tres pasos se encuentran en el apéndice.

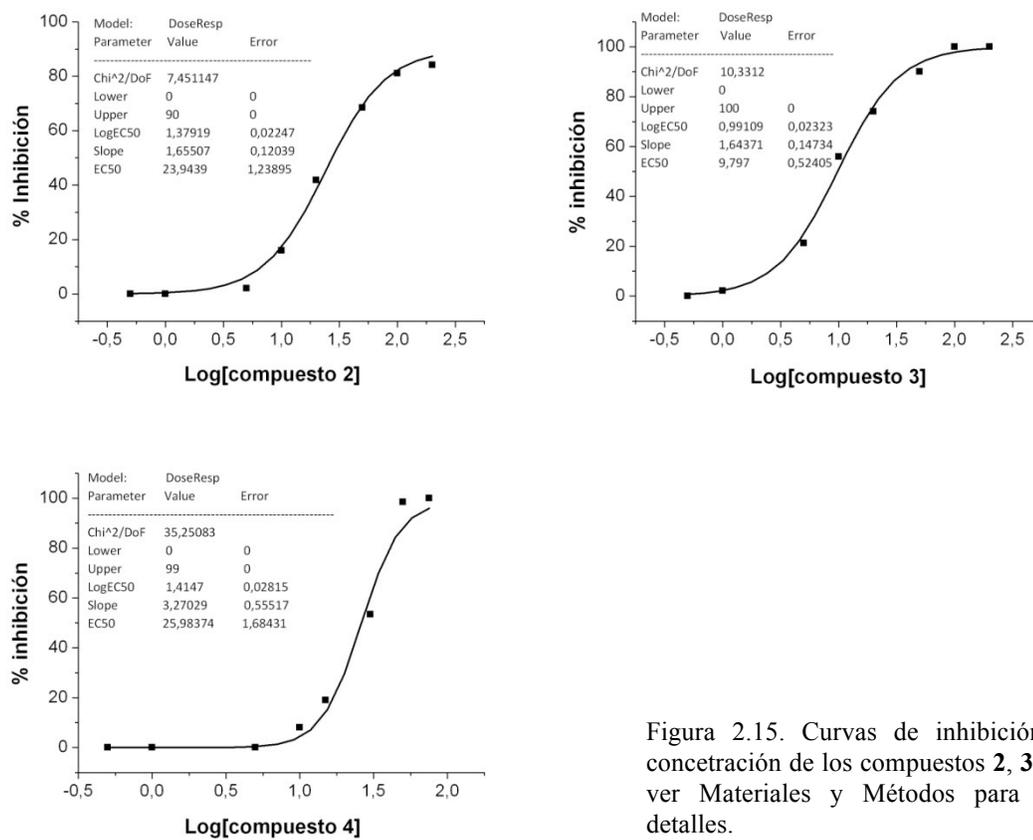


Figura 2.15. Curvas de inhibición vs concentración de los compuestos **2**, **3** y **4**, ver Materiales y Métodos para más detalles.

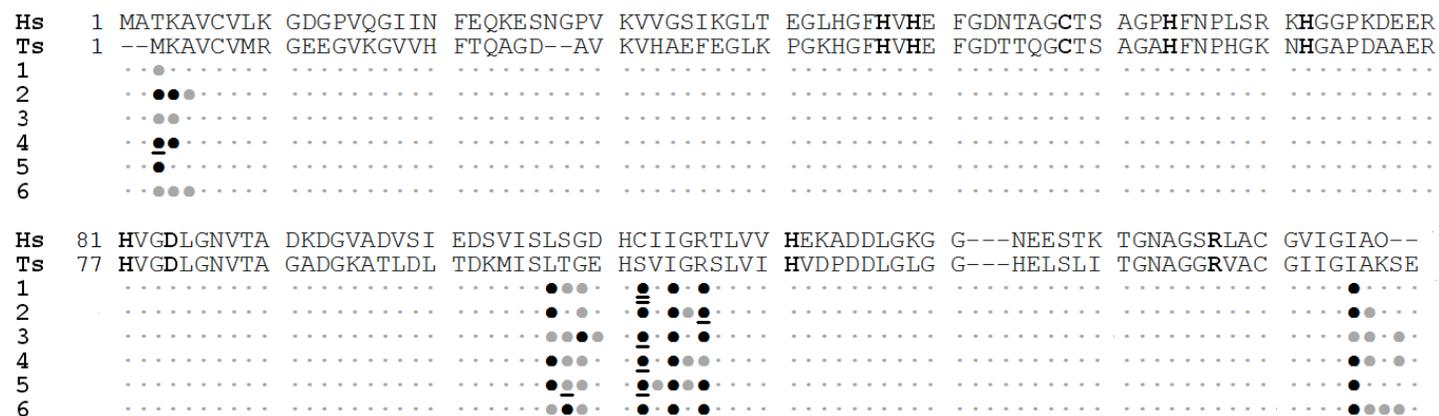
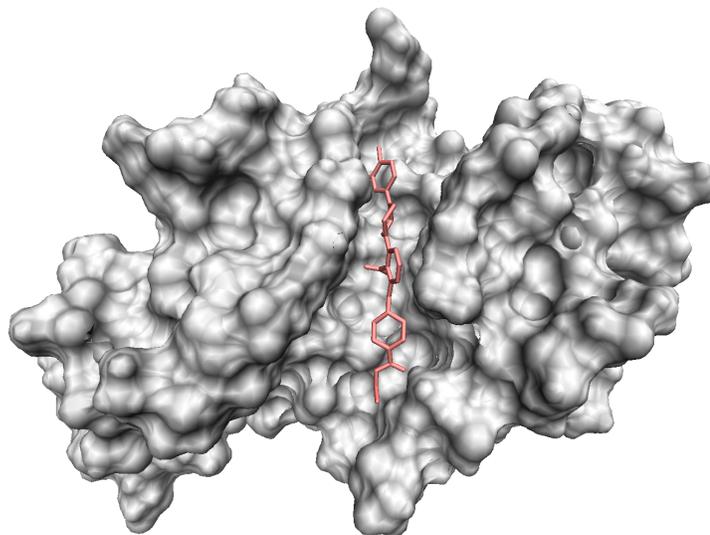


Figura 2.16. Alineamiento de las secuencias de *Ts*SOD–Cu/Zn y *Hs*SOD–Cu/Zn. Los residuos en contacto ( $\leq 4.5$  Å) con lo ligantes 1-6 en el sitio de unión 1 sobre la superficie de *Ts*Cu/Zn–SOD de acuerdo con nuestros resultados de *docking* están señalados por círculos. El color negro en los círculos indica que el ligando interactúa con el mismo residuo en las cadenas A y B; el color gris significa que el ligando interactúa con el residuo pero de una sola cadena. Una línea debajo de los círculos indica la formación de una interacción tipo puente de hidrógeno con ese residuo, dos líneas indican dos interacciones tipo puente de hidrógeno.

Con la finalidad de determinar la forma en que los compuestos **1-6** interaccionan con la estructura 3D de *HsSOD*-Cu/Zn, se realizaron estudios de *docking* sobre algunos sitios potenciales de unión identificados, entre ellos los sitios 1 y 2. Los resultados obtenidos muestran que los puntajes de unión son siempre menores a los que se obtienen cuando el receptor es *TsSOD*-Cu/Zn, en acuerdo a lo que experimentalmente se observa. El mejor puntaje (Tabla 2.3) se obtiene cuando el compuesto **5** se une al sitio 2 con -5.5.

(a)



(b)

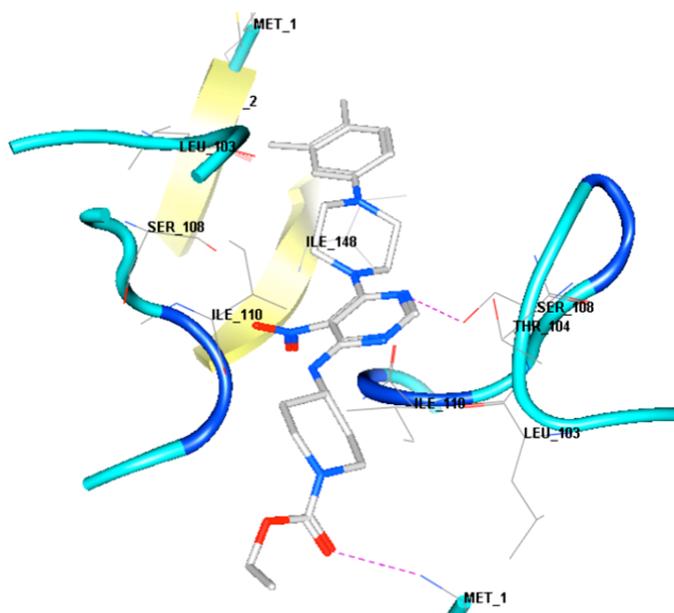


Figura 2.17. (a) Modo de unión consenso del compuesto **4** en el sitio 1 como resultado del *docking* y de la minimización de la energía en tres pasos. (b) Red de interacciones tipo puente de hidrógeno (líneas discontinuas) entre el compuesto **4** y los residuos en el sitio 1, ver descripción en el texto.

Está ampliamente documentado que los algoritmos de *docking* aún no son tan robustos para generar constantes de unión lo suficientemente precisas, o para no generar falsos positivos y que suele haber omisiones cuando se barren extensas bases de compuestos conteniendo positivos verdaderos.<sup>33, 59</sup> Por esta razón el *docking* se suele utilizar como método para enriquecer la cantidad de positivos verdaderos en un conjunto de inhibidores potenciales. Es importante considerar que aunque el protocolo de *docking* muchas veces se ve como una herramienta automatizada de apoyo en la búsqueda de ligandos, como ya ha sido mencionado, la inspección visual de los resultados para tomar decisiones sobre la selección de compuestos juega un rol importante.

Muchas enzimas y proteínas dependen de su asociación en homodímeros o heterodímeros para poder llevar a cabo su función. Es por esto que las interacciones monómero-monómero en estos sistemas son consideradas blancos de estudio como vía de modulación o bloqueo de su función con fines terapéuticos.<sup>48, 60</sup> Las SOD-Cu/Zn de eucariontes constituyen un ejemplo de homodímero obligado con la región interfacial conservada, muestran catálisis limitada por la difusión del sustrato y asistencia electrostática al sustrato hacia el sitio de la catálisis.

La interacción monómero-monómero en estos dímeros está basada en contactos intermoleculares específicos localizados en cuatro regiones específicas en cada monómero: a) la primera región consiste de las hebras  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Figura 1.1); b) la segunda está localizada en el lazo entre la hebra  $\beta 4$  y la hélice  $\alpha 1$ ; c) la tercera formada por los residuos localizados en el loop L6 y; d) la cuarta formada por los residuos de la hebra  $\beta 8$ . La región interfacial de la SOD de *T. solium* y humano son muy similares, y las interacciones monómero-monómero constan de las mismas regiones de contacto descritas pero varían en su composición de aminoácidos.<sup>16</sup> Banci *et al.*<sup>61, 62</sup> reemplazaron dos residuos hidrofóbicos, la P50 y la G91, en la región interfacial del dímero de humano produciendo especies monoméricas solubles con mucho menor actividad catalítica: alrededor del 10% respecto de la misma enzima sin mutar y dimérica. Mediante estudios de RMN<sup>61</sup> y difracción de rayos X,<sup>63</sup> estos autores observaron cambios conformacionales del lazo L7 (residuos 120-139) responsable de la generación del campo electrostático que, primeramente atrae y luego guía al radical superóxido hacia el sitio de la catálisis. Del mismo modo, ha sido estudiada la movilidad de la cadena principal del monómero y del dímero de la SOD-Cu/Zn de humano por métodos de dinámica molecular, se ha concluido que la región comprendida por los residuos 131-142, es menos móvil en el monómero mutado que en el dímero silvestre. Los autores sugieren que esta falta de movilidad está relacionada con la no asistencia para que el radical superóxido llegue al sitio de la catálisis.<sup>64, 65</sup>

Con base en los resultados de *docking* y las evidencias experimentales de pérdida de actividad en las SOD-Cu/Zn de humano descritas anteriormente, se sugiere que los compuestos **1-6** podrían estar afectando la actividad enzimática de *TsSOD-CuZn* alterando la estructura cuaternaria del dímero,

monomerizando la estructura o restringiendo la movilidad del lazo L7 de los monómeros en el dímero a través de su unión a los sitios 1 y/o 2. La selectividad de unión respecto a la de humano es debida a la interacción de los compuestos con residuos no conservados en la estructura de la SOD-Cu/Zn de *T. solium*.

## **Conclusiones y perspectivas**

## Conclusiones

La metodología de simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando presentada en este trabajo nos permitió identificar inhibidores específicos de *TsSOD*-Cu/Zn, lo cual provee información relevante para el desarrollo de inhibidores con potencial actividad antiparasitaria, lo cual es un tema relevante dado el incremento en la resistencia.

Se identificaron seis compuestos con actividad inhibitoria de *TsSOD*-Cu/Zn a concentraciones micromolar. Los mejores inhibidores tienen valores de  $IC_{50}$  de 2, 19 y 38  $\mu$ M.

Los modelos de los complejos de *TsSOD*-Cu/Zn con los compuestos activos derivados de la simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando, sugiere que éstos actúan uniéndose a la región interfacial en el dímero de *TsSOD*-Cu/Zn, en donde interacciones específicas de tipo puente de hidrógeno y otras de carácter electrostático como las dipolo-dipolo dirigen la afinidad.

Se establecieron las condiciones para la expresión y purificación de la enzima recombinante *SOD*-Cu/Zn del parásito *T. solium*.

La masa molecular y actividad de la enzima recombinante producida y aislada corresponden con las reportadas previamente.

El estudio de inhibición computacional con los fármacos antihelmínticos albendazol y tiabendazol sugiere que estos actúan uniéndose al sitio de la catálisis y en donde la principal interacción podría ser metálica. También podrían estar actuando a través de su unión a la región interfacial en el dímero, particularmente en los sitios 1 y 2.

