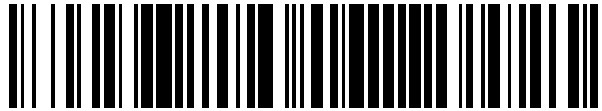


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 177**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 9/50</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/99</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/34</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/37</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/42</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/44</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2002 PCT/US2002/12611**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2002 WO02086115**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2002 E 02728885 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 1379634**

54 Título: **Inactivadores de sitio activo**

30 Prioridad:

**20.04.2001 WO PCT/US01/12919**  
**20.04.2001 US 839428**  
**31.10.2001 US 335025 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
623 BOYD GRADUATE STUDIES RESEARCH  
CENTER  
ATHENS, GA 30602-7411, US**

72 Inventor/es:

**BAIG, SALMAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 662 177 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inactivadores de sitio activo

5 **Antecedentes de la invención**

Las enzimas de corte peptídico son especies químicas importantes en la naturaleza que escinden moléculas de péptidos y proteínas en regiones específicas, ya sea escindiendo la cadena principal o escindiendo un grupo o sustituyente prostético, donde los patrones de escisión se determinan mediante reconocimiento enzimático de subdominios de sustrato y mediante la configuración particular de cada uno sitio activo de la enzima de corte peptídico en el estado de transición y/o en el estado basal. En lo sucesivo, la expresión enzima de corte se refiere a una enzima de corte peptídico. Actualmente, entre los miembros más importantes de esta clase de enzimas están las proteasas, que escinden los enlaces peptídicos y que desempeñan papeles clave en los procesos patológicos de muchos organismos patógenos. Otros miembros importantes incluyen, por ejemplo: proteína fosfatasa, que son importantes en la regulación fisiológica de la actividad enzimática; esterases, tales como esterases de aminoácidos; enzimas que escinden cadenas laterales basadas en sacáridos de proteínas; enzimas que escinden lipoproteínas o proteínas funcionalizadas con lípidos; y enzimas que escinden los cofactores de las proteínas. Nótese que la mayoría de las enzimas proteolíticas también catalizan la hidrólisis de un enlace éster, por lo tanto, un avance científico en la manipulación de la química de una categoría de escisión enzimática puede ser transferible a otras categorías reactivas de escisión.

La utilidad de inhibir enzimas de corte se ilustra mediante inhibidores de proteasa, que se encuentran entre las clases más prometedoras de fármacos para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades devastadoras, que incluyen, pero no se limitan a SIDA, cáncer, malaria, diabetes, enfermedad de Alzheimer y artritis. Estas enfermedades proliferan usando proteasas para escindir las proteínas celulares, debilitando y potencialmente matando al huésped. Los fármacos inhibidores de proteasa tratan estas enfermedades inhibiendo la proteasa patológica. Hasta hace poco, la mayoría de estos fármacos se producían mediante un mecanismo de prueba y error (Appelt y col., 1991). Para combatir los problemas inherentes a este proceso aleatorio, el diseño racional de fármacos se introdujo e implementó en la década de 1990 (Appelt y col., 1991). El diseño racional de fármacos emplea compleja modelización informática tridimensional, química combinatoria y cribado de alto rendimiento (HTS). Este avance allanó el camino para el desarrollo de inhibidores de la proteasa del VIH (Vacca y col., 1994, Erickson y col., 1990, Roberts y col., 1990). Los éxitos de los inhibidores de proteasa también se han observado para otros trastornos, incluida la hipertensión arterial (Radzicka y Wolfenden, 1996).

La quimioterapia con inhibidores de proteasa antiparasitarios ha demostrado ser eficaz en modelos animales. Se ha demostrado que los dipéptidos derivatizados con fluorometilcetona curan la malaria murina (Rasnick, 1985); los dipéptidos derivatizados con vinilsulfona pueden curar la infección de la leishmaniasis cutánea (Palmer y col., 1985) y la replicación de la enfermedad de Chagas por *Trypanosoma cruzi* en modelos animales (Bromme y col., 1996); y los inhibidores de cisteína proteasa pueden detener o curar modelos animales de esquistosomiasis (Rasnick, 1985). Además, las investigaciones han demostrado que se pueden conseguir curas totales de la carga de parásitos letales con regímenes de dosificación de inhibidores de proteasa clínicamente aceptables (Bromme y col., 1996) y mediante vías de administración oral (Klenert y col., 1992). Finalmente, la falta de toxicidad observada en muchos tratamientos con inhibidores de proteasa, incluso cuando el inhibidor no era completamente específico para su diana, ha atraído una atención significativa hacia estos compuestos como plataformas atractivas para el desarrollo de quimioterapia. Esta ausencia de efectos secundarios del huésped puede estar relacionada con la falta relativa de redundancia en las proteasas de organismos extraños en comparación con los sistemas de mamíferos en los que residen (McKerrow y col., 1999). Además, las proteasas del huésped pueden simplemente exceder la concentración de proteasas dentro del organismo extraño. Además, los patógenos pueden adaptarse naturalmente a la ingesta y, en consecuencia, concentrarse los inhibidores de peso molecular pequeño. De hecho, el desarrollo de modelos animales para enfermedades infecciosas ha demostrado el atractivo de los inhibidores de proteasa para el modelo de diseño racional de fármacos.

El diseño racional de fármacos tiene, no obstante, limitaciones graves con respecto a la velocidad (Service, 2000), el coste (Service 2000) y la eficacia (Ladbury y Peters, 1994). Por ejemplo, una mayoría significativa de estructuras de cristal de rayos X para dianas prospectivas que emplea el diseño racional de fármacos no están disponibles (Service, 2000). En consecuencia, la mayoría de las dianas farmacológicas conocidas son inexplorables a través de este paradigma experimental. Incluso para el 1 % de dianas explotables, se producen tasas de fallo tremendas debido a la falta de un algoritmo eficiente que pueda conducir a un compuesto de partida eficaz (Ladbury y Peters, 1994; Lahana, 1999). Para los métodos que se basan en los mecanismos de cribado tradicionales, los sistemas aún no son lógicos y requieren un desarrollo más racional en los algoritmos heurísticos. Se estima que solo 1 de cada 10.000 compuestos de partida se convierten en fármacos finales (Parril y col., 1999). De hecho, muchos de los fármacos más eficaces en el mercado hoy en día, incluyendo CAPTOPRIL (agente antihipertensivo), PREDNISONA (agente antibacteriano) y PRAZICUANTEL (agente antiparasitario), se han descubierto por pura casualidad (Kubinyi, 1999). El resultado de la ineficacia del diseño racional de fármacos es que solamente se producen entre 40 y 45 nuevos fármacos al año (Kubinyi, 1999). En consecuencia, un tercio del mundo no tiene medicación básica (Service, 2000). Claramente, existe la necesidad de un algoritmo mejor para reducir el fallo en la

fase de descubrimiento del compuesto de partida del desarrollo de inhibidores de proteasa.

El documento WO 00/63350 A1 desvela una cisteína proteinasa de la pared de un quiste de *Taenia*, inhibidores de la misma y composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula inhibidora que inhibe la actividad de una cisteína proteasa de la pared de un quiste y un portador farmacéuticamente aceptable. En particular, se describen inhibidores de fluorometilcetona potenciales que suprimen la actividad de una cisteína proteasa diana purificada a partir de *Taenia solium*.

El documento WO 00/09653A1 se refiere a métodos de identificación de inhibidores de catepsina K y métodos de diseño de inhibidores de catepsina K usando datos estructurales y físicos basados en la estructura cristalográfica de procatepsina K.

White y col., describen en el documento Am. Soc. of parasitologists 1996, vol. 82, N.º 2 en las páginas 7 a 10, inhibidores de proteasa generales contra la proteasa de *Taenia saginata* purificada.

White y col., se refieren, en el documento Mol. Biochem. Parasit. 1997, páginas 243 a 253, a la purificación y caracterización de cisteína proteasa a partir de quistes de *Taenia crassiceps*.

Barrett y col., desvelan, en el documento Biochem. J. 1982, páginas 189 a 198, E64, que es un inhibidor de enzimas disponible en el mercado. Específicamente, este inhibidor se describe en esta referencia como específico para cisteína proteasas. Algunos de los componentes clave descritos son la naturaleza del sitio activo de interacción entre E64 y el sitio activo de la enzima, métodos para determinar la molaridad de las enzimas, constantes de velocidad de inactivación para la inhibición de las varias enzimas conocidas y una comparación entre EP-475 y E64.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para identificar un inhibidor de enzima de corte peptídico que comprende:

- a. realizar un ensayo de sustrato de baja kcat poniendo en contacto cada uno de una pluralidad de sustratos con una enzima de corte peptídico diana para identificar al menos un sustrato peptídico de alta kcat y al menos un sustrato peptídico de baja kcat que es poco escindible por la enzima de corte peptídico diana, en el que el sustrato peptídico de baja kcat tiene una tasa de escindibilidad de menos del 35 % de la tasa de escindibilidad del sustrato más altamente escindido en el ensayo; y
- b. realizar un ensayo de unión competitiva al sitio activo de la enzima usando la enzima de corte peptídico diana, al menos un sustrato de alta kcat identificado en la etapa a. y al menos un sustrato de baja kcat identificado en la etapa a. e identificar de este modo al menos un sustrato de baja kcat que es un inhibidor de la unión al sitio activo, que inhibe la escisión del al menos un sustrato de alta kcat por la enzima de corte peptídico diana mediante unión al sitio activo de la enzima de corte peptídico diana, identificando de este modo un inhibidor de enzima de unión al sitio activo de baja kcat que comprende un núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico.

Preferentemente, el sustrato de baja kcat tiene una tasa de escindibilidad de menos del 20 % de la tasa de escindibilidad del sustrato más altamente escindido en el ensayo.