La minimización de la energía local en los mejores complejos proteína-ligando contribuye al mejoramiento de las interacciones del ligando con el receptor y que nos permitió seleccionar los compuestos con potencial inhibitorio para los ensayos *in vitro*. Esta etapa fue fundamental en el presente trabajo de desarrollo de inhibidores de la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn.

Los inhibidores de la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn muestran poca o nula actividad en los ensayos de inhibición *in vitro* con *HsSOD*-Cu/Zn.

Tres de los seis compuestos identificados son inhibidores específicos de *TsSOD*-Cu/Zn en los intervalos de concentración estudiados en este trabajo.

## **Perspectivas**

Elucidación experimental del modo de acción de los inhibidores de la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn. Para ello se desarrollará un cristal de complejo proteína-ligando para después difractarlo mediante rayos X. También se harán experimentos de mutagénesis dirigida sobre residuos clave en la unión del ligando y *Ts*-SODCu/Zn y *HsSOD*-Cu/Zn.

Desarrollo de compuestos derivados de los inhibidores identificados en este trabajo con más actividad inhibitoria en *TsSOD*-Cu/Zn. Para ello se recurrirá a la metodología QSAR y la información experimental mencionada líneas arriba y que se vaya obteniendo.

Diseño de derivados de los fármacos antihelmínticos con mayor actividad inhibitoria hacia *TsSOD*-Cu/Zn empleando la metodología QSAR.

## **Bibliografia**

## Bibliografía

- 1.- a) Besier B. New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology*, **2006**, *23*, 21-24. b) Köhler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal of Parasitology*, **2001**, *31*, 336-345.
- 2.- Chan M. S. The global burden of Intestinal Nematode Infections: fifty years on. *Parasitology Today*, **1997**, *13*, 438-443.
- 3.- Geerts S. and Gryseels B. Drug resistance in human helminthes: current situation and lessons from livestock. *Clinical Microbiology Review*, **2005**, *13*, 207-222.
- 4.- Willms K., Merchant M. T., Diaz S. and Arcos A., Host-parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Flisser A., Willms K., Lacleste J. P., Larralde C., Ridaura C. and Beltran F., Eds., pp. 397–411, Academic Press, New York, NY, USA, 1982.
- 5.- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, **1998**, *201*, 1203-1209.
- 6.- Monroy-Ostria A. *et al.* Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **1993**, *35*, 91-102.
- 7.- Kuntz I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*, **1992**, *257*, 1078-1082.
- 8.- Castellanos-González A., Jiménez L. and Landa A. Cloning, production and characterization of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology*, **2002**, *32*, 1175-1182.
- 9.- a) Dayan A. D., *Acta Tropica*, **2003**, *86*, 112-115. b) Silva N., Guyant H and Bundy D., *Drugs*, **1997**, *53*, 769-788.
- 10.- Rossignol J. F. Nitazoxanide. A new broad spectrum antibacterial–antiparasiticide drug: Preclinical pharmacology. *Journal of Tropical Medicine*, **1994**, *3*, 1-6.
- 11.- Stepek G., Behnke J. M. , Buttle D. J. and Duce I. R. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends in Parasitology*, **2004**, *20*, 323-327.
- 12.- Rice-Evans C. A. and Burdon R. H. Eds, *Free radical damage and its control*. Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- 13.- Callahan H. L., Crouch R. K. and James E. R. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today*, **1988**, *4*, 218-225.
- 14.- Brophy P. M. and Pritchard D. I. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance. *Parasitology Today*, **1992**, *8*, 419-422.

- 15.- Henkle-Dührsen and Kampkötter A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **2001**, *114*, 129-142.
- 16.- Hernández-Santoyo A., Landa A., Gonzáles-Mondragón E., Pedraza-Escalona M., Parra-Unda R. and Rodríguez-Romero A. Crystal structure of Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium* reveals metal-mediated self-assembly. *FEBS Journal*, **2011**, *278*, 3308-3318.
- 17.- Getzoff E. D., Tainer J. A., Weiner P. K., Kollman P. A., Richardson J. S. and Richardson D. C. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, **1983**, *306*, 284-287.
- 18.- Banci L., Bertini I., Hallewell R. A., Luchinat C. and Viezzoli M. S. Water in the active cavity of copper/zinc superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, **1989**, *184*, 125-129.
- 19.- Boyd D. B., Drug Design. *Encyclopedia of Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, UK, **1998**.
- 20.- Duncia J. V., Chiu A. T., Carini D. J., Gregory G. B., Jonson A. L., Price W. A. and Wells G. J. The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: A new class of potent antihypertensives. *Journal of Medical Chemistry*, **1990**, *33*, 1312-1329.
- 21.- a) Keenan R. M., Weibstick J., Finkelstein J. A., Franz R. G., Gaitanopoulos D. E., Girard G. R., Hill D. T., Morgan T. M. and Samanen J. M. Potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 2. 1-(Carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids, *Journal of Medical Chemistry*, **1993**, *36*, 1880-1892.  
b) Weinstock J., Keenan R. M., Samanen J., Hempel J., Finkelstein J. A., Franz R. G., Gaitanopoulos D. E., Girard G. R. and Gleason J. G. 1-(Carboxybenzyl)imidazole-5-acrylic acids: potent and selective angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Medical Chemistry*, **1991**, *34*, 1514-1517.
- 22.- a) Greer J., Erickson J. W., Baldwin, J. L. and Varney M. D. Application of the Three-Dimensional Structures of Protein Target Molecules in Structure-Based Drug Design. *Journal of Medical Chemistry*, **1994**, *37*, 1035-1054. b) Baldwin J. J., Ponticello G. S., Anderson P. S., Christy M. E., Murcko M. A., Randall W. C., Schwam H., Sugrue M. F., Gautheron P. *Journal of Medical Chemistry*, **1989**, *32*, 2510-2513.
- 23.- Dorsey B. D., Levin R. B., McDaniel S. L., Vacca J. P., Guare J. P., Darke P. L., Zugay J. A., Emini E. A. and Schleif W. A. *Journal of Medical Chemistry*, **1994**, *37*, 3443-3451.
- 24.- Buckingham J., Glen R. C., Hill A. P., Hyde R. M., Martin G. R., Robertson A. D., Salmon J. A. and Woollard P. M. *Journal of Medical Chemistry*, **1995**, *38*, 3566-3580.
- 25.- Bunch L., Nielsen B. Jensen A. A. and Bräuner-Osborne H. Rational Design and Enantioselective Synthesis of (1*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-3-Azabicyclo[3.3.0]octane-4,6-dicarboxylic Acid. A Novel Inhibitor at Human Glutamate Transporter Subtypes 1, 2, and 3. *Journal of Medical Chemistry*, **2006**, *49*, 172-178.

- 26.- Sheng C., Zhang W., Ji M., Song Y., Xu H., Miao Z., Jiang Q., Yao., Zhou J and Lü J. Structure-Based Optimization of Azole Antifungal Agents by CoMFA, CoMSIA, and Molecular Docking. *Journal of Medical Chemistry*, **2006**, 49 2512- 2525.
- 27.- Cozza G., Bonvini P., Zorzi E., Poletto G., Pagano M. A., Sarno S., Donella-Deana A., Zagotto G., Rosolen A., Pinna L. A., Meggio F. and Moro S. Identification of Ellagic Acid as Potent Inhibitor of Protein Kinase CK2: A Successful Example of a Virtual Screening Application. *Journal of Medical Chemistry*, **2006**, 49, 2363-2366.
- 28.- Shuster D., Laggner C., Steindl T. M., Paluszczak A., Hartmann R. W. and Langer T. Pharmacophore modeling and *in silico* screening for new P450 19 (aromatase) inhibitors. *Journal of Chemical Informatics and Modeling*, **2006**, 46, 1301-1311.
- 29.- Slusarz M. J., Sikorska E., Slusarz R. and Ciarkowski J. Molecular docking-based study of vasopressin analogues modified at positions 2 and 3 with *N*-methylphenylalanine: influence on receptor-bound conformations and interactions with vasopressin and oxytocin receptors. *Journal of Medical Chemistry*, **2006**, 49, 2463-2469.
- 30.- Medina-Franco J. L., Golbraikh A., Oloff S., Castillo R. and Tropsha A. Quantitative structure-activity relationship analysis of pyridinone HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using the *k* nearest neighbor method and QSAR-based database mining. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2005**, 4, 229-242.
- 31.- Medina-Franco J. L., Lopez-Vallejo F., Rodriguez-Morales S., *et al.*, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **2005**, 229, 33-40.
- 32.- López-Vallejo F., Medina-Franco J. L. Hernández-Campos A., Rodríguez-Morales S., Yépez L., Cedillo R. and Castillo R. Molecular modeling of some 1H-benzimidazole derivatives with biological activity against *Entamoeba histolytica*: a comparative molecular field analysis study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2007**, 2, 1117-1126.
- 33.- Laurie A. T. R. and Jackson R. M. Methods for the prediction of protein–ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. *Current Protein Peptide Science*. **2006**, 7, 395-406.
- 34.- Molecular Operating Environment (MOE). Chemical Computing Group, Inc. CCG, Montreal, Canada. <http://www.chemcomp.com>. Versions 2005.06 and 2007.09.
- 35.- Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y. and Liang J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acid Research*, **2006**, 34, 116-118.
- 36.- Alvarez T. and Shoichet B. *Virtual screening in drug discovery*. Taylor & Francis, England, 2005.

- 37.- Alvarez T. and Shoichet B. *Virtual screening in drug discovery.*, Taylor & Francis, England, 2005.
- 38.- LeadQuest<sup>®</sup> Compound Library, April 2006, Exelgen, Inc. 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144, USA.
- 39.- Perola E. and Charifson P. Conformational analysis of drug-like molecules bound to proteins: An extensive study of ligand reorganization upon binding. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, *47*, 2499–2510.
- 40.- Stibrany R. T., Schulz D. N., Kacker S., Patil A. O., Baugh L. S., Rucker S. P., Zushma S., Berluche E. and Sissano J. A. *Macromolecules*, **2003**, *36*, 8584-8586.
- 41.- Saczewski F., Dziemidowicz-Borys E., Bednarski P. J., Grünert R., Gdaniec M. and Tabin P. Synthesis, crystal structure and biological activities of copper(II) complexes with chelating bidentate 2-substituted benzimidazole ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2006**, *100*, 1389-1398.
- 42.- El-Metwaly N. M. and Refat M. S. Spectral, thermal, kinetics, molecular modeling and eukaryotic DNA degradation studies for a new series of albendazole complexes. *Spectrochimica Acta A*, **2011**, *78*, 196-204.
- 43.- a) Devereux M., O Shea D., Kellett A., McCann M., Walsh M., Egan D., Deegan C., Kedziola K., Rosair G. and Müller-Bunz H. Synthesis, X-ray crystal structures and biomimetic and anticancer activities of novel copper(II)benzoate complexes incorporating 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole (thiabendazole), 2-(2-pyridyl)benzimidazole and 1,10-phenanthroline as chelating nitrogen donor ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2007**, *101*, 881-892.
- 44.- Wisniewski M. Z., Glowiak T., Opolski A. and Wietrzyk J. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of the Co(II), Ni(II), Cu(II), Pd(II) AND Pt(II) complexes of 2-(4-thiazolyl)benzimidazole (thiabendazole). *Metal Based Drugs*, **2001**, *8*, 189.
- 45.- Saczewski F., Dziemidowicz-Borys E., Bednarski P. J., Grünert R., Gdaniec M. and Tabin P. Synthesis, crystal structure and biological activities of copper(II) complexes with chelating bidentate 2-substituted benzimidazole ligands. *Journal of inorganic biochemistry*, **2006**, *100*, 1389-1398.
- 46.- Grevy J. M., Tellez F., Bernes S., Noeth H., Contreras R. and Barba-Behrens N. Coordination compounds of thiabendazole with main group and transition metal ions. *Inorganica Chimica Acta*, **2002**, *339*, 532-542.
- 47.- Cotton F. A. Wilkinson G.; Murillo C.A.; Bochmann M. *Advanced Inorganic Chemistry*. Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, **1999**.
- 48.- Landa A., Vaca-Paniagua F., Torres-Rivera A. and Parra-Unda R. *Taenia solium*: antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2008**, *8*, 393-399.

- 49.- Sanz A. M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Sánchez-Moreno M., Boutaleb-Charki S., Campuzano J., Pardo M., Osuna A., Cano C., Yunta M. J. R. and Campayo L. Efficient inhibition of Iron superoxide dismutase and of *Trypanosoma cruzi* growth by benzo[g]phthalazine derivatives functionalized with one or two imidazole rings. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51*, 1962-1966.
- 50.- Rodríguez-Ciria M., Sanz A. M., Yunta M. J. R., Gómez-Contreras F., Navarro P., Sánchez-Moreno M., Boutaleb-Charki S., Osuna A., Castiñeiras A., Pardo M., Canoa C. and Campayo L. 1,4-Bis(alkylamino)benzo[g]phthalazines able to form binuclear complexes of Cu(II) which as free ligands behave as SOD inhibitors and show efficient in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2007**, *15*, 2081-2091.
- 51.- Sánchez-Moreno M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marín C., Ramírez-Macías I., Olmo F., Sanz A. M., Campayo L., Cano C. and Yunta M. J. R. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2012**, *67*, 387–397.
- 52.-The Merck Index. Fourteenth Edition. New York, **2006**.
- 53.- Pace C. N., Vajdos F., Grimsley G. and Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, **1995**, *4*, 2411-2423.
- 54.- Marklund S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **1982**, *46*, 303-312.
- 55.- Benov L., Sage H. and Fridovich I. The Copper- and zinc-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*: Molecular weight and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1997**, *319*, 508-511.
- 56.-Sánchez-Moreno M., León P., Salas-Peregrin J. M. and Osuna A. Superoxide dismutase in trematodes. *Arzneimittelforschung*, **1988**, *37*, 903-905.
- 57.- Sánchez-Moreno M., García-Ruiz A., García-Rejón L., Valero A. and León P. Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis. *Drug Research*, **1989**, *39*, 759–61.
- 58.- Sánchez-Moreno M., Entrala E., Janssen D., Fernández-Becerra C., Salas-Peregrin J. M., Osuna, A. Inhibition of superoxide dismutase from *Ascaris suum* by benzimidazoles and synthesised pyrimidine and glycine derivatives. *Pharmacology*, **1996**, *52*, 61–68.
- 59.- Park M. S., Dessal A. L., Smrcka A. V. and Stern H. A. Evaluating docking methods for prediction of binding affinities of small molecules to the G protein beta-gamma subunits. *Journal of Chemical Information Modeling*, **2009**, *49*, 437-443.

- 60.- Cardinale D., Salo-Ahen O. M. H., Ferrari S., Ponterini G., Cruciani G., Carosati E., Tochowicz A. M., Mangani S., Wade R. C. and Costi M. P. Homodimeric enzymes as drug targets. *Current Medicinal Chemistry*, **2010**, *17*, 826-846.
- 61.- Banci L., Benedetto I., Bertini R., Del Conte M., Piccioli M. and Viezzoli M. S. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase. Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry*, **1998**, *37*, 11780–11791.
- 62.- Banci L., Bertini I., Del Conte R., Mangani S., Viezzoli M. S. and Fadin R. The solution structure of a monomeric reduced form of human copper, zinc superoxide dismutase bearing the same charge as the native protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **1999**, *4*, 795–803.
- 63.- Ferraroni M., Rypniewski W., Wilson K. S., Viezzoli M. S., Banci L., Bertini I. and Mangani S. The crystal structure of the monomeric human SOD mutant F50/G51E/E133Q at atomic resolution. The enzyme mechanism revisited. *Journal of Molecular Biology*, **1999**, *288*, 413-426.
- 64.- Luty B. A., Amrani E. S. and McCammon J. A. Simulation of the bimolecular reaction between superoxide and superoxide dismutase: synthesis of the encounter and reaction steps. *Journal of the American Chemical Society*, **1993**, *115*, 11874–11877.
- 65.- Banci L., Bertini I., Cramaro F., Del Conte R., Rosato A. and Viezzoli M. S. Backbone dynamics of human Cu, Zn superoxide dismutase and of its monomeric F50/EG51E/E133Q mutant: The influence of dimerization on mobility and function. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 9108–9118.
- 66.- MacKerell A. D. Jr., Feig N. and Brooks C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force field: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, **2004**, *25*, 1400-1415.
- 67.- Halgren T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *Journal of Computational Chemistry*, **1999**, *20*, 720-729.
- 68.- Lipinski, C. A., Lombardo F., Dominy B. W. and Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, *23*, 3-25.
- 69.- McCord J. M. and Fridovich I. Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **1969**, *244*, 6049-6055.
- 70.- Sato K., Kohzuma T. and Dennison C. Active Site Structure and Electron-Transfer Reactivity of Plastocyanins. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, *125*, 2101-2112.
- 71.- a) Wolfenden R. Interaction of the peptide bond with solvent water: a vapor phase analysis. *Biochemistry*, **1978**, *17*, 201–204. b) Brodsky J. and Ballschmiter K. Reversed phase liquid chromatography of PCBs as a basis for calculation of water solubility and  $K_{ow}$  for polychlorobiphenyls. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, **1998**, *331*, 295-301.

## **Apéndice**

Tabla 1. Descriptores para los diez primeros sitios potenciales de unión de ligandos sobre la superficie de la estructura 3D de *Ts*Cu/Zn-SOD identificados por MOE\_*SiteFinder* y CASTp.

Sitio	Tamaño	Hyd	Residuos
1	226	30	Cadena A: M1 K2 F61 L103 T104 G105 E106 H107 S108 V109 I110 R112 I148 A149 K150 S151 E152. Cadena B: M1 K2 A3 E46 F47 L103 T104 G105 S108 I110 G111 R112 I148 A149 S151
2	159	18	Cadena A: C5 V6 M7 R8 G9 E10 T50 G53 C54 C143G144 I145. Cadena B: C5 V6 M7 R8 T50 C143G144 I145
3	61	14	Cadena B: E11 V13 G34 L35 K36 H40 V118 V141
4	73	13	Cadena A: K2 A149 K150 S151. Cadena B: F47 D49 T55 S56 A57 G58
5	129	12	Cadena A: H43 H45 G58 A59 H60 N62K66 N67 H68 H77 H117 L130 L132 I133 T134 N136 A137 G138 G139 R140 Cu
6	87	12	Cadena B: K66 P71 D72 A73 A74 R76 L81 L96 T97 D98 K99 M100
7	71	10	Cadena A: P71 D72 A73 A74 R76 L81 L96 T97 D98 K99 M100
8	59	10	Cadena A: K39 A70 P71 D72L81G82 N83L94L96L123
9	55	9	Cadena B: K14 G15 V16 E31 F32 E33 K91 A92 T93
10	51	8	Cadena A: K14 G15 V16 E31 F32 E33 K91 A92 T93
11	53	7	Cadena B: L39 A70 P71 D72 L81 G82 N83 L94 L96 D121 L123
12	89	6	Cadena B: H43 H45 G58 A59 H60 N62 H77 H117 I133 T134 A137 G138 G139 RB140 Cu
13	44	6	Cadena A: E46 F47. Cadena B: I148 A149 L150 S151 E152
14	54	6	Cadena B: L2 A3 V4 H18 F19 T20 A149 L150
15	75	5	Cadena B: Q21 G23 D24 A25 V26 D98 L99 M100
16	45	3	Cadena A: R8 G9 E11 V13 G53C54 R140 V141 A142 C143
17	28	3	Cadena A: V6 R8 V16; T50 T51 Q52 G53
18	32	3	Cadena B: R8 G9 E10 T50 G53 C54 C143
19	49	2	Cadena A: Q21 G23 D24 V26 K99 M100 I101 S102 T104 G105 E106 H107
20	38	2	Cadena B: G53 C54 T55 G139 R140 V141
21	38	1	Cadena A: R8 G9 E10 E11 G12 V13 K14

Tabla 2. Estructura en 2D y descriptores de los cincuenta compuestos LeadQuest<sup>®</sup> predichos como inhibidores potenciales de la actividad de *TsSOD*-Cu/Zn.

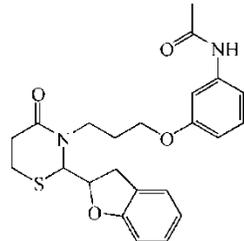
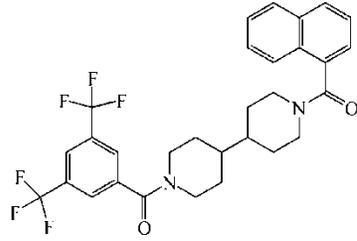
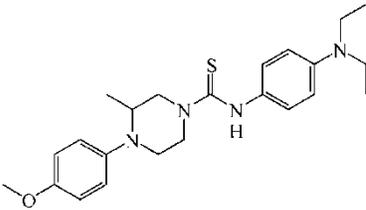
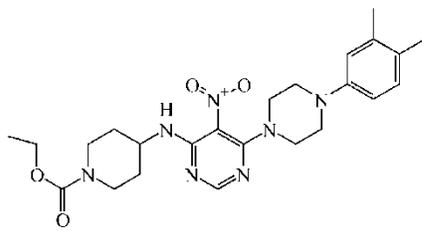
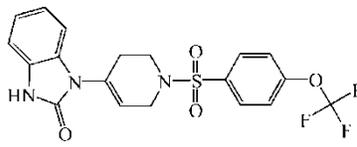
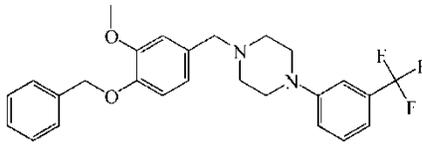
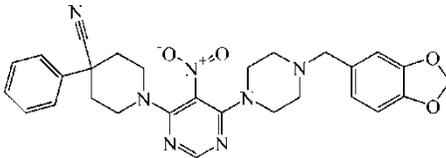
Comp.	Estructura 2D	ID LeadQuest	LogP*	Mejor puntaje frente a <i>TsCu/Zn-SOD</i>
1		1545-07806	2.8	-8.6
2		1460-00055	5.5	-8.7
3		1526-26128	4.4	-8.8
4		1502-13317	3.6	-9.0
5		1554-02903	3.4	-9.0
6		1524-09920	5.4	-8.7
7		1502-14336	3.6	-8.9

Tabla 2. Continuación.

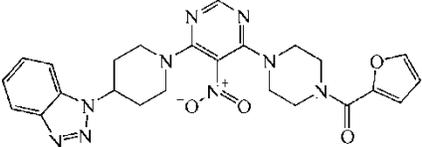
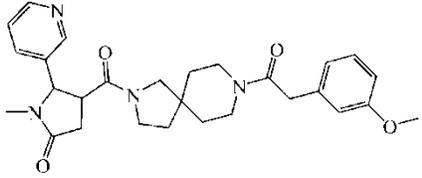
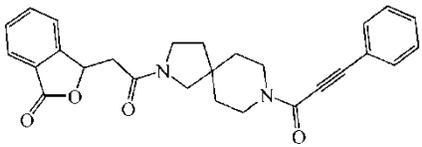
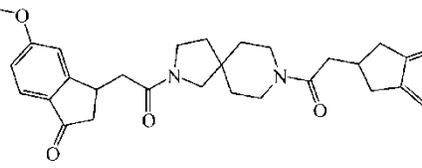
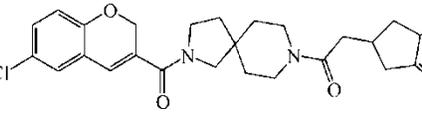
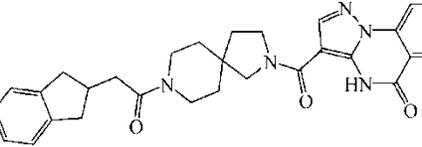
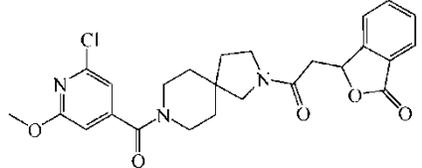
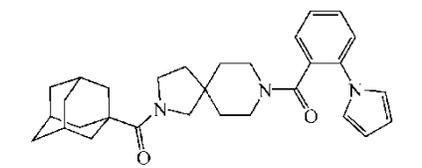
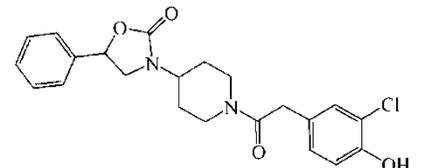
8		1502-15362	2.2	-9.3
9		1520-00421	1.6	-9.4
10		1520-00623	2.9	-9.9
11		1520-01059	3.6	-9.8
12		1520-01078	4.7	-9.1
13		1520-01545	2.8	-9.5
14		1520-02418	2.5	-9.2
15		1520-02489	4.2	-9.0
16		1534-01314	3.5	-9.2

Tabla2. Continuación.

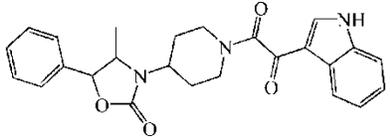
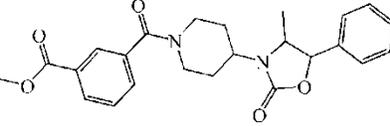
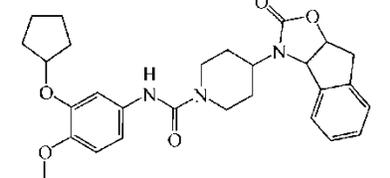
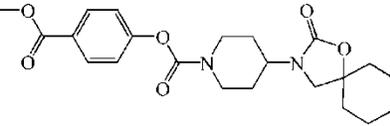
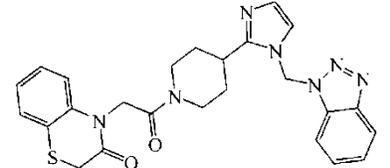
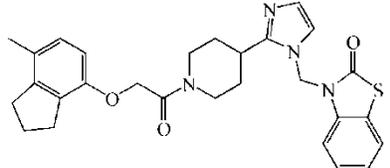
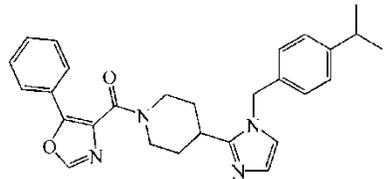
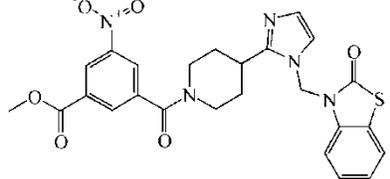
17		1534-02951	3.0	-8.6
18		1534-05756	3.1	-9.0
19		1534-07719	4.4	-9.3
20		1534-09941	3.8	-8.9
21		1535-06553	2.1	-9.1
22		1535-06614	3.9	-9.5
23		1535-06726	5.1	-8.7
24		1535-06896	2.7	-9.0

Tabla 2. Continuación.