Además, se prefiere que el sustrato de baja kcat tenga una tasa de escindibilidad de menos del 10 % de la tasa de escindibilidad del sustrato más altamente escindido en el ensayo.

Preferentemente, el ensayo de unión competitiva al sitio activo de la enzima comprende la valoración de la unión del sustrato a la enzima empleando un método espectroscópico seleccionado entre el grupo que consiste en espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta-visual, espectroscopía fluorométrica, espectroscopía fosforométrica, espectroscopía de masas y espectroscopía de microondas.

Además, se prefiere que realizar el ensayo de sustrato de baja kcat comprenda valorar la kcat del sustancia para la enzima empleando un método espectroscópico seleccionado entre el grupo que consiste en espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta-visual, espectroscopía fluorométrica, espectroscopía fosforométrica, espectroscopía de masas y espectroscopía de microondas.

Preferentemente, el método comprendía además las etapas adicionales de seleccionar un análogo funcional y estructural del inhibidor de baja kcat y realizar un ensayo de inhibición usando la enzima de corte peptídico diana y al menos un análogo estructural del inhibidor de baja kcat para identificar al menos un inhibidor de baja kcat.

Además, se prefiere que el método comprenda además valorar la selectividad del inhibidor de baja kcat con respecto a enzimas de la misma clase que la enzima de corte peptídico diana con el fin de determinar si el inhibidor es selectivo para la enzima de corte peptídico diana.

Preferentemente, el método comprende además determinar condiciones óptimas de escisión del sustrato para la enzima de corte peptídico diana antes de poner en contacto la enzima de corte peptídico diana con la pluralidad de sustratos.

- 5 Además, se prefiere que el inhibidor de enzima de corte peptídico comprenda un núcleo de aminoácidos o un núcleo peptídico que contiene entre 1 y 9 residuos de aminoácidos.

Preferentemente, el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico contiene entre 1 y 6 residuos de aminoácidos.

- 10 Además, se prefiere que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico consista en 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos.

Preferentemente, el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende uno o más residuos del grupo que consiste en L-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos derivatizados y aminoácidos modificados.

- 15 Además, se prefiere que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico esté compuesto enteramente o en parte por análogos peptídicos seleccionados entre el grupo que consiste en: beta-aminoácidos, peptoides y aminoácidos en los que uno o más átomos han sido sustituidos por diferentes elementos atómicos o por grupos funcionales.

- 20 Preferentemente, el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende dos o más aminoácidos enlazados mediante un enlace diferente de un enlace peptídico.

Además, se prefiere que la enzima de corte peptídico diana se proporcione como una enzima purificada o en una mezcla en bruto.

- 25 Preferentemente, el método de la reivindicación 1, que comprende además antes de realizar el ensayo de unión al sitio activo de la enzima, determinar un intervalo de pH óptimo de aproximadamente 2 unidades de pH para la reacción de escisión.

- 30 Además, se prefiere que el método comprenda realizar un ensayo de unión competitiva en un número seleccionado de sustratos de baja kcat, en el que realizar el ensayo de unión competitiva comprende, para cada sustrato de baja kcat seleccionado:

- realizar un primer ensayo de unión competitiva usando la enzima de corte peptídico diana, una primera población de sustratos de alta kcat, y el sustrato de baja kcat seleccionado para identificar una pluralidad de inhibidores de baja kcat;
- para cada inhibidor de baja kcat, realizar un segundo ensayo de unión competitiva usando la enzima de corte peptídico diana, una segunda población de sustratos de alta kcat y el inhibidor de baja kcat, en el que la segunda población de sustratos de alta kcat incluye un mayor número de sustratos que la primera población de sustratos de alta kcat; y
- cuantificar el efecto inhibitorio de los inhibidores de baja kcat para dar una lista ordenada de inhibidores de baja kcat.

- 45 Preferentemente, un grupo de bloqueo está ubicado en un sitio seleccionado entre la siguiente combinación: el extremo C del núcleo peptídico; el extremo N del núcleo peptídico.

Además, se prefiere que la enzima se seleccione entre el grupo que consiste en: proteasas, proteína fosfatasa, esterasa, enzimas que escinden cadenas laterales basadas en sacáridos de proteínas, enzimas que escinden las lipoproteínas o proteínas funcionalizadas con lípidos y enzimas que escinden los cofactores de las proteínas.

- 50 Preferentemente, el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende uno o más residuos del grupo que consiste en L-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos derivatizados y aminoácidos modificados.

- 55 Además, se prefiere que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico esté compuesto enteramente o en parte por análogos peptídicos seleccionados entre el grupo que consiste en: beta-aminoácidos, peptoides y aminoácidos en los que uno o más átomos han sido sustituidos por diferentes elementos atómicos o por grupos funcionales.

Preferentemente, el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende dos o más aminoácidos enlazados mediante un enlace diferente de un enlace peptídico.

## 60 Breve descripción de los dibujos

- 65 Figura 1. Diagramas de energía libre para diversos perfiles y escenarios de catálisis enzimática; a partir de Murphy, 1995. *Biochemistry*. 34(14): 4507-4510: (a) Diagramas de energía libre para diferentes concentraciones de sustrato S en reacciones catalizadas y sin catalizar. Panel izquierdo: Perfil I.  $S < K_m$  de modo que la enzima esté en una configuración de unión "floja" con el sustrato. Panel derecho: Perfil II.  $S > K_m$  de modo que la enzima esté en una configuración de unión "fuerte" con el sustrato. La nomenclatura debajo de la figura indica la derivación de diversas

constantes de energía libre a las que se hace referencia en el texto. Dado que se sabe que la catálisis se produce para las enzimas similares al Perfil II, este gráfico demuestra cómo las interacciones de unión fuerte no tienen que ser ineficientes para la renovación del sustrato, siempre que se utilicen para la catálisis; (b) diagrama de energía libre para la catálisis impulsada por la estabilización del estado de transición para un escenario de Perfil II donde  $T_{SC}$  disminuye. En este escenario, el estado de transición disminuye de  $T_{SC1}$  a  $T_{SC2}$ , dando como resultado un aumento neto de  $\Delta G_B$  de la situación 1 a la situación 2. Por lo tanto, un aumento de  $\Delta\Delta G_B$  es el sello distintivo del efecto de estado de transición. Dado que  $\Delta G_{ES}$  no se modifica en este gráfico, el 100 % de la energía de unión adicional se utiliza para la catálisis. Esta propiedad y el aumento en  $\Delta\Delta G_B$  es la definición de un acontecimiento catalítico impulsado por la estabilización del estado de transición, siendo este último el parámetro catalítico definitorio; (c) diagrama de energía libre para catálisis impulsada por desestabilización del estado basal para un escenario de perfil II donde ES disminuye y  $T_{SC}$  no se modifica. Desde el panel izquierdo al panel derecho, ES disminuye, mientras TS permanece sin cambios. En consecuencia,  $\Delta\Delta G_B$  permanece constante aunque se observe catálisis (por lo tanto, la energía libre de unión de enzima/estado de transición no cambia). El  $\Delta\Delta G_B$  constante en el caso donde se ha producido catálisis, es el parámetro cinético definitorio para un acontecimiento de renovación del sustrato impulsado por catálisis; (d) diagrama de energía libre para un cambio de unión uniforme. Desde el panel izquierdo al panel derecho, ES y  $T_{SC}$  disminuyen en paralelo y la misma cantidad.  $\Delta\Delta G_B$  ha aumentado aunque no se ha observado catálisis. Por lo tanto, no existe diferencia neta entre los estados catalizado y sin catalizar. Este es el sello distintivo de un cambio de unión uniforme.

Figura 2. Nomenclatura estándar de residuos implicados en la unión enzima/sustrato: S, aminoácido en la enzima; P, aminoácido en el sustrato; el enlace cortable que es escindido está entre el sitio P1 y el sitio P1' en el sustrato.

Figura 3. Un esbozo esquemático de etapas seleccionadas del método de la invención para identificar inhibidores del sitio activo de una proteasa diana.

Figura 4. (a) Representación gráfica de un ensayo de sustrato que utiliza un panel de sustratos y cisteína proteasa de *Taenia solium* purificada (etapa II). El panel izquierdo representa la escisión de tripéptidos y dipéptidos enlazados a AFC por la enzima purificada. El panel derecho representa la escisión de monopéptidos individuales por la enzima purificada. Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. (b) Representación gráfica de un ensayo de sustrato utilizando un panel de sustratos con mezcla en bruto de *Taenia solium* (etapa II). El panel izquierdo representa la escisión de tripéptidos y dipéptidos enlazados a AFC por la mezcla en bruto. El panel derecho representa la escisión de monopéptidos por la mezcla en bruto. Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado.

Figura 5. Ensayo competitivo que mide el porcentaje de inhibición de la escisión de AFC de un cóctel con (a) cisteína proteasa de *Taenia solium* purificada y (b) mezcla en bruto de *Taenia solium* (etapa III). cóctel al 1,4 % = Z-FR-AFC, cóctel al 2,9 % = Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC, cóctel al 4,4 % = Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC + Z-AAK-AFC, cóctel al 5,9 % = Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC + Z-AAK-AFC + AP-AFC, cóctel al 7,4 % = Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC + Z-AAK-AFC + AP-AFC + Z-VLR-AFC.

Figura 6. Degradación de IgG de cadena pesada mediante cisteína proteasa purificada de *Taenia solium*. Se incubó IgG humana durante 18 horas con cisteína proteasa (CP) purificada de *T. solium*. Los tubos incubados se fraccionaron posteriormente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, se transfirieron sobre una membrana de PVDF y se visualizaron usando complejo de biotina-peroxidasa conjugada-estreptavidina biotinilado anti-IgG (cadena pesada/cadena ligera), y quimioluminiscencia potenciada. Las bandas representan cadenas pesadas. La ausencia de cadenas pesadas y ligeras (bandas de cadena ligera no mostradas) sugiere que las proteínas están descompuestas en péptidos.