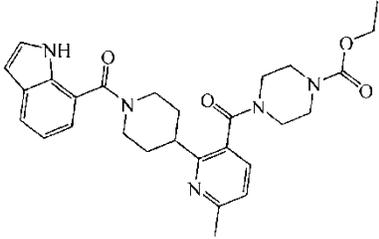
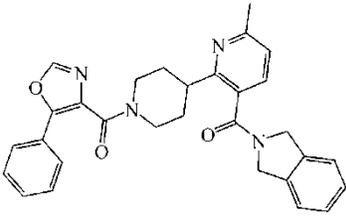
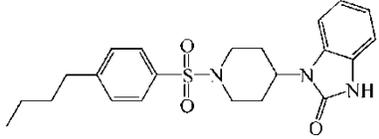
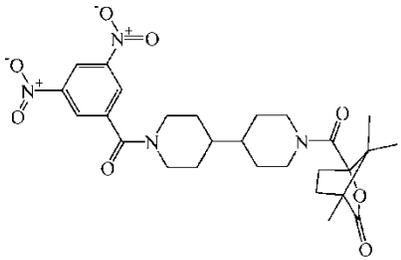
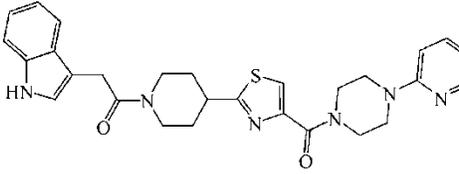
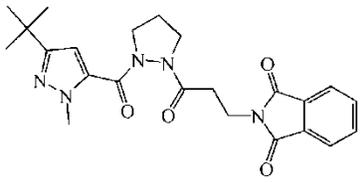
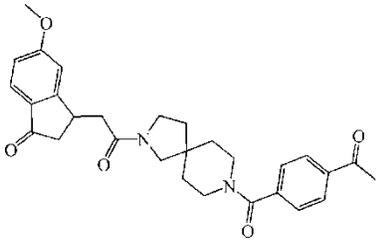
25		1548-02640	1.6	-9.0
26		1548-02825	3.0	-8.7
27		1559-04569	4.3	-8.7
28		1463-00056	1.9	-9.2
29		1506-04337	2.6	-9.1
30		1511-00170	2.9	-8.9
31		1520-03165	2.3	-9.1

Tabla 2. Continuación.

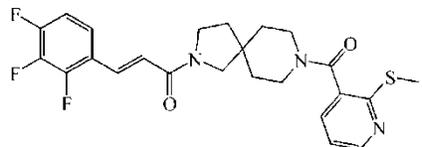
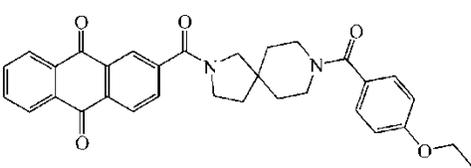
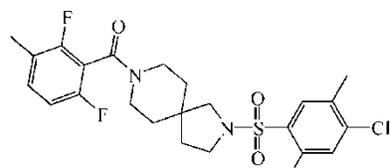
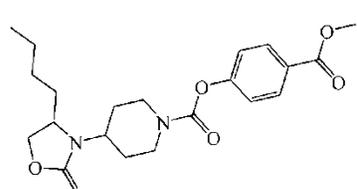
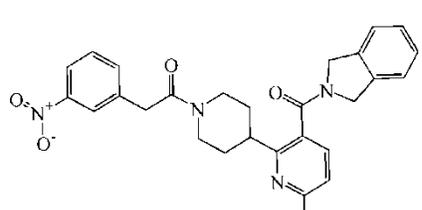
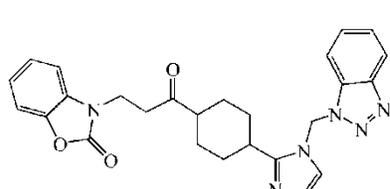
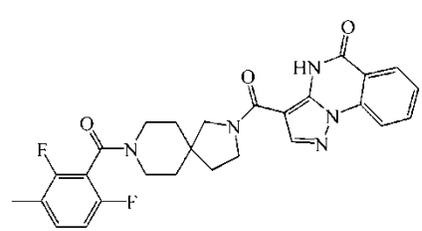
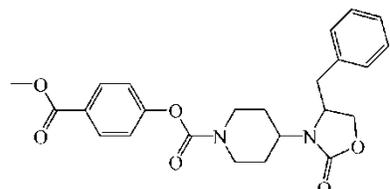
32		1520-03293	3.0	-8.6
33		1520-03820	4.2	-9.2
34		1520-04175	4.2	-8.7
35		1534-09974	3.8	-9.0
36		1548-02420	2.6	-8.7
37		1535-01458	2.8	-9.0
38		1520-03716	2.3	-9.1
39		1534-09962	3.6	-8.9

Tabla 2. Continuación.

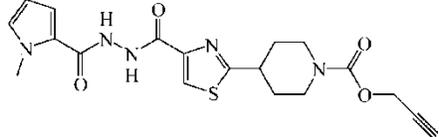
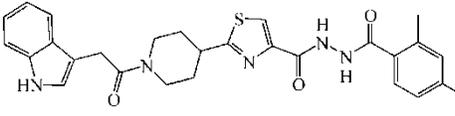
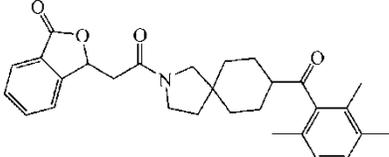
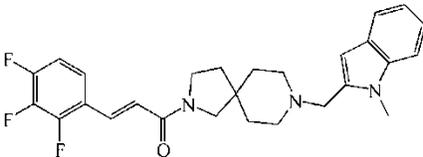
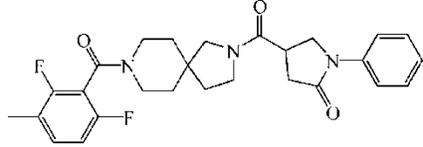
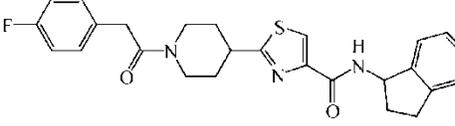
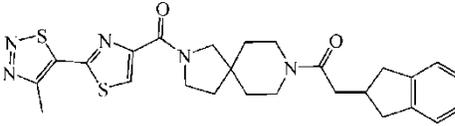
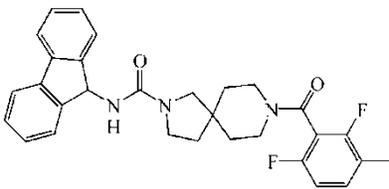
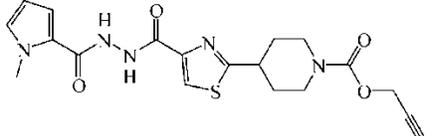
40		1502-14336	0.6	-8.9
41		1506-05646	3.3	-8.7
42		1520-02828	5.0	-8.7
43		1520-02675	4.7	-8.8
44		1520-02847	2.6	-8.8
45		1506-00980	3.6	-8.7
46		1520-01548	3.8	-8.8
47		1520-04427	5.5	-8.9
48		1520-01219	0.7	-8.9

Tabla 2. Continuación.

49		1520-00342	3.6	-9.0
50		1535-01457	2.1	-8.9

\* Log*P* estimado. Molinspiration Property Calculation Service, [www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com).

Tabla 3. Descriptores y estructura 2D para los diez compuestos LeadQuest® con bajo puntaje de unión a TsSOD-Cu/Zn derivado de los estudios de *docking* y usados como controles negativos en los ensayos experimentales.

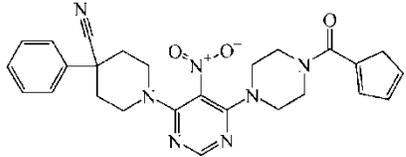
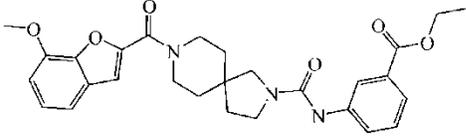
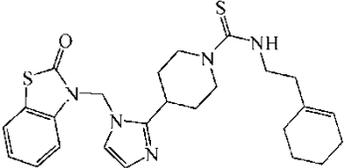
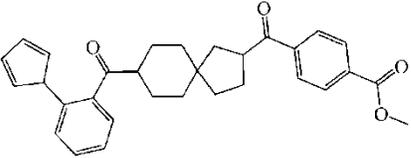
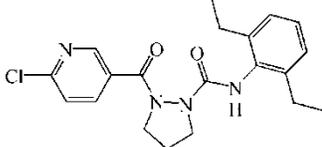
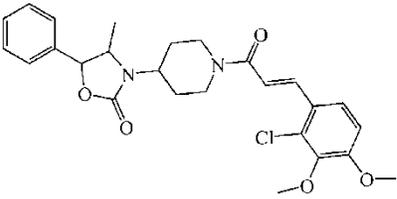
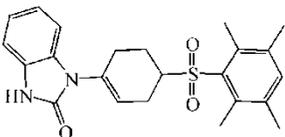
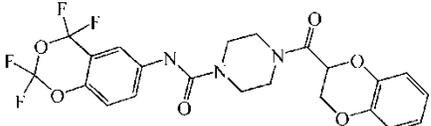
Comp.	Estructura 2D	ID LeadQuest	Mejor puntaje frente a TsCu/Zn-SOD
1		1502-15291	-0.8
2		1520-04399	-1.5
3		1535-07239	-2.1
4		1520-03553	-0.5
5		1511-00744	-1.1
6		1534-03940	-0.9
7		1554-03336	-2.1
8		1527-38466	-1.6

Tabla 3. Continuación.

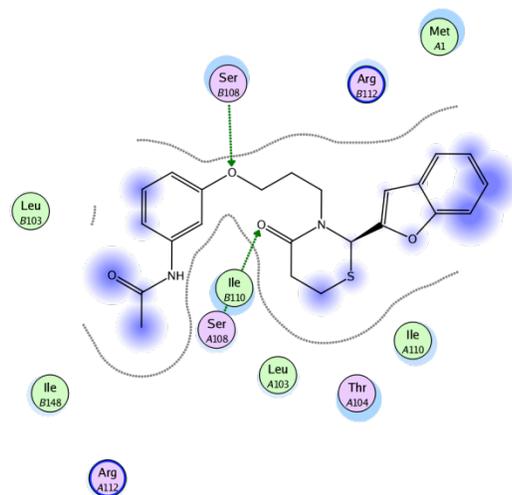
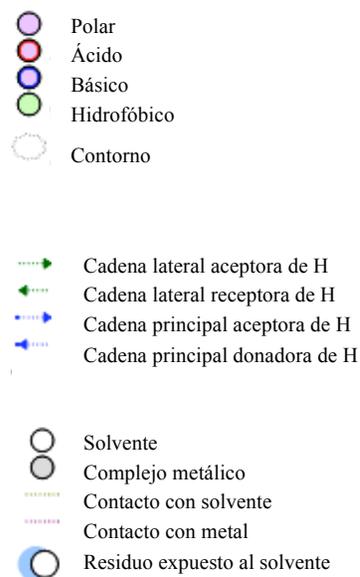
9		1530-01270	0.1
10		1506-01507	-2.0

Tabla 4. Energías de interacción y puntajes de unión en estudios de *docking* antes y después de llevar a cabo la minimización de la energía en tres pasos para los cincuenta compuestos estudiados experimentalmente.

Comp.	Antes de minimizar la energía			Puntaje de <i>docking</i>	Después de minimizar la energía			Puntaje de <i>re-docking</i>	$\Delta E_{int}$
	$E_{interac}$	vdW	elec		$E_{interac}$	vdW	elec		
<b>1</b>	39.77	22.80	16.97	-8.6	-70.18	-37.56	-32.52	-7.3	-109.95
<b>2</b>	336.95	326.47	10.48	-8.7	-60.70	-37.70	-22.99	-8.3	-397.65
<b>3</b>	10.48	-2.37	12.85	-8.8	-73.42	-35.01	-38.41	-7.9	-83.90
<b>4</b>	163.17	152.62	10.55	-9.0	-62.56	-41.78	-20.78	-9.5	-295.75
<b>5</b>	163.38	158.58	4.80	-9.0	-47.37	-33.43	-13.94	-6.9	-210.75
<b>6</b>	78.03	51.23	26.80	-8.9	-23.18	15.53	-7.65	-7.4	-85.70
<b>7</b>	2036.0	2009.0	27.11	-8.9	-59.08	-46.81	-13.27	-7.7	-2095.08
<b>8</b>	57.56	50.04	7.52	-9.3	-69.07	-37.42	-31.64	-6.1	-126.63
<b>9</b>	32.18	17.30	14.81	-9.4	-76.45	-34.49	-41.96	-6.9	-108.63
<b>10</b>	99.64	93.45	6.19	-9.9	-73.07	-31.41	-41.66	-6.8	-172.71
<b>11</b>	8.19	-3.08	11.27	-9.8	-88.01	-42.40	-45.63	-8.8	-96.20
<b>12</b>	-47.02	45.42	1.59	-9.1	-78.03	-38.06	-40.23	-8.7	-125.05
<b>13</b>	38.33	6.80	31.53	-9.7	-80.45	-33.57	-46.80	-7.1	-118.78
<b>14</b>	-25.24	-19.06	-6.18	-9.2	-59.77	-37.07	-22.70	-6.0	-34.53
<b>15</b>	9.16	0.057	9.11	-9.0	-69.47	-30.99	-38.47	-7.5	-78.63
<b>16</b>	31.96	21.28	10.68	-9.2	-73.74	-26.93	-46.80	-7.2	-105.70
<b>17</b>	63.83	46.08	17.74	-9.5	-64.24	-29.32	-34.92	-6.5	-128.07
<b>18</b>	5.38	4.63	0.74	-9.0	-71.72	-32.57	-39.15	-7.5	-77.10
<b>19</b>	23.69	11.33	12.36	-9.3	-50.75	-40.03	-10.72	-7.3	-74.44
<b>20</b>	1071.86	1052.11	19.73	-9.0	-55.46	-28.21	-27.25	-5.9	-1127.32
<b>21</b>	148.9	135.73	13.17	-9.1	-76.96	-38.92	-38.04	-7.1	-225.86
<b>22</b>	-1.94	-7.82	5.88	-9.5	-65.80	-31.05	-34.75	-6.5	-63.86
<b>23</b>	-13.10	-24.46	11.35	-8.7	-47.60	-35.02	-12.57	-6.9	-34.50

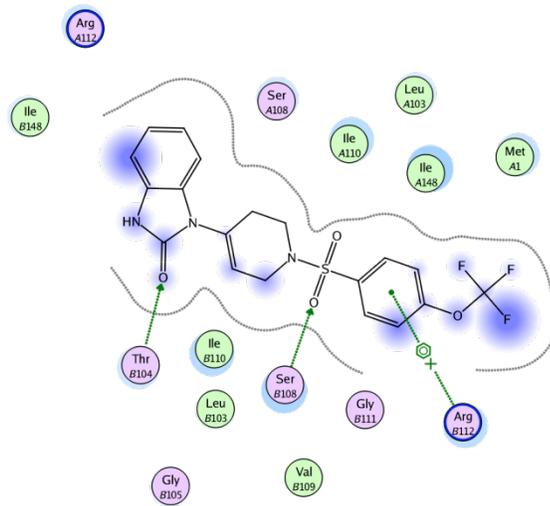
24	51.84	41.11	10.73	-9.0	-94.79	-33.62	-61.17	-7.2	-146.63
25	45.38	56.84	-1146	-9.0	-97.48	-34.12	-63.36	-7.8	-142.86
26	10.33	0.23	10.10	-8.5	-69.59	-39.20	-30.38	-7.8	-79.92
27	101.83	94.48	7.35	-8.7	-67.41	-28.85	-38.55	-7.9	-169.24
28	163.27	159.47	3.80	-9.2	-79.15	-41.67	-37.47	-8.2	-84.13
29	5.75	9.98	-4.22	-9.1	-81.31	-37.76	-43.55	-6.3	-87.06
30	18.47	10.18	8.29	-8.9	-58.39	-36.19	-22.20	-6.4	-76.86
31	79.28	69.08	10.20	-9.1	-79.31	-39.62	-39.69	-7.2	-158.58
32	20.34	8.81	12.53	-8.4	-67.70	-32.41	-35.29	-7.7	-88.04
33	103.33	99.67	3.66	-9.3	-100.41	-18.34	-82.06	-5.0	-203.74
34	10.37	-1.28	11.65	-8.3	-58.63	-36.03	-22.60	-7.7	-69.00
35	884.62	867.06	17.56	-9.0	-59.28	-33.03	-26.25	-7.5	-943.90
36	-25.89	-35.88	9.99	-8.7	-70.42	-35.69	-34.72	-7.9	-44.53
37	44.31	30.04	14.26	-9.0	-69.77	30.76	-39.01	-6.5	-114.08
38	50.14	25.98	24.16	-9.1	-76.01	-34.81	-41.20	-7.0	-126.15
39	14.38	10.11	4.27	-8.6	-58.14	-28.67	-29.47	-7.7	-72.52
40	2036	2009.05	27.11	-8.9	-58.77	-46.22	-12.54	-7.6	-2094.77
41	-2.34	9.06	-11.41	-8.8	-88.63	-36.65	-51.97	-7.1	-90.97
42	75.98	60.89	15.09	-8.7	-62.49	-30.52	-31.96	-7.1	-138.47
43	35.05	33.20	2.45	-8.8	-72.02	-40.59	-31.42	-8.6	-107.07
44	76.46	75.0	1.46	-8.8	-81.88	-34.0	-47.87	-7.5	-158.34
45	2.32	0.39	1.93	-8.7	-61.48	-41.09	-20.39	-5.4	-63.80
46	-6.09	-28.41	22.32	-8.8	-75.59	-41.50	-34.07	-6.1	-69.50
47	136.94	117.36	19.58	-8.9	-76.08	-37.10	-38.98	-7.9	-213.02
48	-21.14	-24.90	3.76	-8.5	-63.65	-30.22	-33.13	-6.3	-42.51
49	-19.99	-28.38	8.38	-8.0	-42.61	-31.69	-10.91	-6.0	-22.62
50	141.18	123.48	17.69	-8.9	-51.6	-38.22	-13.38	-7.0	-192.78

Figura 1. Esquemas de interacción proteína-ligando generadas con MOE *Ligand Interactions* para los compuestos 1–6 en el sitio 1 sobre la superficie de TsSOD–Cu/Zn en la orientación con mejor puntaje. (a) compuesto 1, (b) compuesto 2, (c) compuesto 3, (c) compuesto 4, (d) compuesto 5 y, (e) compuestos 6. Lista de códigos usados:

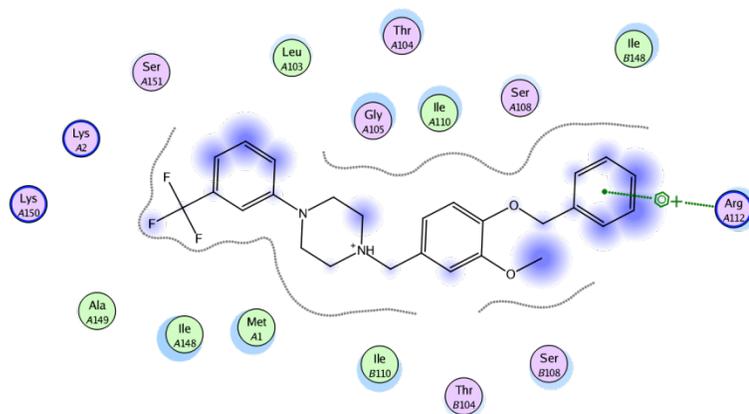


**(a)** Los residuos no conservados entre la SOD–Cu/Zn de humano y *T. solium* que interaccionan con los ligantes en el sitio 1 son: MetA1, ThrA104, SerA108 y SerB108. En todos los esquemas la letra itálica A o B indica la cadena del monómero al que pertenecen los residuos.





(e) Los residuos no conservados entre la SOD–Cu/Zn de humano y *T. solium* que interaccionan con los ligantes en el sitio 1 son: MetA1, ThrA104, SerA108, SB108 y ValA109.



(f) Los residuos no conservados entre la SOD–Cu/Zn de humano y *T. solium* que interaccionan con los ligantes en el sitio 1 son: MetA1, ThrA104, SerA108 and SerB108, LysA150 y SerA151.

# Novel inhibitors to *Taenia solium* Cu/Zn superoxide dismutase identified by virtual screening

P. García-Gutiérrez · A. Landa-Piedra ·  
A. Rodríguez-Romero · R. Parra-Unda ·  
A. Rojo-Domínguez

Received: 21 April 2011 / Accepted: 21 November 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** We describe in this work a successful virtual screening and experimental testing aimed to the identification of novel inhibitors of superoxide dismutase of the worm *Taenia solium* (TsCu/Zn-SOD), a human parasite. Conformers from LeadQuest<sup>®</sup> database of drug-like compounds were selected and then docked on the surface of TsCu/Zn-SOD. Results were screened looking for ligand contacts with receptor side-chains not conserved in the human homologue, with a subsequent development of a score optimization by a set of energy minimization steps, aimed to identify lead compounds for in vitro experiments. Six out of fifty experimentally tested compounds showed

μM inhibitory activity toward TsCu/Zn-SOD. Two of them showed species selectivity since did not inhibit the homologous human enzyme when assayed in vitro.

**Keywords** *Taenia solium* · Superoxide dismutase · Cu/Zn-SOD · Neurocysticercosis · Inhibition · Docking · Molecular operating environment, MOE

## Introduction

Cysticercosis is a parasitic disease caused by infection with the larval stage of *Taenia solium* which occurs when humans become the intermediate host in the life cycle of the helminth [1]. The parasite infects the central nervous system thus producing neurocysticercosis (NCC), considered the most common parasitic disease of the CNS and affects millions of people in developing countries of Latin America, Africa and Asia, as well as in developed countries with a high migration ratio of subjects from endemic areas [2–4]. This condition is associated with severe neurological manifestations including epilepsy, headaches, seizures and other neurological disorders [5]. Conservative estimates describe 50,000 deaths worldwide every year due to neurocysticercosis [6]. The treatment for NCC in humans is based on two drugs: albendazole and praziquantel. Both drugs can cause adverse symptoms in the host, but in general are well tolerated. These drugs are often administered with dexamethasone to decrease the inflammatory reaction produced by the host in response to the death of the parasite, a reaction that some times can also kill the host [7]. To date, there is only one report on drug-resistance to praziquantel and albendazole in Cestode infections found in a patient with neurocysticercosis [8], but resistance to these and other drugs has been reported

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10822-011-9498-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

P. García-Gutiérrez · A. Rojo-Domínguez  
Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,  
09340 México, D.F., México  
e-mail: pgarcia@ciencias.unam.mx

A. Landa-Piedra · R. Parra-Unda  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de  
Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,  
04510 México, D.F., México

A. Rodríguez-Romero  
Departamento de Biomacromoléculas, Instituto de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México,  
D.F., México

A. Rojo-Domínguez (✉)  
Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Cuajimalpa, Pedro A. de los Santos 84,  
Col. San Miguel Chapultepec, 01120 México, D.F., México  
e-mail: arajo@correo.cua.uam.mx

for other helminths such as schistosomes and some nematodes [9, 10]. Therefore, there is an urgent need to develop new drugs with different mechanisms of action.

Superoxide dismutases (SODs) are a group of metallo-enzymes essential for defending organisms against oxidation by the superoxide anion ( $O_2^-$ ) [11, 12]. SODs catalyze in two steps the dismutation of the  $O_2^-$  to molecular oxygen and hydrogen peroxide. Although  $O_2^-$  is a mild reductant, it can cause direct or indirect damage to cell membranes and DNA [13]. Three major classes of SODs have been described on the basis of their prosthetic groups: Fe, Mn, or Cu/Zn. So far, three types of SOD enzymes have been identified in helminths: the mitochondrial Mn-SOD, the cytosolic and an extracellular Cu/Zn-SOD [14, 15]. Organisms lacking these enzymes exhibit a decreased growth rate, shorter life span, hypersensitivity towards redox cycling compounds such as paraquat and quinones, and an increment in spontaneous mutagenesis and death rates [11, 12]. As a other parasitic organisms, *T. solium* must remove endogenous and exogenous  $O_2^-$  produced by its own metabolic processes and, because its larval and adult stages live in tissues, the one produced by host inflammatory response [16].

As reported by some authors [9], albendazole inhibits microtubule formation in parasite by binding to  $\beta$ -tubulin, however, as shown by Sánchez-Moreno et al. [17–19], this drug also inhibits SOD enzymes in helminths, but at high concentrations in the case of *T. solium*, as reported by us [20]. Gómez-Contreras et al. [21] reported recently the synthesis of benzo[g]phthalazine derivatives which selectively inhibit Fe-SOD activity and growth of *Trypanosoma cruzi*. Beznidasole, a drug currently used against trypanosomiasis act through inducing formation of toxic oxygen metabolites such as superoxide anion and hydrogen peroxide [22].

These and other reports suggest that SOD enzymes are involved in parasite defense [15]. Our hypothesis is that inactivation of this enzyme may contribute to weaken the defense mechanisms of the parasite and aid destroying it, thus SOD can be considered a good target for drug design.

Recently, we resolved the crystal structure of recombinant *TsCu/Zn-SOD* at 2.7 Å resolution, an homodimer with 152 residues and one Cu and one Zn atom per active site by monomer (PDB entry 3MND) [23]. It possesses the classical motifs of Cu/Zn-SOD enzymes. All residues directly or indirectly involved in metal binding are completely conserved. Nevertheless an analysis comparing the amino acid sequence of *TsCu/Zn-SOD* with other SODs reported in databases, showed low global identity of 57.2, 57.9 and 59.6% with mammals such as *Sus scrofa* (pig), *Homo sapiens* (human) and *Bos taurus* (bovine), respectively, suggesting that differences in *TsCu/Zn-SOD* can be used to design specific inhibitors.

## Materials and methods

Molecular modeling, electric partial-charge assignment, ligand conformer, searching of potential binding sites, energy minimizations, visualization and docking were performed with molecular operating environment (MOE) [24] package with default parameters, unless otherwise stated. Energy minimizations were carried out until an RMSD (root mean square deviation) force lower than 0.001 was obtained using CHARMM27, an all-atom force field parameterized for proteins, or MMFF94x, parameterized for small organic molecules in medicinal chemistry.

### Generation of 3D conformers from LeadQuest<sup>®</sup> database

Exelgen LeadQuest<sup>®</sup> database [25] was used as the initial chemical space for this study. Each of the 51,068 compounds was prefiltered using Lipinski-like rules as follows: molecular weight <600, LogP <7, donors + acceptors <12, rotatable bonds <7, and transformed into 3D molecular structures using *Import\_Database-MOE*. Then, we generated a chemically diverse 3D conformational database of drug-like molecules with *Conformer\_Import-MOE*, using a cut-off conformational energy of 3 kcal/mol from the minimum energy structure of each compound, as calculated with the MMFF94x force field. The adopted procedure allowed the generation of a chemically diverse 3D conformational database of multiple conformers for each molecule, which was then used for docking. The X-ray structure of *TsCu/Zn-SOD* and human Cu/Zn-SOD (*HsCu/Zn-SOD*, PDB entry 2V0A) were used as protein targets for docking procedures.

Potential binding sites were identified with the *Site-Finder-MOE* and with CASTp server [26]. All crystallographic water molecules were removed from the protein structures before docking. Hydrogen atoms and partial charges were added to the enzyme using the CHARMM27 force field. Charge for Cu and Zn was set to 2<sup>+</sup>. *Dock-MOE* studies used the alpha-site-triangle method [27] to bias the orientation search of the ligand to meaningful trials, and the docking score function named *Affinity dG* was used as implemented in MOE [28]. GW572016 (Lapatinib) is a tyrosine kinase inhibitor that is a potent dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB-1) and ErbB-2. X-ray structure of EGFR bound to GW572016 was well resolved and published [29]. That complex (PDB entry 1XKK) was used as a docking validation. Docking score found with MOE was -11.3, with a root mean square deviation of the pose from the original ligand of 1.93 Å.