Figura 7. Perfil de inhibición para (a) cisteína proteasa de *Taenia solium* purificada, y (b) mezcla en bruto de *Taenia solium*, usando inhibidores que emplean diversos reactantes inactivadores para las principales hipótesis del núcleo del vehículo. Cada valor es la media de ensayos realizados por triplicado. Iso7, 3,4-dicloroisometilcoumarina; iso8, 4-cloro-3-(4-f-bencil)oxiisocoumarina; iso9, 7-EtNHCONH-4-Cl-3-OMe-isocoumarina; iso10, 7-(M-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)CONH-4-Cl-3-OPr-isocoumarina.

Figura 8. (a) Muestra gráficamente el efecto del tratamiento con Z-LLY-FMK de ratones BALB/c provocados con quistes de *Taenia crassiceps*. A cada ratón tratado se le preinyectó por vía intraperitoneal inhibidor durante dos días. Durante la fase de tratamiento, cada ratón tratado recibió  $1,48 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de N2 diariamente durante tres semanas y cada dos días durante la última semana. Las inyecciones se llevaron a cabo en 150  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido para cada ratón. Tanto los grupos tratados como los controles positivos se provocaron por vía intraperitoneal con 10 quistes de *Taenia crassiceps* en 200  $\mu\text{l}$  de PBS 0,15 M en el momento de la infección inicial. Después de un mes de infección, ambos grupos fueron sacrificados y los quistes se extirparon lavando con PBS 0,15 M estéril. Un mínimo de dos quistes fijados se puntuaron como multilobulados (ML). Tras la inspección visual, ningún ratón mostró efectos de toxicidad por inhibidor. (b) Representa gráficamente el efecto del tratamiento con inhibidor de proteasa de ratones BALB/c provocados con quistes de *Taenia crassiceps* durante un periodo de larga duración. Los ratones se dividieron en grupos tratados y sin tratar (5 ratones/grupo). A cada ratón en el grupo tratado se le preinyectó por vía

intraperitoneal con inhibidor durante dos días. Posteriormente, todos los grupos fueron provocados con 10 quistes de *T. crassiceps* en 200  $\mu$ l de PBS 0,15 M. El tratamiento con inhibidor o placebo (PBS 0,15 M) se llevó a cabo cada día durante 30 días después de la provocación. Los quistes se dejaron en solitario (sin tratar) durante 5 meses, y a continuación se sacrificaron. Los quistes se contaron a continuación mediante inspección visual. El porcentaje de protección se basa en la reducción del número total de quistes en comparación con ratones de control, que nunca recibieron tratamiento alguno.

Figura 9. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de quistes extirpados de ratones sin tratar frente a quistes extirpados de ratones tratados. Los aumentos son idénticos para ambos portaobjetos en cada panel. Panel A (4000x). La MEB muestra una vigorosa respuesta inmunitaria del huésped en quistes tratados con LLY-FMK. No se observaron células inmunitarias en quistes extirpados de ratones sin tratar. Panel B (25.000x). Los resultados de MEB muestran fibroblastos, orificios en el tegumento, y microtriquias desprendidas en quistes de ratones tratados. Puede verse que las microtriquias en ratones tratados son visiblemente más largas. También se observaron anclajes visibles para el grupo de quistes sin tratar, mientras que estos anclajes no se observaron en microtriquias de quistes tratados.

Figura 10. Muestra gráficamente que la respuesta estimulada de esplenocitos de ratón a Con-A no resulta afectada en presencia de los inhibidores de proteasa Z-LLY-FMK y Z-LLL-FMK. El eje y indica proliferación celular en recuentos por minuto.

Figura 11. Muestra gráficamente el efecto de inhibidores después de 96 horas de incubación sobre esplenocitos de BALB/c según lo medido mediante la captación de Azul de Tripano.

## Descripción detallada de la invención

### PARTE I. TEORÍA

#### A. Modelos de catálisis enzimática

El método para el desarrollo de inhibidores de proteasas proporcionado por la invención se basa en una integración poco probable y novedosa de una serie de supuestos diferentes derivados de varias teorías dispares de catálisis enzimática. Algunas de nuestras principales suposiciones provienen del modelo de enzima "sitio dividido", formulado por Menger (1992) y más tarde avanzado por Murphy (1995), que predice que el sitio activo de una enzima está compuesto por centros de unión y reacción discretos e independientes. Este concepto se avanzó primero en 1950 con la propuesta de que la acetilcolinesterasa se caracteriza por un sitio de unión compuesto por un anión que se une al grupo de amonio cuaternario de la acetilcolina y un sitio reactivo específico de éster que causa el acontecimiento de hidrólisis de éster real (Bergmann y col., 1950). Aunque la teoría del sitio dividido es una idealización para describir los acontecimientos de la interacción enzima/sustrato (ES), proporciona un marco útil sobre el que se pueden diseñar inhibidores de proteasa. De esta manera, la teoría del "sitio dividido" es superior a la teoría popular conocida como la posición "fundamentalista" de la catálisis enzimática (Schowen 1978).

#### La posición "fundamentalista" de la catálisis enzimática

La posición "fundamentalista" de la catálisis enzimática postula que la descripción de Pauling (Pauling 1946, Pauling 1948) de la estabilización del estado de transición (TS) es el mecanismo primario para la catálisis enzimática. De hecho, la teoría del estado de transición existe desde hace casi 60 años y tiene sus raíces en la predicción precisa de las velocidades de reacción en fase gaseosa para las reacciones de diátomo-diátomo, así como las reacciones bimoleculares de átomo-diátomo, incluso cuando se incluyen correcciones de tunelización. (Kraut, 1988). Hay dos suposiciones importantes para la teoría del estado de transición. Primero, la descomposición del estado de transición controla la velocidad enzimática y segundo, el complejo de estado de transición está en equilibrio con los reactantes. La ecuación fundamental básica para la teoría del estado de transición es  $k = kvK$ , en la que  $k$  es la constante de velocidad observada en condiciones experimentales,  $k$  es el coeficiente de transmisión,  $v$  es la frecuencia de oscilación en modo normal del estado de transición en la coordenada de reacción y  $K$  es la constante de equilibrio para la formación del estado de transición a partir de los reactantes (Kreevoy y Truhlar, 1986).

Dos perfiles son relevantes para la estabilización del estado de transición (Menger 1992), y se hará referencia a ellos en todo el documento. En el primer perfil (perfil I-figura 1a), la concentración de sustrato (S) es menor que la  $K_m$  de la enzima (E) para el sustrato (S), de modo que la energía de unión aparente del complejo enzima/sustrato (ES) es menor (mayor  $K_m$ ) que la de E+S. Por lo tanto, la energía libre de ES es mayor que la energía libre de E+S. En el segundo perfil (perfil II-figura 2a), la concentración de sustrato (S) es mayor que la  $K_m$  de la enzima (E) para el sustrato (S) de modo que la energía de unión aparente de ES es mayor (menor  $K_m$ ), y la energía libre de ES es, por lo tanto, menor que el nivel de E+S.

Una suposición importante en ambos casos es que un complejo más compacto entre E y S conducirá a una menor energía libre de ES (el estado basal). Basándose en estos modelos, la posición "fundamentalista" (Schowen, 1978) sobre la catálisis es que la compacidad de un complejo ES no tendrá ningún efecto en un escenario de perfil I (dado

que ES siempre es mayor que E+S, no influye en la catálisis dado que  $\Delta G_{cat}$  no resulta influido) o que decelerará la catálisis en un escenario de perfil II, dado que la energía libre global para la catálisis aumenta ( $\Delta G_{cat}$  aumenta). Por lo tanto, la teoría fundamentalista predice que las interacciones de reactantes en estado basal son ineficientes (perfil I) y pueden, incluso, obstaculizar el acontecimiento catalítico (perfil II) en algunos casos. Sin embargo, hay un defecto clave en esta observación teórica (Murphy, 1995) dado que existen numerosos ejemplos de interacciones fuertes en estado basal entre ES que se sabe que son beneficiosas para la catálisis.

#### Modelo de sitio dividido

El modelo de "sitio dividido" de Menger (1995) es un avance respecto a la teoría fundamentalista clásica (Schowen, 1978). Ofrece una elegante propuesta que rectifica el defecto en la predicción incorrecta de que las interacciones fuertes en estado basal son ineficientes, y por lo tanto explica la paradoja en la teoría fundamentalista. El problema con la posición fundamentalista es que trata la unión y la reactividad entre ES como si tuviera lugar en un "centro" espacial. La esencia de la teoría de "sitio dividido" es, por el contrario, que las interacciones de estado basal (ES) y estado de transición (TS) pueden describirse como la suma de los energéticos que avanzan entre una región de unión discreta ( $ES_B$  y  $TS_B$ ) de la enzima así como una región *reactiva* discreta de la enzima ( $ES_R$  y  $TS_R$ ). En otras palabras, la enzima puede describirse como un "sitio dividido" en el que la energía libre de ES es igual a  $ES_B + ES_R$  y la energía libre de TS es igual a  $TS_B + TS_R$  (con B y R representando el centro de unión y el centro de reacción independientes, respectivamente). La energía de ES dicta  $K_m$ . La conversión de energía de unión en catálisis dicta  $k_{cat}$ . Cabe destacar que, como se usan en el presente documento, los términos "E+S", "ES", y "TS" pueden referirse a la entidad física de esas especies o la energía libre de esas especies en una coordenada de reacción, dependiendo del contexto.