### Docking on *TsCu/Zn*-SOD X-ray structure

In a first screening, 15,000 orientations or poses on potential binding sites were probed and evaluated for each conformer from each compound in the 3D conformational database; the top ten scoring poses for each conformer were written out to a new database [30]. In a second step, conformers of compounds with good scores (docking scores  $< -7.5$  units) were resubmitted for evaluation, but allowing in this case the search of 100,000 poses. Only those compounds for which the top scoring energies achieve values lower than  $-8.6$  were selected for further analysis. Energy minimization of the best and/or the most frequently found docked poses for each compound was carried out to refine the orientation of the ligand in the receptor site, and to find the local energy minimum of the ligand-enzyme interactions. Three protocols were designed for optimizing the ligand-enzyme complexes. In method 1, the receptor was treated as a rigid structure and the ligand was allowed to relax into the active site. For method 2, residues of the active site ( $\leq 4.5$  Å) and the inhibitor were allowed to relax while the rest of the receptor were fixed; 3. Finally, in method 3 all residues at 4.5 Å from the ligand were subjected to an energy minimization with the coordinates of the ligand fixed, then only the ligand was relaxed with the fixed new positions of the nearby residues; and finally new energy minimization of contact residues was carried out, again with the ligand fixed. This latter method was the most efficient in further lowering the ligand-enzyme interaction.

After visual inspection of the minimized protein-compound complex, a set of compounds were selected for in vitro testing of their inhibitory potency against pure recombinant *TsCu/Zn*-SOD and commercial *HsCu/Zn*-SOD (Sigma) on basis of several criteria: we searched for ligand binding contacts to non-conserved side chains of the enzyme, shape complementarity, docking score before minimizing energy of complex, predicted LogP less than 5.5, number of hydrogen bonds formed, among others (see [Results and discussion](#) for more details).

Compounds **1–6** were docked on *HsCu/Zn*-SOD X-ray structure with an extensive search of 100,000 poses of each conformer in order to determine their docking score and compare it with *TsCu/Zn*-SOD.

In order to compare docking scores from *Dock-MOE* for compounds **1–6**, we carried out an extensive docking procedure using alternative software. The *AutoDock-Vina* (*Vina*) software [31] was used for flexible docking simulations. The compounds **1–6** were docked into binding site 1 on *TsCu/Zn*-SOD surface. Before docking, water molecules were removed from the X-ray structure. Polar hydrogens and Gasteiger charges were assigned using the *AutoDock-Tools* interface [32]. Then, the size of search

spaces in each dimension (x, y and z) for site 1 was  $26 \times 26 \times 30$  Å with center in  $-10.784$ ,  $0.686$  and  $-31.058$ ; for site 2, dimensions are  $24 \times 24 \times 24$  Å with center in  $-13.799$ ,  $-1.323$  and  $-1.359$ . The other *Vina* default optimization parameters were maintained for docking simulation. Docking scores for the best poses for compounds **1–6** according to *Vina* shown in Table 5 in Supplementary Material.

### *TsCu/Zn*-SOD enzyme inhibition assays

Recombinant *TsCu/Zn*-SOD enzyme was expressed and purified as described previously [20]. Enzyme inactivation was determined indirectly by measuring inhibition of cytochrome *c* reduction caused by  $O_2^-$ , which is produced by the xanthine-xanthine-oxidase system [33]. The reaction was carried out in a final volume of 1.0 mL in the presence of 10 units of recombinant enzyme (specific activity 2,940 units/mg, 3.5 µg enzymes) incubated for 30 min at 37 °C with 100 µM of the selected LeadQuest® compounds [20]. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that causes 50% inhibition of the reduction of cytochrome *c* with incubation times of 2 min [33]. Only compounds with inhibitory activity (more than 30%) against *TsCu/Zn*-SOD were incubated against *HsCu/Zn*-SOD (Sigma, specific activity 4,000 units/mg). For those compounds with a percentage of inhibition of *TsCu/Zn*-SOD greater than the threshold of 60%, a complete set of measurements was performed to determine the IC<sub>50</sub> values.

The tested compounds were purchased from Exelgen Inc. (formerly LeadQuest®). Purity reported by the manufacturer was greater than 95% checked by LC/MS. Stock solutions (10 mM) of each compound were made in DMSO, with similar aliquots of the pure solvent in blank experiments.

## Results and discussion

### Conformer search

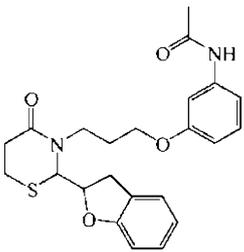
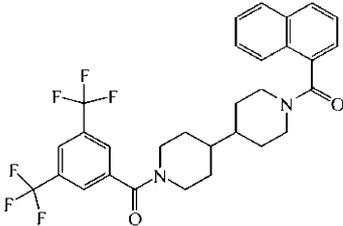
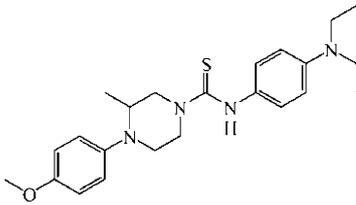
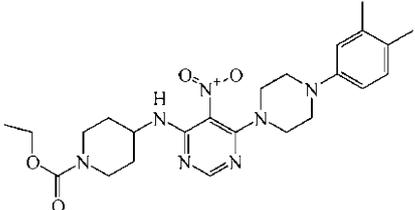
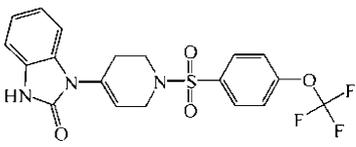
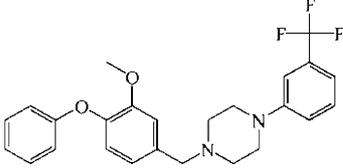
MOE is a drug discovery package [24] used to perform several tasks in this work. In order to simulate ligand flexibility in our docking studies, we generated a set of low-energy conformers for each of the about fifty thousand compounds of the LeadQuest® database as described in the Materials and methods section. A high-throughput fragment-based conformational search [24] allowed the transformation of the original 51,068 compounds library into a new database of about 2 million conformers with energies  $\leq 3.0$  kcal/mol respects to the lowest minimum conformation of each compound. In this sense, Perola and Charifson [34] found that a 3.0 kcal/mol energy cut-off would retain

about 80% (50%) of bioactive ligands with 1–3 (4–6) rotatable bonds. For computational convenience we used this same threshold and accordingly we expect our conformational ensembles to contain a significant number of biologically relevant conformations. This new *in-house* database was then used for docking studies against the X-ray structure of *TsCu/Zn*-SOD.

### Molecular docking

Before starting our docking calculations we determined potential sites for ligand binding from the 3D atomic coordinates of the *TsCu/Zn*-SOD. Active sites are usually hydrophobic pockets that involve side chain atoms tightly packed [35]; thus we searched for these sites on the

**Table 1** Structure and biological activity of LeadQuest® compounds identified by virtual screening procedure that showed *in vitro* inhibition activity for *TsCu/Zn*-SOD

Compound	Structure	Best score against <i>TsCu/Zn</i> -SOD (and against the human homologue)	Preferred binding site according to best scores	<i>TsCu/Zn</i> -SOD IC <sub>50</sub> (μM)
1		-8.6 (-5.5)	1	- <sup>a</sup>
2		-8.7 (-6.0)	1, 2	23.9
3		-8.8 (-6.1)	1	9.8
4		-9.0 (-6.0)	1	25.9
5		-9.0 (-6.3)	1, 2	- <sup>a</sup>
6		-8.7 (-5.9)	1, 2	- <sup>a</sup>

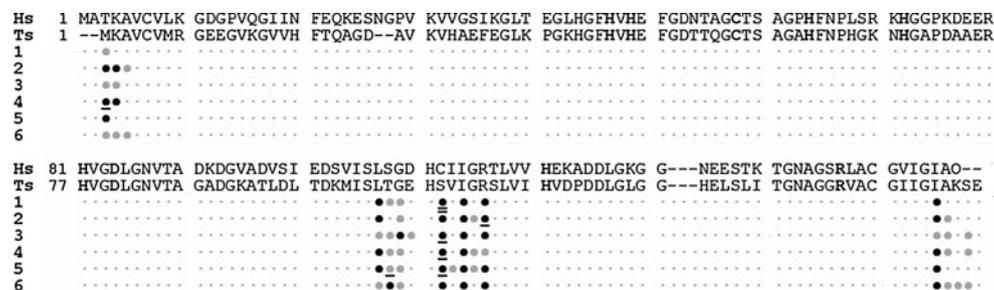
<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were only measured when the % inhibition was >60% at 100 μM of compound (see [Materials and methods](#) for more details)

molecule surface by filtering out sites with significant convex surfaces too exposed to solvent. The residues directly or indirectly involved in metal binding are conserved among the Cu/Zn-SODs from all species so far examined, from bacteria to mammals; therefore in order to attain species selectivity, the cavities from these sites were also discarded. On this basis, more than twenty potential sites were detected and distributed over the entire surface of the dimer, which were labeled as site 1, site 2, site 3, and so on (see Table 1 in Supplementary Material for the whole list and description). Sites 1 and 2 are the more prominent in size; they are located near the interface region and formed by atoms from 32 to 20 different residues, respectively, a reflection of their large site dimension. Site 1 and 2 are located in opposed parts of the dimer interface, so that potential binding sites are facing away from each other. Site 1 has an extended shape while site 2 is more compact one; both sites are rich in hydrophobic residues. Moreover, sites 1 and 2 are not strictly conserved between *TsCu/Zn-SOD* and *HsCu/Zn-SOD* sequences, which transform these sites in attractive targets for designing species-specific inhibitors. In contrast, the rest of the potential sites (3–22) are much smaller, exposed to solvent, and in many cases, well conserved respect to the human enzyme.

In a first stage, the previously generated conformers for each ligand were scanned against all sites on the *TsCu/Zn-SOD* surface, using 15,000 poses of probe for each conformer. We noticed that sites 1 and 2 always presented the highest docking scores while other sites always showed lower scores; therefore in the subsequent step, ligands with docking scores better than  $-7.5$  (*c.a.* 500 different compounds) were re-scanned only on sites 1 and 2, but now with 100,000 poses of each conformer in order to include virtually all orientations for binding each of those compounds. This procedure yielded complexes with much better docking scores, those whose docking scores were better than  $-8.6$  were then submitted to an energy

minimization process in order to improve the interactions at the binding sites. This optimization process was carefully designed testing and evaluating different schemes of partial minimizations of the structure of the complexes (see Materials and methods for more details). We found a procedure aimed to find a better positioning of the ligands into the binding site, as judged from lowering the previously obtained ligand–enzyme energy interaction. This procedure consist in (1) first all residues at  $4.5 \text{ \AA}$  from the ligand were subjected to an energy minimization with the coordinates of the ligand fixed, (2) then only the ligand was relaxed with the fixed new positions of the nearby residues, and finally (3) a new energy minimization of contact residues was carried out, again with the ligand fixed. This 3-step methodology optimized the protein–ligand contacts by allowing a better rearrangement of the side chains of the binding site and the position of the ligand as is reflected in the potential energy of the protein–ligand contacts (see Table 4 in Supplementary Material for more information).

Overall, the search for conformers and binding energy in three steps used in this work intended to include part of the conformational response of the enzyme due to the presence of the ligand in its binding site. From our results, a set of fifty compounds were selected to be tested in vitro against recombinant pure *TsCu/Zn-SOD* enzyme. The final compound selection which yielded the set of 50 compounds, included a final screening from the highest scored ligands identified by docking, it also included considerations of docking score, ligand–enzyme energy interaction, hydrophilicity, selectivity, molecular weight and robustness of prediction. Since it is our experience that hydrophobic compounds aggregate when dissolved from DMSO stock solution into aqueous inhibition tests, we privileged hydrophilicity in the final selection process. With respect to selectivity we gave preference to compounds forming contacts (e.g. hydrogen bonds) to non-conserved side chains of the receptor, to gain selective inhibition to



**Fig. 1** *TsCu/Zn-SOD* and *HsCu/Zn-SOD* sequence alignment. Several (identity: 57.9%) residues are not conserved between sequences. Residues in contact ( $\leq 4.5 \text{ \AA}$ ) with ligands 1–6 at site 1 on the *TsCu/Zn-SOD* surface are indicated by circles. Black color indicates that the ligand interacts with the residues in the chains A and B; gray color indicates that the ligand interacts with the residue only

in one chain. Intrachain disulphide cysteine residues, conserved residues in the active site, and involved in Cu and Zn binding are in bold letters. Lines below the circles indicate the number of hydrogen bonds between ligand and residues, see Figure 1 in Supplementary Material for more details

parasitic SOD with respect to the human enzyme. In this respect, Fig. 1 shows *TsCu/Zn*-SOD and *HsCu/Zn*-SOD sequence alignment (identity: 57.9%). Residues in contact with ligands 1–6 at site 1 on the *TsCu/Zn*-SOD surface, according to our docking results, are indicated by circles: several residues present only in *TsCu/Zn*-SOD interact with 1–6 through hydrogen bonds. Finally, with robustness we mean the frequent finding of slightly different poses of the same compound with high scores, which means that small changes in orientation still yield a good predicted docking score. In addition, we also included ten compounds with medium and low docking score to use them as negative controls (structures, identifications and scores for all compounds used are depicted in Tables 2 and 3 in Supplementary Material). This includes compounds with low affinity for sites 1 and 2 and some of the best ligands for other binding sites. All candidate compounds were first evaluated for their ability to inhibit the activity of *TsCu/Zn*-SOD at 100  $\mu\text{M}$ : six of the fifty tested compounds demonstrated >30% inhibition of the enzyme at  $\mu\text{M}$  concentrations. Table 1 and Fig. 2 show the structures of active compounds (1–6), and the residual activity of recombinant *TsCu/Zn*-SOD obtained after incubation with 100  $\mu\text{M}$  of these compounds, respectively. Examination of these active compounds revealed a diversity of chemical structures, they have molecular weights between 430 and 560 Da, estimated LogP [36] lower than 5.5, no more than 10 H-bond acceptors and a low flexibility. A common structural feature present in compounds 3, 4 and 5 is a piperazine group. Three other chemical classes are

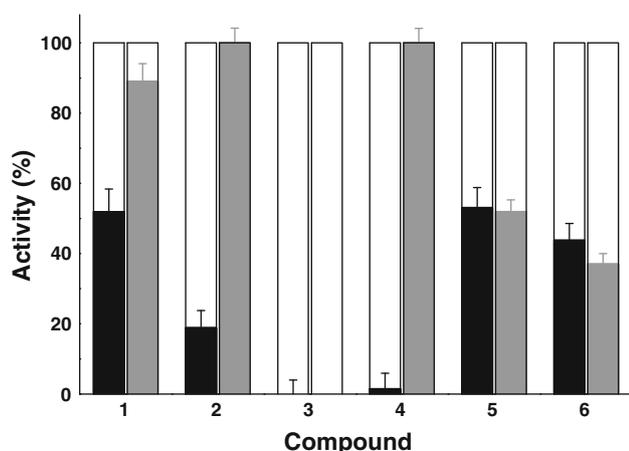
constituted by sulfonamide, biperidinyll and acetanilide derivatives. Clearly, their inhibitory capacity comes from their tight fitting to the binding site more than being variations or derivatives from a common structure. Six real in vitro hits out of fifty putative inhibitors represent an experimental-hit ratio of 12%  $[(6/50) \times 100]$ , which demonstrates the success of the virtual screening procedure. The rest of the tested compounds, including the negative controls, yielded very low or no inhibition and were considered as inactive. The aim of this work was to find agents that selectively inactivate *TsCu/Zn*-SOD. Therefore, in order to determine the docking scores of compounds 1–6 to *HsCu/Zn*-SOD we carried out an extensive docking procedure on the surface of this human enzyme. We found that the docking scores were always lower for the human enzyme than for the *T. solium* SOD, in good agreement with our experimental results: the best score occurs when compound 5 binds to site 2 with a docking score equal to  $-5.5$ .