Varias suposiciones sustentan el modelo de sitio dividido. En primer lugar, los energéticos en los centros  $ES_B$  en los niveles de estado basal y estado de transición son siempre estabilizantes y atractivos (por ejemplo, formación de puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e iónicas). En segundo lugar, los energéticos en el centro  $ES_R$  son siempre desestabilizantes (por ejemplo, debido a tareas energéticamente caras como desolvatación, tensión a partir de cambios conformacionales de la enzima para rodear al sustrato y cambios de tensión debidos a la "flexión del sustrato"). Los grupos catalíticos están ubicados en el centro de reacción. Dado que ninguna reacción tiene lugar entre los grupos catalíticos a nivel basal,  $ES_R$  solamente puede ser dominado mediante efectos desestabilizantes y un consecuente aumento de energía libre.  $ES_B$  está, como consecuencia, siempre a una energía menor que  $ES_R$ . En tercer lugar, las fuerzas estabilizantes en  $ES_B$  se conservan en  $TS_B$ . Esto no implica que la *intensidad* de las fuerzas estabilizantes sea la misma entre  $ES_B$  y  $TS_B$ . (De hecho, numerosos ejemplos en la técnica demuestran que las fuerzas en  $ES_B$  están reforzadas en  $TS_B$ ). Sin embargo, es el *origen* y el *destino* de las fuerzas que se originan en  $ES_B$  los que se conservan en  $TS_B$ . De hecho, diversos ejemplos de este tipo de conservación son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, tanto la cisteína (Kamphuis, 1984) como la serina proteasas (Polgar, 1988) emplean un orificio de oxianión. Esta estructura cumple una importante función de unión para el sustrato P1 carbonilo tanto en el estado basal en  $ES_B$  como en el estado de transición en  $TS_B$ . La cristalografía de rayos X ha demostrado que muchos de los contactos de unión importantes establecidos en el estado basal, de hecho, se comparten en el estado de transición en muchas enzimas. De hecho, los contactos en  $ES_B$  y  $TS_B$ , así como su conservación son de primordial importancia, dado que las características estructurales específicas que estos confieren pueden ser una fuente de explotación por parte de un inhibidor.

En otro ejemplo, una quiralidad única está presente en  $TS_B$  mediante la formación de un aducto tetraédrico que se forma como resultado de reacciones de desplazamiento en los átomos de carbono hibridados del sustrato  $sp^2$  (Wolfenden, 1999). Las interacciones de unión que son la base de esta quiralidad comienzan mediante contactos débiles formados en  $ES_B$ , pero no emanan de E+S o de los productos. Basándose en la descripción anterior, es notable que la geometría de los átomos del sustrato, mientras está complejado con la enzima (proporcionando estos átomos interacciones de unión), no es igual que la geometría del sustrato mientras está libre en solución. Por lo tanto, las interacciones de unión, así como su geometría consecuente, se crean en  $ES_B$  y posteriormente, se comparten (y se refuerzan) en  $TS_B$ . Por lo tanto, la importancia de la "unión" se manifiesta tanto en interacciones de unión así como en su geometría implícita - que definen ambas el concepto de "conservación" en  $ES_B$  y  $TS_B$  como se presenta en el presente documento. De hecho, son dichas características estructurales las que contribuyen a la capacidad de una enzima para discriminar entre un sustrato libre y una que está experimentando tensión para formar ES así como TS.

La importancia de estas observaciones es que un inhibidor potencial no solamente debe aprovechar las propias fuerzas de unión, sino también la *geometría* de los átomos que componen esas interacciones de unión en ES. Tal como se describe más adelante, creemos que un defecto clave en el paradigma tradicional que desarrollo de inhibidores es que no permite la explotación completa de estas interacciones de unión.

El corolario alternativo a las observaciones anteriores es que las interacciones desestabilizantes en  $ES_R$  no se conservan en  $TS_R$ . Por ejemplo, acontecimientos tales como la desolvatación en  $ES_R$  ya se produjeron antes de que

se alcanzara el estado de transición en  $TS_R$ . Dado esto, puesto que  $TS_R$  es la ubicación donde los grupos catalíticos realmente reaccionarán, se esperaría que  $TS_R$  se estabilice para un análogo de sustrato altamente escindible, con la disminución de su energía que conduce a la mejora de la velocidad catalítica. Se espera la consecuencia opuesta (inhibición) si  $TS_R$  se desestabiliza por una fuerza desestabilizante tal como un electrófilo en un inhibidor enzimático (véase la etapa VII para una descripción de dichos electrófilos). El punto principal aquí es que el acontecimiento catalítico real no se produce en el estado basal (por ejemplo, la tríada catalítica de cisteína y serina proteasas solo reacciona en  $TS_R$ , no  $ES_R$ ), y a menudo, un inhibidor del nivel de estado de transición ejercerá sus efectos contrarrestando la estabilización de  $TS_R$ .

10 La descripción anterior del modelo de sitio dividido de catálisis enzimática identifica el marco para el argumento de los inventores, presentado más adelante, que postula una debilidad significativa en el diseño tradicional de inhibidores de proteasa. Proporciona, además, una base para cómo el diseño de inhibidores de la presente invención supera esta problema.

15 *Principios relevantes adicionales de cinética enzimática*  
*Kcat, Km y Kcat/Km*

Dado que existen múltiples maneras de ver la catálisis enzimática, es importante revisar las suposiciones con respecto a los valores de  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $K_{cat}/K_m$ , ya que se aplican al marco definido de los inventores para la cinética.  $K_{cat}$ , una constante de velocidad de primer orden, se define como el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en productos por sitio activo de enzima por unidad de tiempo, o el número de veces que la enzima se convierte por unidad de tiempo. En el gráfico del estado de transición,  $k_{cat}$  es simplemente la diferencia entre los puntos más altos y más bajos en un diagrama de energía. Por lo tanto, en el caso de la cinética de perfil I (donde  $S < K_m$ ), es la diferencia entre las energías de  $E + S$  y  $TS$ , mientras que en la cinética de perfil II (donde  $S > K_m$ ), es la diferencia entre las energías de  $ES$  y  $TS$ .  $K_{cat}/k_m$  es la constante de velocidad aparente de segundo orden que se refiere a la concentración de enzima libre en lugar de total a bajas concentraciones de sustrato en la que  $K_m > S$  de modo que la velocidad de reacción,  $v$ , es igual a  $E * S * k_{cat}/K_m$ . Este resultado se mantiene a cualquier concentración de sustrato y es significativo, ya que se refiere a las propiedades de la reacción de enzima libre y sustrato libre. Además, el valor de  $k_{cat}/K_m$  no puede ser mayor que el control de difusión ( $10^8$ - $10^9$ ), que es normalmente característico de las enzimas "óptimamente evolucionadas" (Albery y Knowles, 1977). La velocidad catalítica se describe mediante una tercera constante que se refiere a los moles de producto producidos por mol de enzima/segundo. Tradicionalmente, se entiende que la maximización de  $k_{cat}/K_m$  es paralela a la maximización de la velocidad (Fersht, 1985).

35 Existen tres suposiciones principales para  $k_{cat}/K_m$  (Fersht, 1985):

1. *Valores altos de  $k_{cat}/K_m$  designan complementariedad de la enzima a un estado de transición*

40 Un  $k_{cat}/K_m$  alto es un reflejo de máxima *complementariedad* de la enzima hacia el estado de transición del sustrato. Se supone que este es el caso especialmente en situaciones donde la estabilización del estado de transición es el modo principal de catálisis enzimática. (En opinión de muchos, la desestabilización del estado basal tampoco debe ser ignorada como un mecanismo para la catálisis)

2.  *$k_{cat}/K_m$  es una constante de especificidad*

45 La segunda suposición es que  $k_{cat}/K_m$  es una constante de *especificidad*, de modo que un valor alto designa una alta especificidad hacia un sustrato dado. En este contexto, "especificidad" se refiere a la capacidad de una enzima para discriminar entre sustratos diferentes. Mientras que los sustratos grandes se pueden discriminar simplemente por su volumen estérico, la discriminación de sustratos más pequeños es una tarea más desafiante y está en función tanto de la unión ( $K_m$ ) como de la renovación ( $k_{cat}$ ). En pocas palabras, como se entiende en la técnica, ninguno de estos parámetros cinéticos, solo, será suficiente para una caracterización de la especificidad, pero su combinación sí lo será.

55 Con el fin de ser "específica", una enzima deba ser capaz de distinguir características estructurales en un sustrato que son únicas para su forma activada (por ejemplo, su estado de transición). Tradicionalmente, se ha entendido que un conjunto de sutiles diferencias estructurales colectivas entre el sustrato en su estado basal y el sustrato en su estado de transición son empleadas por la enzima como un mecanismo de distinción para especificidad. Se deduce que un inhibidor efectivo puede explotar potencialmente ese conjunto colectivo, pero cómo lo hace es completamente desconocido (Wolfenden, 1999). La ubicación de las diferencias estructurales puede estar en posiciones de sitios no activos así como aquellas que están cerca o en el sitio activo. Se sugiere, basándose en el modelo de sitio dividido, que las diferencias estructurales contribuyen colectivamente a la energía de unión en  $ES_B$  que se conserva y se refuerza en  $TS_B$ . En consecuencia, un inhibidor debe caracterizarse por la capacidad de explotar las fuerzas de unión que se conservan entre  $ES_B$  y  $TS_B$ . Sin embargo, dado que todo este "conjunto" de fuerza de unión está altamente conectado, se deduce que el acontecimiento de unión a enzima también está íntimamente relacionado con los acontecimientos de reactividad enzimática (a diferencia de lo que sugeriría el modelo de sitio dividido, como se describirá a continuación). Más adelante se describe cómo, en muchos casos, un



único residuo enzimático contribuirá tanto a la unión como a la reactividad, de modo que las funciones de unión y reactividad no están tan desconectadas como postula el modelo de sitio dividido.