Finally, we found that the *Vina* docking scores and poses for compounds 1–6 over site 1 on *TsCu/Zn*-SOD were in good agreement with *Dock-MOE* results (see Table 5 in Supplementary Material).

#### Enzyme inhibition assay

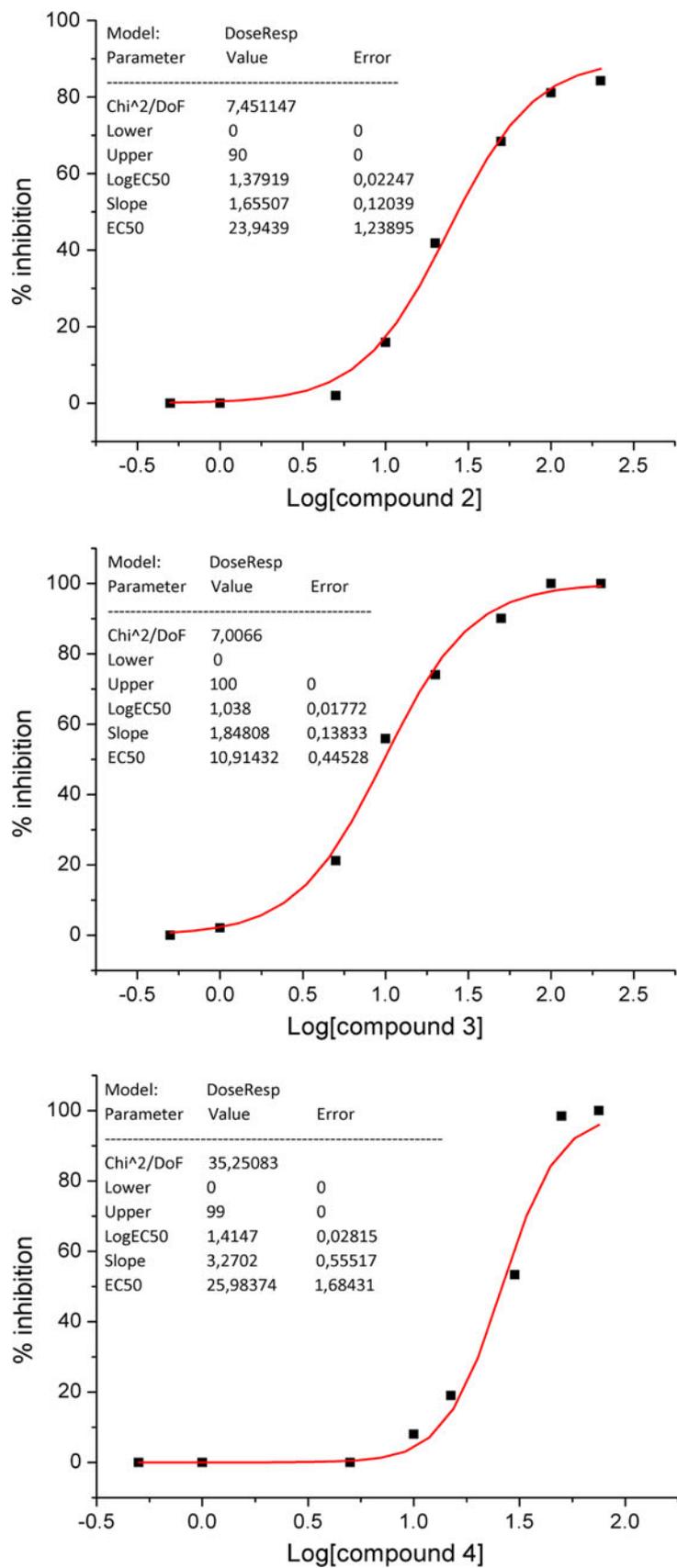
Concentration of 100  $\mu\text{M}$  of compound 2 diminished the *TsCu/Zn*-SOD activity in 73%; in contrast, the same concentration of this compound did not show any effect on *HsCu/Zn*-SOD activity. Compound 3 had an important impact on the *TsCu/Zn*-SOD activity, showing 100% inhibition. Unfortunately, effects on human enzyme could not be assayed because unexpected and systematic precipitation in the reaction medium was observed, hence the lacking bar for this assay in Fig. 2. However, the residual activity of *HsCu/Zn*-SOD and *TsCu/Zn*-SOD at 10  $\mu\text{M}$  of the same compound are 92% and 52%, respectively. The most remarkable results were obtained with compound 4, which affected *TsCu/Zn*-SOD activity in 96% at 50  $\mu\text{M}$ , whereas it had no detectable effect on human Cu/Zn-SOD at the same concentration. With respect to compounds 1, 5 and 6, they considerably affected the enzymatic activity of *TsCu/Zn*-SOD (49, 48 and 48% of inhibition, respectively) after incubation at 100  $\mu\text{M}$ , but affecting the activity of human enzyme at similar levels; therefore, they can be considered as nonspecific inhibitors. The  $\text{IC}_{50}$  for compounds 2, 3 and 4, (23.9, 10.9 and 25.9  $\mu\text{M}$ , respectively, Fig. 3) confirm that these compounds are good inhibitors, and the last two are also specific for the taenia enzyme. The inactivating effect of 2, 3 and 4 was concentration dependent. It is noted that the inactivating curves were sigmoidal.

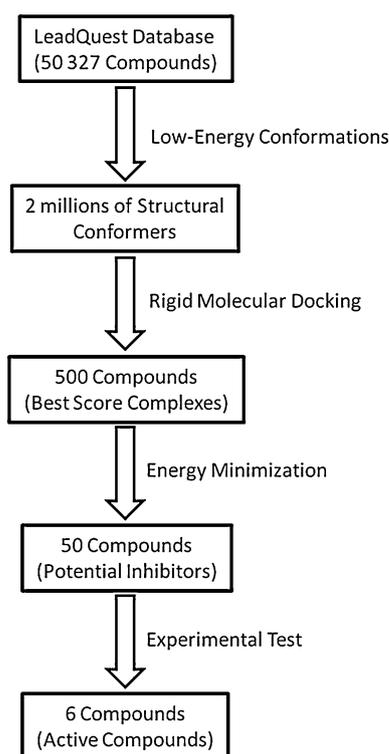
The procedure and results presented here are outstanding due to the identification of novel lead compounds to



**Fig. 2** Inhibition of *T. solium* and human Cu/Zn-SOD activity by incubation with active LeadQuest® compounds, determined by xantine-xantine-oxidase method. *T. solium* (black bars; 10 Units, 3.5  $\mu\text{g}$  enzymes) and human Cu/Zn-SOD (grey bars; 10 Units) were incubated in presence of 100  $\mu\text{M}$  for 30 min at 35  $^{\circ}\text{C}$  of compounds: 1, 2, 3, 5 and 6, and 50  $\mu\text{M}$  of compound 4. Effects of compound 3 on human enzyme could not be assayed because unexpected and systematic precipitation in the reaction medium was observed

**Fig. 3** Curves of inhibition versus inhibitor concentration for compounds **2**, **3** and **4**. See Materials and methods for more details





**Fig. 4** Flow chart showing the search for lead compounds as inhibitors of *TsCu/Zn-SOD* activity by virtual screening followed by experimental assays. Numbers represent the amount of molecules selected after each stage

develop more powerful compounds in a future aimed to the design of specific drugs against parasites (Fig. 4).

According to our docking results, compounds **1–6** bind near the dimer interface (i.e. sites 1 and/or 2) where the interaction with various conserved and non-conserved residues is strong. For example, compound **4** presented the best inhibitory activity toward *TsCu/Zn-SOD* and did not inhibited *HsCu/Zn-SOD* at all. Interestingly, we found that all the docked complexes of this compound with docking scores below  $-7.5$  could only be identified at site 1 (Fig. 5). Compound **4**, docked in its most frequent pose on the *TsCu/Zn-SOD* surface, forms a hydrogen bond between the N atom of its pyrimidine ring and the hydroxyl oxygen of the non-conserved SerB108 (Ser108, chain B). Another hydrogen bond was established between the CO group of the carboxylic ethyl ester moiety of the ligand and the NH group of MetB1, also a non-conserved residue. Furthermore, the high predicted stability of the complex resulted also from a good shape complementarity, and also from dipole–dipole and van der Waals interactions with nearby residues: the piperazine moiety is located near MetA1, LysA2, LeuA103, SerA108, IleA110, and IleA148, while the pyrimidine ring is surrounded by LeuB103, ThrB104 and IleB110. Good binding poses for compounds **2**, **5** and **6** (i.e. docking scores  $<-7.5$ ) are identified

indistinctly in both sites 1 and 2. Compounds **1** and **3** seem to bind exclusively to site 1 as previously described for compound **4**. In Fig. 1, the contact residues (lower than 4.5 Å) in binding site 1 for all active compounds are indicated, and the protein residues which form hydrogen bonds are highlighted. Selectivity might arise from different short and medium distance interactions. Some of the most relevant short-distance contacts include parasite residues: Thr104, and hydrogen bonding to Ser108, Met1, Lys150, Ser151. All these residues in taenia enzyme are different in the human orthologue. Figure 6 shown binding poses of compound **6** in sites 1 and 2 on the surface of *TsCu/Zn-SOD* enzyme after docking and the 3-step energy minimization protocol. Schemes of protein–ligand interactions are shown in Figure 1 in Supplementary Material.

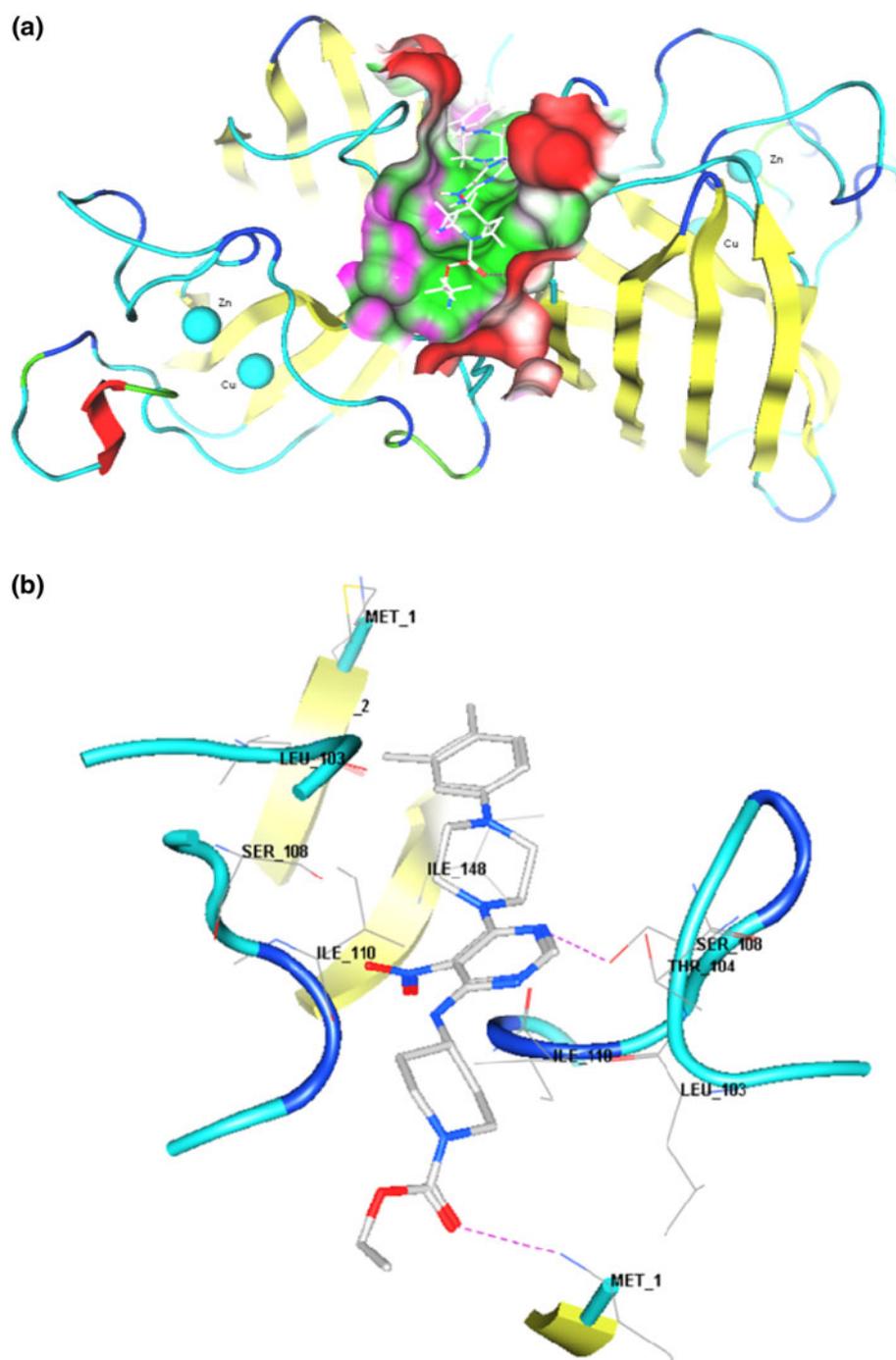
It must be considered that docking scores are designed as a fast evaluation of multiple poses of every conformation analyzed from each potential ligand, to select the top scored compounds as an enriched subset of the chemolibrary, and not as an accurate predictor of binding affinity or biological activity. Albeit in some publications certain correlation between  $IC_{50}$  and docking scores can be found, it must be considered that for the above reason, a high correlation between docking score and  $IC_{50}$  must not be always expected [37].