5 Sin embargo, el punto principal aquí es que, debido a la naturaleza interconectada de este *conjunto* de interacciones (Ma y col., 2000) en los centros de unión y de reactividad es difícil aprovechar simultáneamente los acontecimientos de unión y reactividad. De hecho, es raro encontrar un inhibidor que sea capaz de prevenir exclusivamente la  
10 disminución del estado de transición (función de reactividad), sin alterar la energía de unión favorable de  $ES_B$  y  $TS_B$  (función de unión). Esta puede ser una razón por la cual históricamente ha sido difícil producir un inhibidor del estado de transición de alta calidad. Además, como se verá más adelante, se postula que la manera específica por la cual surge esta complejidad proviene de la adición de un "resto reactivo" al núcleo del péptido de unión fuerte (un procedimiento tradicional en la construcción de análogos de estado de transición).

### 3. Las enzimas óptimamente evolucionadas con altas velocidades se caracterizan por una alta $k_{cat}$ y una alta $K_m$

15 Una tercera suposición ha sido que la maximización de  $k_{cat}/K_m$  normalmente es paralela a la maximización de la velocidad enzimática. Aunque esto es normalmente la tendencia en la mayoría de las enzimas, no siempre es la regla. Por ejemplo, es más probable que las enzimas de control, como las de las rutas metabólicas, estén marcadas por una  $K_m$  baja, ya que esto permite que la enzima entre rápidamente en la ruta metabólica para poder controlar la  
20 velocidad de entrada y evitar que la ruta se sobrecargue con reactivos intermedios (Fersht, 1985). Sin embargo, para la mayoría de las enzimas, se entiende que para una enzima con un  $k_{cat}/K_m$  dado y un valor de sustrato constante dado, la enzima con los valores respectivos más altos de  $k_{cat}$  y  $K_m$  tendrá la velocidad más alta, mientras que lo contrario es cierto para la enzima con una  $k_{cat}$  baja y una  $K_m$  correspondientemente baja (Fersht, 1985).

25 Fersht (1985) articuló varios principios sobre la evolución de una enzima diana. Estos principios son completamente teóricos, pero proporcionan un marco útil sobre el que basar varias predicciones realizadas a continuación. En primer lugar, se supone que una enzima está evolucionando hacia maximización teleológica de su velocidad catalítica; es decir, la enzima primordial evoluciona hacia la obtención de la máxima complementariedad hacia el estado de transición del sustrato diana y por lo tanto, especificidad máxima hacia el sustrato diana. Con este fin, una  
30 alta  $k_{cat}/K_m$  de la enzima para el sustrato diana es la primera etapa. En este modo, Fersht (1985) argumenta que las enzimas comienzan con un escenario de tipo perfil II en el que  $K_m$  es baja ( $K_m < S$ ) y  $k_{cat}$  es baja para el parámetro  $k_{cat}/K_m$  dado. Usando las suposiciones del modelo de sitio dividido, se puede suponer que la reducción de  $ES_B$  es menor que el aumento de  $ES_R$ , lo que conduce a una  $K_m$  baja. En consecuencia, una  $ES_B$  baja conduce a una  $TS_B$  baja. Sin embargo, aunque  $TS_B$  es baja (como se predijo para la complementariedad máxima de la enzima para el estado de transición del sustrato), el valor de  $TS_R$  no es muy beneficioso para la catálisis, lo que conduce a una baja  
35  $k_{cat}$  de la enzima. Por lo tanto, en la enzima primordial, la conversión mediocre de la energía de unión intrínseca en  $ES$  es lo que causa la velocidad catalítica bastante baja. Fersht (1985) argumenta que esto puede deberse a la posibilidad de que una  $K_m$  baja cause un "pozo termodinámico" del cual la reacción debe "escalar", mientras que este no es el caso de una enzima con una  $K_m$  alta hacia un sustrato particular. En consecuencia, los principales puntos para una enzima primordial son que 1)  $K_m$  es más importante que  $k_{cat}$  y 2) que una enzima que está  
40 marcada por una  $k_{cat}$  baja y una  $K_m$  baja se encuentra posiblemente en un estado naciente de evolución.

En la segunda fase de evolución, la enzima evolucionará para aumentar su velocidad catalítica, mientras mantiene su relación  $k_{cat}/K_m$  para el sustrato diana. Por lo tanto, la enzima mantiene una especificidad constante para la enzima así como una complementariedad máxima para el estado de transición ( $k_{cat}/K_m$  constante), pero aumenta  
45 individualmente tanto  $K_m$  como  $k_{cat}$  de una manera que mantiene constante  $k_{cat}/K_m$ . Los medios por los cuales tanto  $k_{cat}$  como  $K_m$  aumentan pueden implicar diversos mecanismos.

Por ejemplo, si se van a emplear los principios del modelo de sitio dividido, la elevación de  $K_m$  se manifiesta a través de un aumento de la  $ES_R$ . Esto se basa en la suposición de que se esperaría que los contactos de  $ES_B$  se mantengan (y no aumenten) ya que son catalíticamente favorables y, por lo tanto, se conservan en  $TS_B$ . Por lo tanto,  
50 se postula que los contactos de  $ES_B$  y  $TS_B$  se mantienen durante la fase evolutiva, mientras que la elevación de  $ES_R$  es la modificación específica por la cual se eleva la  $K_m$ . Se conocen varios mecanismos en la técnica que se pueden emplear para elevar  $ES_R$ . Uno de estos se conoce como "tensión", un fenómeno que se refiere a la distorsión de un sustrato en el estado basal, de modo que se ajuste al máximo a la configuración del estado de transición. Aunque  
55 los principales contactos de unión ya están establecidos en el estado basal y se conservan en el estado de transición (se describen más adelante), se pueden emplear grupos químicos adicionales específicos en el sustrato para distorsionar aún más el sustrato, de modo que se moldee en su forma de estado de transición.

Un segundo mecanismo postulado para el aumento de  $ES_R$  es el famoso modelo de "ajuste inducido" (ejemplos en Fersht y col., 1988)). En este modelo, la enzima (a diferencia del sustrato) está siendo distorsionada en el centro de  
60 reacción (aumentando por lo tanto  $ES_R$ ) para que pueda ajustarse alrededor de un sustrato rígido. Los grupos químicos de la enzima se usan para proporcionar energía para esta distorsión. Numerosos ejemplos de ajuste inducido existen en la bibliografía que incluyen observaciones observadas en el primer estado de transición de la estructura cristalina alguna vez producida (en 1970), de la triosafosfato isomerasa. Estructuralmente, se descubrió  
65 que la enzima se contraía a lo largo de su eje principal cuando un inhibidor estaba obligado a producir el estado de transición, pero se expandía cuando el inhibidor se liberaba por diálisis (Johnson y Wolfenden, 1970). Esta

flexibilidad en la geometría de la enzima es apropiada, ya que hay varios estados de transición, y sería ventajoso para la unión que el bolsillo del sitio activo pudiera ajustarse como resultado de pequeños cambios en la hendidura catalítica).

5 Existen ventajas y desventajas en la teoría del ajuste inducido. Una desventaja es que el ajuste inducido se emplea para aumentar la  $K_m$  sin un aumento correspondiente de  $k_{cat}$  y, por lo tanto, Fersht (1985) argumenta que no es beneficioso para la catálisis. Además, el ajuste inducido se enfrenta a un enorme cuello de botella entrópico, dado que la enzima debe reducir la barrera entrópica para reducir la energía libre de activación. (Ma y col., 2000). Sin embargo, una ventaja potencial para el ajuste inducido es que la flexibilidad enzimática en los sitios activos permite la opción de que una enzima se una de forma flexible a una mezcla de estados de transición (Ma y col., 2000) en lugar de restringirse a la unión precisa de una única configuración de estado de transición. Esta es una ventaja significativa, especialmente si el estado de transición, como se ha descrito anteriormente, es en realidad el promedio de un conjunto en lugar de una única estructura. Por el contrario, dado que la "tensión" ayuda al aumentar los refuerzos positivos que aumentarán tanto  $k_{cat}$  como  $K_m$  y, por lo tanto, proporcionan mayores velocidades catalíticas, a menudo se considera la más importante de las dos fuerzas que elevan  $ES_R$  (Fersht, 1985).

Independientemente del mecanismo por el cual la  $K_m$  aumenta mediante un aumento de  $ES_R$ , el punto más importante en este caso se refiere a la conclusión hipotética de que una enzima óptimamente evolucionada pasa de su escenario cinético de perfil II primordial a un escenario cinético de perfil I ( $K_m > S$ ) a través de un escenario que también ha aumentado la tasa catalítica. Esta observación es importante porque el método de la invención se desarrolló usando la suposición de que la proteasa diana se encuentra en una fase avanzada de evolución, que sigue la cinética del perfil I, y por lo tanto tiene valores de  $K_m$  altos. Normalmente, los valores más altos de  $K_m$  están ahora en un intervalo de 1 a 10 veces  $S$ . (Kraut, 1988). Esta  $K_m$  más alta puede representarse como una distribución de Boltzmann de moléculas de sustrato que se produce antes de la etapa limitante de la velocidad del estado de transición, de modo que están bien pobladas debido a similitudes entre el estado de transición y el estado basal (Kraut, 1988).

Con el fin de mantener el valor de  $k_{cat}/K_m$  constante (y por lo tanto mantener la especificidad y complementariedad de la enzima hacia el estado de transición del sustrato), el aumento de  $K_m$  da como resultado un aumento equivalente de  $k_{cat}$ . Este aumento de  $k_{cat}$  en la enzima evolucionada se consigue posiblemente mediante la disminución de  $TS_R$  (en referencia a la  $TS_R$  de la enzima primordial). El mecanismo por el cual esto se produciría no se entiende bien y no se explorará en el presente documento. Con respecto a la catálisis, indicios significativos demuestran que la  $k_{cat}$  de la enzima evolucionada es más responsable de la potenciación de la velocidad que el valor de  $K_m$ .

Esta observación parece sugerir que se prefiere una unión débil entre E y S (como argumenta Fersht, 1985) para la velocidad catalítica máxima, disminuyendo de este modo la importancia de la unión entre E y S. Sin embargo, el principal punto postulado en este caso es que  *$K_m$  se eleva únicamente a través de la elevación de  $ES_R$*  (debido a la tensión, el ajuste inducido u otras fuerzas) y no  $ES_B$ . Una suposición importante de los inventores es contraria a la hipótesis de que  $ES$  y, por lo tanto,  $K_m$  son altos en una enzima óptimamente evolucionada:  *$ES_B$  y  $TS_B$  todavía cumplen una función principal como fuerzas estabilizantes*, incluso en una enzima óptimamente evolucionada donde  $k_{cat}$  es la variable importante para la catálisis. De hecho, esta observación es respaldada por varios investigadores en la técnica, que han demostrado que las interacciones de unión fuerte en el estado basal no son ineficientes para la catálisis (Murphy, 1995 y Menger, 1992). Esta observación será importante para el método en esta invención, dado que el método explota las interacciones de unión en  $ES_B$  y  $TS_B$ .

Para resumir esta sección: durante la evolución, la especificidad y complementariedad de la enzima al estado de transición del sustrato se maximizaron primero (a través de contactos de unión conservados en  $ES_B$  y  $TS_B$ ) y luego se mantuvieron, mientras que la velocidad catalítica se potenció mediante el mecanismo de elevación de  $ES_R$  (elevación de  $K_m$ ) a través de fuerzas de distorsión (tensión o ajuste inducido) que causan un aumento correspondiente de  $k_{cat}$  (de modo que  $k_{cat}/K_m$  permanece constante y "mantenido") que se convirtió en la variable cinética responsable de la catálisis. Sin embargo, el punto importante es que mientras que  $k_{cat}$  es más importante que  $K_m$  para la catálisis en la enzima óptimamente avanzada, las energías de unión intrínseca en  $ES_B$  y  $TS_B$  aún se conservan y son muy importantes para la conversión en energía catalítica. En el presente documento se propone que son estas energías óptimas las que debe explotar un inactivador de proteasa eficaz.

#### *Relevancia de suposiciones sobre $K_{cat}/K_m$ para el método de la invención*

El método de la presente invención, descrito en detalle a continuación, se basa inicialmente en las suposiciones descritas anteriormente: en primer lugar, las proteasas diana están en una fase de evolución avanzada de modo que, en segundo lugar, su catálisis es impulsada por  $k_{cat}$ , y por lo tanto en tercer lugar, existen sustratos de alta  $k_{cat}$  para sus sitios activos. Se postula que existen permutaciones óptimas de combinaciones de tripéptido, dipéptido o monopéptido para una enzima diana en sus sitios de unión S1-S3 (Berger y Schechter, 1970), que pueden estar sujetas a una alta renovación. En cuarto lugar,  $K_m$  puede no ser tan importante para su catálisis (de modo que las enzimas sean impulsadas por la cinética de perfil I), aunque la energía de unión intrínseca de  $K_m$  conferida por  $ES_B$  y  $TS_B$  es un componente muy importante de la maquinaria catalítica. Se deduce que existen permutaciones óptimas

de tripéptidos, dipéptidos y monopéptidos que conducen a la unión. En su realización más robusta, el método de la invención criba todas las posibilidades de combinaciones de aminoácidos en P3-P1 de un sustrato tripeptídico de la enzima diana (8.420 aminoácidos, incluyendo los dipéptidos y monopéptidos). Se cree que los tripéptidos son suficientemente largos, dado que se ha observado (Tsai y Jordan, 1993) a través de métodos de búsqueda de modo propio que el número de puntos de ensilladura del estado de transición de primer orden aumenta exponencialmente a medida que aumentan los grados de libertad del estado de transición (los grados de libertad aumentan a medida que aumenta el tamaño del agrupamiento). El uso de tripéptidos permite que la cinética siga siendo sencilla mientras se mantiene la predictibilidad del método lo más alta posible. Sin embargo, también pueden usarse péptidos más cortos o más largos.

#### *Suposiciones sobre el mecanismo de catálisis: efectos del estado de transición y efectos del estado basal*

Las suposiciones y teorías descritas hasta este punto pueden emplearse para explicar cómo es impulsada la catálisis enzimática. Como se señaló, diversas teorías, a veces de naturaleza totalmente contradictoria, abundan en el arte con respecto a este tema. Esta sección resalta cuáles de esas suposiciones se han adoptado y cuáles son impugnadas y potencialmente sustituidas por el nuevo sistema de los inventores.

El dogma primario en enzimología es que la estabilización del estado de transición o la desestabilización del estado basal o una combinación de ambas se emplean para impulsar la catálisis enzimática. Con respecto a un efecto del estado de transición (figura 1b), se revisan los dos escenarios más importantes entre varios posibles.

En el primer escenario,  $\Delta G_{ES}$  (y por lo tanto  $K_m$ , y la energía de unión de ES aparente) es constante en la reacción enzimática. A pesar de la  $K_m$  constante, interacciones de unión fuerte se producen entre ES. Como se recordará, dado que  $ES_R$  debe ser desestabilizante,  $ES_B$  debe ser igualmente estabilizante para explicar una  $K_m$  constante. Una importante observación en este contexto es que  $ES_B$  se puede seguir reduciendo incluso cuando  $K_m$  es constante. Además, dado que  $\Delta G_{ES}$  permanece sin cambios, toda la energía que se ahorra en la interacción de unión a partir de ES se convierte completamente en energía catalítica. La observación más importante en este contexto es el mecanismo mediante el cual esto se produce: dado que la reducción de  $ES_B$  se conserva en  $TS_B$  (como se ha descrito anteriormente mediante la suposición de que las interacciones de unión y la geometría se conservan y se refuerzan en  $TS_B$ ), la energía neta de TS también se reduce. Esta reducción de  $TS_B$  es la primera contribución principal a la catálisis.

La segunda contribución principal a la catálisis se deriva de la reacción a través de los centros catalíticos de la enzima, que reducen  $TS_R$  y, por lo tanto, contribuyen a una reducción de TS. Como corolario de esto, es importante recordar que el aumento de  $ES_R$  no se traduce en un aumento de  $TS_R$ , dado que los energéticos de los centros de reacción en el estado basal no se conservan en el estado de transición. El resultado neto de estas reacciones es que el estado de transición catalizado (TS) se reduce en comparación con el estado de transición sin catalizar ( $TS_U$ ), lo que da como resultado una energía de activación menor que equivale a un aumento general de  $-\Delta G_{cat}$  ( $k_{cat}/K_m$  aumentada). Como se ha supuesto en descripciones anteriores, la variable  $k_{cat}/K_m$  es predictiva de una potenciación de la velocidad catalítica.

En consecuencia, un aumento de  $\Delta G_b$  (la energía libre de unión de la enzima al estado de transición) es postulado por Murphy (1995) que es el parámetro definitorio para la identificación de un efecto de la estabilización del estado de transición (figura 1b). La conclusión más importante a partir de este primer escenario de estabilización del estado de transición es que reconcilia la paradoja y primer defecto principal en la teoría "fundamentalista" en cuanto a cómo interacciones en estado basal no son ineficientes, y demuestra cómo participan realmente en acelerar la catálisis. *Por lo tanto, se hace hincapié de nuevo en que las interacciones de unión en  $ES_B$  y  $TS_B$  son muy importantes para la catálisis y que un inhibidor eficaz debe explotar al máximo estas fuerzas.*

Un segundo escenario para el efecto del estado de transición destaca especialmente cómo los fuertes efectos del estado basal ayudan a la catálisis en lugar de obstaculizarla. En este contexto, a pesar de la reducción de ES total ( $K_m$  baja) debido a la unión fuerte entre ES ( $ES_B$ , por lo tanto, se redujo más de lo que se elevó  $ES_R$ ), la velocidad catalítica aún aumenta. De nuevo, esta situación explica cómo las interacciones en estado basal pueden ser realmente beneficiosas para la catálisis, contrariamente a la teoría fundamentalista. De nuevo, la razón para la aceleración de la velocidad es que  $ES_B$  se conserva en  $TS_B$ . Excluyendo cualquier reducción de  $TS_R$ , el resultado neto es que TS se reduce más de lo que se reduce ES, lo que da como resultado un aumento de  $\Delta G_b$  y un aumento consecuente de la velocidad enzimática.

Por lo tanto, también se postula que algunas enzimas son también impulsadas por un efecto de la desestabilización del estado basal que opera independientemente, o junto con (Albery y Knowles, 1977); Jencks, 1987) la estabilización del estado de transición. Un ejemplo de este efecto donde la desestabilización del estado basal actúa independientemente (figura 1c) es el caso donde  $\Delta G_{ES}$  aumenta (y, por lo tanto,  $K_m$  aumenta, y la energía de unión de ES aparente disminuye) debido a un aumento de  $ES_R$  mientras  $ES_B$  es constante. En consecuencia,  $TS_B$  es constante debido a la conservación en  $ES_B$ .  $TS_R$  también es constante, lo que da como resultado ningún cambio neto de la energía de TS (que permanece constante). A pesar del hecho de que TS no se ha reducido, aún ha

habido una disminución de la energía de activación requerida para alcanzar el estado de transición que equivale a un aumento global de  $-\Delta G_{cat}$  y una velocidad aumentada (según lo predicho mediante  $k_{cat}/K_m$ ). En este caso, la demostración de un  $\Delta G_b$  constante con velocidad catalítica aumentada, es la definición (Murphy, 1995) de un acontecimiento catalítico impulsado por el estado basal. El fondo en este contexto es que, contrariamente a la noción fundamentalista de que la estabilización del estado de transición sirve como el único mecanismo catalítico para potenciación de la velocidad, el efecto de la desestabilización del estado basal proporciona una estrategia alternativa y viable para catálisis.