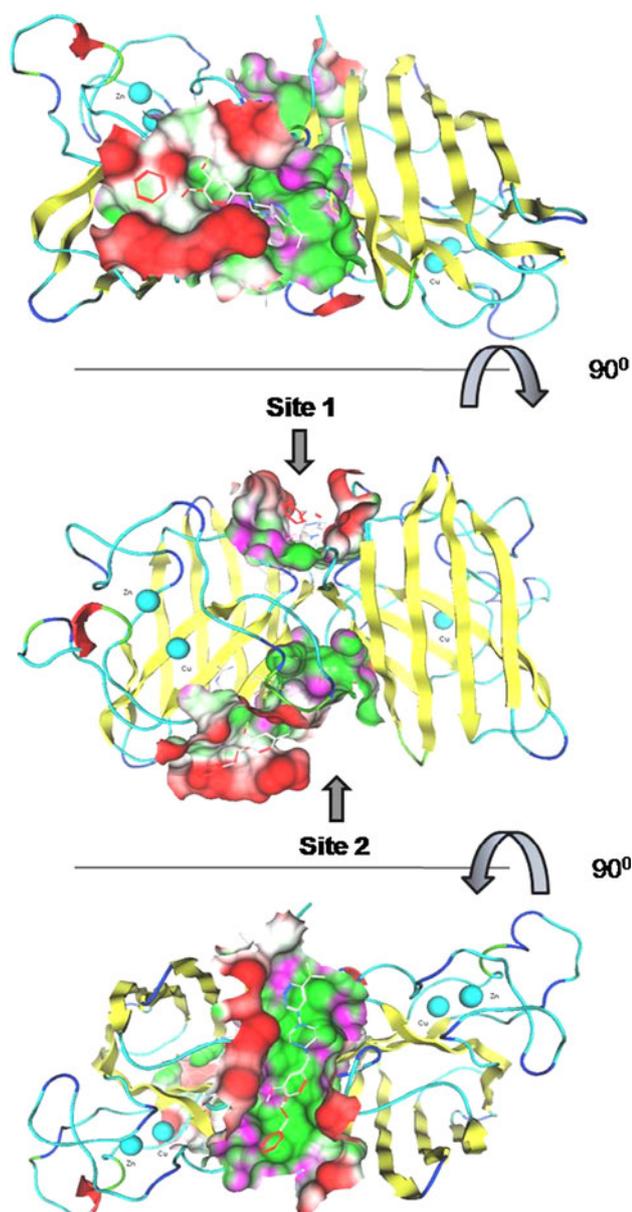
We found in our case of study that although docking is sometimes seen as an automatic procedure, human intuition to get advantage of robustness and selectivity may still be a good ingredient during the analysis of docking results.

As far as we know, this is the first time that inhibitors have been proposed and tested for this enzyme; specifically, compounds **1–6** can be considered as novel inhibitors of *TsCu/Zn-SOD* and could constitute a set of starting points to design more powerful inhibitors opening a new way to tackle infections of *T. solium* and other parasites.

Many enzymes and proteins are regulated by their quaternary structure and/or by their association in homo and/or hetero-oligomer complexes. Thus, these protein–protein interactions can be good targets for blocking or modulating protein function therapeutically [38] Eukaryotic Cu/Zn-SOD has a stable  $\beta$ -barrel fold and a dimer assembly, shows diffusion-limited catalysis and electrostatic guidance of their free-radical substrate. Disruption of the quaternary structure appears to decrease the catalytic activity: Banci and coworkers [39, 40] have replaced two hydrophobic residues (Phe50 and Gly91) at the dimer interface of the human enzyme, producing a soluble monomer with a much lower activity (around 10%) than that of the native dimeric enzyme. Using X-ray diffraction [41] as well as NMR techniques [39], these authors observed changes in the conformation of the loop (residues 120–139) responsible for generating the electrostatic potential for driving superoxide anions to the metallic ions

**Fig. 5** **a** Binding pose of compound **4** in the *Ts*Cu/Zn-SOD binding site 1 after docking and the 3-step energy minimization procedure. **b** Network of hydrogen bonds (red dashed lines) between **4** and the amino acids in the *Ts*Cu/Zn-SOD binding site 1. See description in the text





**Fig. 6** Binding poses of compound **6** in sites 1 and 2 on the surface of *TsCu/Zn-SOD* enzyme after docking and the 3-step energy minimization procedure

at the active site. Also the backbone mobility of the monomeric state was investigated with molecular-dynamics simulations and compared to that of the dimeric species and it was concluded that, as far as motions in the picoseconds to nanoseconds timescale are concerned, the region consisting of residues 131–142 is less mobile in the monomeric mutant than in the dimeric wild-type protein. Structural fluctuations in this region have been suggested to play a role in assisting the superoxide anion in sliding towards the active site [42, 43].

On these bases, we suggest that compounds **1–6** affect the enzyme activity either by disrupting the monomer–

monomer interface or by restricting the movements of the loops at each monomer, thus limiting the diffusion of the substrate to the reaction site.

Further studies are being carried out in order to establish the molecular mechanism of the inhibitory action of these compounds.

## Conclusion

In summary, six new inhibitors of the *TsCu/Zn-SOD* enzymatic activity have been discovered using a methodology developed here which consisted in generating a conformational database from the LeadQuest® database, docking procedures, species selectivity filtering, and finally a proposal of subsequent ligand optimization based on three energy minimization steps over the best protein–ligand complex scores. Three of these compounds showed excellent selectivity to *TsCu/Zn-SOD* since they affect the activity of this enzyme at  $\mu\text{M}$  range but did not show inhibition against *HsCu/Zn-SOD*. Results obtained here are very promising, and now further studies are being carried out to determine the mechanism involved in the inactivation observed against *TsCu/Zn-SOD* and *HsCu/Zn-SOD* for compounds **1–6**.

**Acknowledgments** This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACyT, 105532, 80134-M, ECOS M05-501) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DEGAPA, IN 207507-3). P.G.-G. and R.P.-U. also thank CONACyT for graduate studies grants.

## References

1. Del Brutto OH, Sotelo J, Roman GC (1998) Neurocysticercosis: a clinical handbook. Swets and Zeitlinger Publisher, Lisse, pp 216–222
2. García HH, González AE, Evans CA, Gilman RH (2003) *Taenia solium* cysticercosis. Lancet 362:547–556
3. Wallin MT, Kurtzke JF (2004) Neurocysticercosis in the United States. Review of an important emerging infection. Neurology 63:1559–1564
4. Bern C, García HH, Evans C, González AE, Verastegui M, Tsang VC, Gilman RH (1999) Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. Clin Infect Dis 29:1203–1209
5. Carpio A, Escobar A, Hauser WA (1998) Cysticercosis and epilepsy: a critical review. Epilepsia 39:1025–1040
6. Mafojane NA, Appleton CC, Krecek RC, Michael LM, Willingham AL (2003) The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. Acta Trop 87:25–33
7. Takayanagui OM, Jardim E (1992) Therapy for neurocysticercosis: comparison between albendazole and praziquantel. Arch Neurol 49:290–294
8. Chong MS, Hawkins CP, Cook GC, Hawkes CH, Kocen RS (1991) A resistant case of neurocysticercosis. Postgrad Med J 67:577–578

9. Köhler P (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* 31:336–345
10. Stepek G, Behnke JM, Buttle DJ, Duce IR (2004) Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitol* 20:323–327
11. Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203–1209
12. Vaca-Paniagua F, Torres-Rivera A, Unda-Parra R, Landa A (2008) *Taenia solium*: Antioxidant metabolism enzymes as target for cestocidal drugs and vaccines. *Curr Top Med Chem* 8:393–399
13. Birnboim HC, Kanabus-Kaminka M (1985) The production of DNA strands breaks in human leukocytes by superoxide anion may involve a metabolic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6820–6824
14. Henkle-Dührsen K, Kampkötter A (2001) Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 114:129–142
15. Loverde PT (1998) Do antioxidants play a role in schistosoma host parasite interactions? *Parasitol Today* 4:284–289
16. Monroy-Ostria A, Monroy-Ostria TJ, Gómez G, Hernández MO (1993) Some studies on experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev Lat Microbiol* 35:91–98
17. Sánchez-Moreno M, León P, Salas-Peregrin JM, Osuna A (1988) Superoxide dismutase in trematodes. *Arzneimittelforschung* 37:903–905
18. Sánchez-Moreno M, García-Ruiz A, García-Rejón L, Valero A, León P (1989) Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis. *Drug Res* 39:759–761
19. Sánchez-Moreno M, Entrala E, Janssen D, Fernández-Becerra C, Salas-Peregrin JM, Osuna A (1996) Inhibition of superoxide dismutase from *Ascaris suum* by benzimidazoles and synthesized pyrimidine and glycine derivatives. *Pharmacology* 52:61–68
20. Castellanos-González A, Jiménez L, Landa A (2002) Cloning, production and characterization of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol* 81:541–546
21. Sanz AM, Gómez-Conteras F, Navarro P, Sánchez-Moreno M, Boutaleb-Charki S, Campuzano J, Pardo M, Osuna A, Cano C, Yunta MJR, Campayo L (2008) Efficient inhibition of iron superoxide dismutase and of growth *Trypanosoma cruzi* by benzo[g]phthalazine derivatives functionalized with one or two imidazole rings. *J Med Chem* 51:1962–1966
22. Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM (1998) Overexpression of superoxide dismutase in *T. cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benzimidazole. *Mol Biochem Parasitol* 96:167–176
23. Hernández-Santoyo A, Landa A, González-Mondragón E, Pedraza-Escalona M, Parra-Unda R, Rodríguez-Romero A (2011) Crystal structure of Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium* reveals metal-mediated self-assembly. *FEBS J* (In press)
24. Molecular Operating Environment (MOE). Chemical Computing Group, Inc. CCG, Montreal, Canada. <http://www.chemcomp.com>. Versions 2005.06 and 2007.09
25. LeadQuest® Compound Library, April 2006, Exelgen, Inc. 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144 USA
26. Liang J, Edelsbrunner H, Woodward C (1998) Anatomy of protein pockets and cavities: Measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci* 7:1884–1897
27. Edelsbrunner H Weighted Alpha Shapes. Department of Computer Science, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61810
28. This function estimates the enthalpic contribution to the free energy of binding using a linear function:  $G = C_{hb/fhb} + C_{ion/fion} + C_{mlig/fmlig} + C_{hh/fhh} + C_{hp/fhp} + C_{aa/faa}$ , where the  $f$  terms fractionally count atomic contacts of specific types and the  $C$ s are coefficients that weight the term contributions to estimate the docking score
29. Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, Yuan D, Hassell A, Dickerson SH, Ellis B, Pennisi C, Horne E, Lackey K, Allgood KJ, Rusnak DW, Gilmer TM, Shewchuk L (2004) A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 64:6652–6659
30. Kuntz ID (1993) Structure–base strategies for drug design and discovery. *Science* 33:107–115
31. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455–461
32. Sanner MF (1999) Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* 17:57–61
33. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049–6055
34. Perola E, Charifson P (2004) Conformational analysis of drug-like molecules bound to proteins: An extensive study of ligand reorganization upon binding. *J Med Chem* 47:2499–2510
35. Laurie ATR, Jackson RM (2006) Methods for the prediction of protein–ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. *Curr Protein Pept Sci* 7:395–406
36. Molinspiration Property Calculation Service. <http://www.molinspiration.com>
37. Park MS, Dessal AL, Smrcka AV, Stern HA (2009) Evaluating docking methods for prediction of binding affinities of small molecules to the G protein beta-gamma subunits. *J Chem Inf Model* 49:437–443
38. Cardinale D, Salo-Ahen OMH, Ferrari S, Ponterini G, Cruciani G, Carosati E, Tochowicz AM, Mangani S, Wade RC, Costi MP (2010) Homodimeric enzymes as drug targets. *Curr Med Chem* 17:826–846
39. Banci L, Benedetto I, Bertini R, Del Conte M, Piccioli M, Viezzoli MS (1998) Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase. Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 37:11780–11791
40. Banci L, Bertini I, Del Conte R, Mangani S, Viezzoli MS, Fadin R (1999) The solution structure of a monomeric reduced form of human copper, zinc superoxide dismutase bearing the same charge as the native protein. *J Biol Inorg Chem* 4:795–803
41. Ferraroni M, Rypniewski W, Wilson KS, Viezzoli MS, Banci L, Bertini I, Mangani S (1999) The crystal structure of the monomeric human SOD mutant F50/G51E/E133Q at atomic resolution. The enzyme mechanism revisited. *J Mol Biol* 288:413–426
42. Luty BA, El Amrani S, McCammon JA (1993) Simulation of the bimolecular reaction between superoxide and superoxide dismutase: synthesis of the encounter and reaction steps. *J Am Chem Soc* 115:11874–11877
43. Banci L, Bertini I, Cramaro F, Del Conte R, Rosato A, Viezzoli MS (2000) Backbone dynamics of human Cu, Zn superoxide dismutase and of its monomeric F50/EG51E/E133Q mutant: The influence of dimerization on mobility and function. *Biochemistry* 39:9108–9118