Ahora se hará una nota acerca de la preferencia por  $K_m$  en cualquiera de los escenarios anteriores. Esencialmente, una  $K_m$  alta se traducirá en un  $ES$  alto, lo que reducirá la energía de activación en el modo de desestabilización del estado basal, ya sea la estabilización del estado de transición inoperante, operativa independientemente de la desestabilización del estado basal u operativa junto con la desestabilización del estado basal. De nuevo, este paradigma es coherente con el presentado anteriormente para las enzimas óptimamente evolucionadas. Para revisar, para estas enzimas,  $ES_B$  (y  $TS_B$ ) deben ser bajas, mientras que  $ES_R$  debe elevarse de manera que  $ES$  y  $K_m$  sean altas.  $k_{cat}$  impulsa la catálisis. Se concluyó que un inhibidor que disminuye  $K_m$  a través del escenario de aprovechamiento de contactos de unión en  $ES_B$  y  $TS_B$ , pero con la capacidad adicional de reducir  $ES_R$ , proporciona el potencial de contrarrestar la potenciación de la velocidad *en ambos casos donde un efecto de la estabilización del estado de transición impulsa la catálisis o donde un efecto de la desestabilización del estado basal impulsa la catálisis*.

Finalmente, el efecto neutro de la "unión uniforme" (figura 1d) merece una breve mención. En este caso, la reducción de  $TS$  es paralela al mismo cambio de  $\Delta G_c$ , un escenario que da como resultado ninguna catálisis neta. En este caso,  $ES_B$  disminuye a  $ES_R$  constante, lo que da como resultado una disminución igual de  $TS_B$  que hace que tanto  $ES$  como  $TS_C$  disminuyan el mismo valor. Se aplica el mismo escenario donde  $ES_B$  aumenta a  $ES_R$  constante. En consecuencia, nada de la energía de unión intrínseca se convierte en catálisis y no hay ningún cambio del  $\Delta G_{cat}$  y, por lo tanto, ningún cambio en la velocidad. Por lo tanto, un cambio neto de cero en  $\Delta G_b$  es la definición de unión uniforme (Murphy, 1995).

En resumen, las enzimas pueden seguir una ruta donde no hay ningún cambio neto en la catálisis a través de medios tales como la unión uniforme, o pueden catalizarse a través efectos de la estabilización del estado de transición o de la desestabilización del estado basal. Estos mecanismos subrayan la naturaleza enormemente complicada de la cinética enzimática ya que la renovación de sustrato puede avanzar a través de diferentes rutas mecanicistas tal vez como una variación o como una combinación de los mecanismos descritos anteriormente. La ruta que realmente se sigue depende de la enzima específica. El conocimiento de estas posibilidades es relevante para el diseño personalizado de un inhibidor de proteasa que debe trabajar para contrarrestar mecánicamente algunas o todas las vías posibles que son favorables para la catálisis. En consecuencia, las suposiciones proporcionadas para desestabilización del estado basal y estabilización del estado de transición se emplearán con el fin de proporcionar una base para la predicción de fenómenos cinéticos que resultan del método de identificación de inhibidores de proteasa de la invención.

#### *La coordenada de reacción*

Basándose en las suposiciones descritas anteriormente, a continuación se describirá la coordenada de reacción para catálisis. Este análisis se aplica en situaciones en las que la estabilización del estado de transición es el principal mecanismo que impulsa la catálisis. La desestabilización del estado basal será tratada en una descripción posterior.

El mecanismo catalítico comienza con el acontecimiento de unión entre enzima y sustrato para formar el complejo de Michaelis ( $ES$ ). Se supone que la unión enzima/sustrato da como resultado una  $ES_B$  reducida. Dos posibilidades son que  $ES$  puede permanecer igual, de modo que  $K_m$  sea constante ( $ES_B$  disminuye tanto como  $ES_R$  aumenta, lo que equivale a una  $K_m$  constante, lo que requiere que  $k_{cat}$  sea alta) o puede reducirse de modo que  $K_m$  se reduzca ( $ES_B$  disminuye más de lo que  $ES_R$  aumenta). En ambos casos, se argumenta *que es esencial que  $ES_B$  se reduzca para garantizar una unión fuerte entre enzima y sustrato para que este complejo pueda avanzar a un estado de transición preliminar y, eventualmente, a un estado de transición de etapa que determina la velocidad*. Durante este proceso, mediante el cual los grupos de reacción iniciales establecen sus asociaciones preliminares, existe una pérdida de entropía significativa debido a una reducción de los grados de libertad.

El segundo acontecimiento principal en la catálisis es la formación postulada del estado de transición.  $TS_B$  es baja (debido a la conservación de las energías de unión en  $ES_B$ ). Esto causa que o es concomitante con que  $TS_R$  se reduzca debido al acontecimiento catalítico favorable que resulta de la posterior interacción de residuos catalíticos. En consecuencia,  $TS$  se reduce. Si  $TS$  se estabiliza más de lo que se estabiliza  $ES$  en el estado basal,  $\Delta G_b$  aumenta, lo que significa que la enzima está empleando estabilización del estado de transición para avanzar catalíticamente con el sustrato diana de alta  $k_{cat}/K_m$  (figura 1). Una conclusión que se puede sacar es que la enzima utiliza energía de unión específica proveniente de la formación de  $ES$  con el fin de superar la tensión y la pérdida de entropía, que se produce debido a la elevación de  $ES_R$  (Jencks, 1987).

Para poner énfasis en que la unión entre enzima y sustrato es necesaria para una catálisis exitosa, se reitera que la  $ES_B$  siempre se reduce, ocasione esto o no la reducción de  $K_m$ . Existen dos razones clave para esto: 1)  $ES_B$  reducida es el primer acontecimiento que hará que  $ES$  avance hacia el estado de transición, lo que se requiere si debe producirse estabilización del estado de transición en absoluto y 2) es necesario que la unión fuerte en  $ES_B$  continúe, si no se mejora en  $TS_B$ , de modo que los residuos catalíticos puedan reaccionar posteriormente y causar la reducción de  $TS_R$  y eventualmente  $TS$  en una cantidad mayor que la reducción total de  $ES$ . *A continuación se postula que el mantenimiento de la calidad de la variable  $ES_B$  reducida (y, por lo tanto, los contactos de unión favorables en  $TS_B$ ) en una de las limitaciones clave del modelo tradicional de descubrimiento de inhibidores de proteasa.* Esta argumento se desarrollará en una sección posterior, pero comenzando con una visión de conjunto del modelo tradicional de cribado de inhibidores de proteasa.

#### *Diseño tradicional de un análogo del estado de transición*

Un "análogo del estado de transición" es una molécula que "se parece" al estado de transición del sustrato, de modo que la enzima se unirá a ella con una afinidad que es significativamente mayor que su afinidad por el sustrato libre. La ecuación de Kurz describe la eficacia de unión de un análogo del estado de transición:  $k_e/k_u = K_S/K_T$  mientras que  $k_e$  es la constante de velocidad para la reacción catalizada;  $k_u$  es la constante de velocidad para la reacción sin catalizar;  $K_S$  es la constante de disociación del sustrato;  $K_T$  es la constante de disociación del estado de transición. Por lo tanto, si se observa una velocidad de  $10^{12}$  para catálisis enzimática, se deduce que la enzima se une al análogo del estado de transición con una afinidad que es  $10^{12}$  veces mayor que la afinidad con la cual la enzima se une al sustrato en estado basal. (Es importante observar que las predicciones de la ecuación de Kurz se desvían para enzimas que también emplean desestabilización del estado basal como una estrategia para potenciación de la velocidad).

Un método tradicional y común de diseño de análogos del estado de transición es fijar una molécula reactante a un análogo de sustrato natural que imita el estado de transición de la enzima. En consecuencia, la unión del análogo del estado de transición hará al sitio activo "bloqueado" y, en consecuencia, incapaz de avanzar hacia abajo en la "colina energética" hasta la creación de productos. En este método, un análogo con una alta especificidad ( $k_{cat}/K_m$  alta) por la enzima diana se identifica en primer lugar. Existen varios excelentes métodos de alto rendimiento (por ejemplo, chip génico) que identifican secuencias peptídicas del sustrato tales que conduzcan a una alta renovación por la enzima diana. A continuación, un resto reactivo se fija al núcleo peptídico de  $k_{cat}/K_m$  alta con el fin de producir un inhibidor candidato final, lo que supuestamente aumentará la  $TS_R$  (basándose en las suposiciones que se han perfilado anteriormente). Como resultado, los acontecimientos de unión favorables que reducen  $TS_B$  no son suficientemente grandes para contrarrestar el aumento de  $TS_R$  y por lo tanto,  $TS_1$  (estado de transición con inhibidor) permanece sin cambios o aumenta. El resultado neto es que  $\Delta G_b$  no aumenta y no hay potenciación de la velocidad.

Son posibles varios escenarios cinéticos que pueden justificar una falta de potenciación de la velocidad. 1) Aunque la disminución de  $TS_B$  es mayor que el aumento de  $TS_R$ , esto no es suficiente para hacer que el  $TS_1$  neto (estado de transición con inhibidor) se reduzca lo suficiente con respecto a la reducción de  $ES$ , de modo que se produzca un aumento de  $\Delta G_b$ . 2)  $TS_R$  aumenta en la misma cantidad que se reduce  $TS_B$  de modo que  $TS_1$  permanezca al mismo nivel que  $TS_U$  (estado de transición, sin catalizar) y de nuevo,  $\Delta G_b$  no aumenta. 3)  $TS_R$  aumenta más de lo que se reduce  $TS_B$  de modo que  $TS_1$  es mayor que  $TS_U$  y  $\Delta G_b$  se vuelve positivo. Se postula que la falta de potenciación de la velocidad observada para análogos del estado de transición diseñados convencionalmente se produce cuando cualquiera de las siguientes suposiciones para inhibición se cumple:

1.  $TS_1$  no se reduce nunca bastante para que  $\Delta G_b$  pueda aumentar, de modo que el efecto común de la estabilización del estado de transición, de hecho, se elimina.
2.  $TS_R$  aumenta siempre con el fin de contrarrestar la reducción de  $TS_B$ .
3.  $ES_B$  disminuye siempre de modo que  $ES$  pueda unirse y aproximarse a un estado de transición (donde se producirá la inhibición)

Se propone que cualquier estrategia para el desarrollo de inhibidores de proteasa debe cumplir estos criterios.

#### *Introducción al desarrollo teórico del método de la invención*

Como se ha destacado anteriormente, el modelo de "sitio dividido" representa un avance respecto a la "posición fundamentalista". Este modelo predice con éxito la catálisis impulsada por estabilización del estado de transición (e impulsada por desestabilización del estado basal). En una marcada divergencia respecto a métodos convencionales de diseño de inhibidores, la presente invención emplea el modelo de "sitio dividido" como punto de partida para generar inhibidores candidato.

Como una base teórica para el diseño de inhibidores, el modelo de "sitio dividido" presenta varias ventajas. Los centros de unión y de reacción discretos e independientes del modelo permiten una cinética y cálculos simplificados. Curiosamente, la sencillez del modelo se correlaciona con mejores predicciones cinéticas y permite el descubrimiento de un inhibidor exitoso de una manera eficaz y diligente.

Es la visión de los inventores que el modelo tradicional de desarrollo de inhibidores fracasa porque no emula el modelo de "sitio dividido". Desafortunadamente, sin embargo, el modelo de "sitio dividido" no puede utilizarse sin modificación debido a un problema principal: es una simplificación excesiva de la catálisis enzimática. En realidad, los centro de unión y de reactividad no están tan desconectados como el modelo presupone (a continuación se ofrecen indicios). Se ha concebido una manera de superar este obstáculo y mostrar que es posible experimentalmente diseñar un método de identificación de inhibidores de enzima de corte peptídico en el que las suposiciones del modelo de sitio dividido son, no obstante, sostenidas lo más estrechamente posible. De forma significativa, el método de la invención impulsa *experimentalmente* el proceso de diseño o identificación de inhibidores hacia compuestos inhibidores que demuestran unión fuerte a la enzima diana así como especificidad aparente para una configuración particular de la enzima que está asociada con la catálisis, en función de los *principios teóricos* básicos del modelo de sitio dividido. El novedoso método de los inventores de diseño e identificación de inhibidores "rectifica" de este modo el principal defecto del método tradicional para el diseño de inhibidores redefiniendo metodologías cinéticas experimentales. Dado que el método de la invención utiliza las suposiciones del modelo de sitio dividido, conduce más eficazmente al desenlace deseado de inactivadores altamente específicos y potentes de enzima de corte peptídico.

Los fundamentos teóricos de la presente invención se describen adicionalmente investigando las siguientes preguntas: (1) ¿dónde está el defecto en el modelo de sitio dividido?; (2) ¿cómo es el método convencional para el desarrollo de inhibidores de estado de transición propenso a este defecto y, por lo tanto, está obstaculizado?; y (3) ¿cómo el nuevo método de los inventores rectifica el defecto en el método de diseño tradicional y, al hacerlo, tiene una mayor probabilidad de un "acierto" con un inhibidor exitoso?

#### Defecto en el modelo de sitio dividido

En opinión de los inventores, los centros de unión y de reacción de ES y TS no están tan desconectados como afirma la teoría. Para ilustrar, se considerará la catálisis por la cisteína proteasa papaína. El sitio activo de cisteína proteasa "orificio de oxianión" está implicado en el embolsamiento del grupo carbonilo del grupo P1 del sustrato (Kamphuis y col., 1984). Está compuesto por puentes de hidrógeno aportados a partir de la cadena principal del residuo cisteína del sitio activo (Cys25) y la cadena lateral de Gln19. Conjuntamente, estos enlaces permiten las importantes interacciones de unión que reducen  $ES_B$  y también se conservan en la  $TS_B$  (justamente como el modelo de sitio dividido predeciría). Sin embargo, la unión en  $TS_B$  y  $ES_B$  no es la única función conferida por estos residuos del centro de unión, como el modelo de sitio dividido predeciría.

Por el contrario, ambos residuos también contribuyen al centro de reacción de  $TS_R$ . El mismo residuo de cisteína que está implicado en unir formando puentes de hidrógeno el oxígeno del oxígeno P1 con el fin de embolsarlo tanto en el complejo de Michaelis como en el estado de transición (por ejemplo, reducir  $ES_B$  y  $TS_B$ ), también está implicado en el ataque nucleófilo al mismo grupo carbonilo P1 a través de su residuo de tiolato cargado (acilación). Este último acontecimiento permite la producción de un aducto tetraédrico, que es seguida por la pérdida del grupo saliente amina del sustrato, causando en consecuencia una reducción de  $TS_R$ . En muchas cisteína proteasas, esta secuencia de acontecimientos *define* la etapa de determinación de la velocidad.

La contribución de estos mismos residuos "de unión" al centro de "reactividad" es soportada, por ejemplo, por la observación de que los mismos puentes de hidrógeno de Cys25 y Gln19 que forman la base de la estabilización de  $ES_B$  en el estado basal también están implicados en estabilización de tipo catálisis de ácido de la carga negativa en el oxianión que se forma como resultado del ataque nucleófilo (un acontecimiento que también reduce directamente la  $TS_R$ ). En consecuencia, la estabilización de  $ES_B$  va de la mano con la estabilización de  $TS_R$  a través del medio de un único residuo, en este aspecto particular de un mecanismo de cisteína proteasa.

Otro caso donde el centro de unión y el centro de reacción en una cisteína proteasa no están tan espacialmente separados como predeciría el modelo de sitio dividido se ilustra mediante las acciones del residuo Asp158 en papaína. Asp158 no solo funciona como puente de hidrógeno con el nitrógeno de la posición S1 'del sustrato, reduciendo de este modo la  $ES_B$ , sino que también se describe que funciona en el papel de orientar la tríada catalítica de las cisteína proteasas para el ataque bioquímico en el centro de reacción, un acontecimiento que estaría implicado en la reducción de  $TS_R$  (Wang y col., 1994). Estos ejemplos sirven para demostrar cómo una parte del conjunto que define el centro de unión y el centro de reacción del sitio activo de la enzima se puede ubicar dentro del mismo residuo. Por lo tanto, la principal conclusión en este contexto es que *el centro de unión y los centros de reacción están, de hecho, íntimamente conectados y su separación por la teoría del sitio dividido es totalmente una simplificación excesiva del sitio activo de la enzima.*

#### 60 *Crítica del método tradicional*

El método tradicional para el diseño de inhibidores no consigue emular el modelo de "sitio dividido", presentando de este modo varios problemas.

#### 65 *Problema uno: interferencia del resto reactivo con las interacciones de unión del núcleo peptídico*

En primer lugar, el método tradicional emplea un núcleo peptídico de  $k_{cat}/K_m$  alta que no solamente estará implicado en la unión (reduciendo  $ES_B$ ) sino también en la estabilización catalíticamente favorable del estado de transición (reducción de  $TS_R$ ). Cuando un resto inhibitor reactivo se fija posteriormente en dicha proximidad cercana a este núcleo peptídico de  $k_{cat}/K_m$  alta, introduce la complicación desfavorable de interferir potencialmente de forma negativa en la unión favorable que ya está presente en el núcleo peptídico del sistema en  $ES_B$  y  $TS_B$  como se ha demostrado anteriormente. Para ser específicos usando las suposiciones anteriores de los inventores: mientras que el resto reactivo se fija con la expectativa de aumentar solamente  $TS_R$  (segunda suposición sobre inhibidores, anteriormente) independientemente sin influir en la unión de la molécula, su cercana proximidad al núcleo de unión también puede interferir *de forma concomitante* y *de forma involuntaria* en el acontecimiento de reducción de  $ES_B$  (tercera suposición sobre inhibidores). El mecanismo mediante el cual esto se produce es mediante interferencia directa con residuos que participan tanto en la unión (de  $ES_B/TS_B$ ) como en la reactividad (de  $TS_R$ ). Tal como se ha argumentado anteriormente, la proporción de unión de la molécula peptídica no está "fijada" independientemente del centro de reacción basándose en el argumento de los inventores del defecto con modelos "de sitio dividido", y por lo tanto el potencial para interferencia de unión es bastante alto. Por ejemplo, se empleará el ejemplo de un resto reactante de fluorometilcetona que se fija a la Arg de un análogo de sustrato de  $k_{cat}/K_m$  alta reactivo como Z-Arg para una serina proteasa como tripsina (Z-Arg es el análogo natural para tripsina). En este caso, la Arg se une muy fuertemente en P1, y por lo tanto desempeña un papel clave en la unión (es decir, en  $ES_B$  y  $TS_B$ ). Además de esta función, Arg también activa la proteasa para catálisis y es, por lo tanto, también parte del centro de reacción para tripsina ( $TS_R$ ). En virtud de la proximidad de la fluorometilcetona a Arg, es probable que esta pueda interferir en la función de unión conferida por Arg. La conclusión neta es que es importante que el resto reactivo no deba interferir con los contactos de unión favorables en  $ES_B$  y  $TS_B$ , que son críticos para los fines de unión al inhibidor.

Nótese que la interferencia del resto reactivo con contactos de unión favorables del núcleo peptídico de  $k_{cat}/K_m$  alta desarrollado a partir del modelo de diseño de inhibidores de proteasa tradicional, a su vez, tiene un "efecto de bola de nieve" sobre todas las interacciones de unión interconectadas en  $ES_B$  y  $TS_B$ . Como se ha descrito anteriormente, la unión y la reactividad están conectadas por un conjunto de interacciones complejas. Para ilustrarlo, se puede considerar el indicio suficiente de que las interacciones de unión individuales en TS son cooperativas, aditivas y sinérgicas, mientras que una pequeña perturbación de estas interacciones puede ser catastrófica para la unión de toda la molécula.

Se postula que los potenciales "enlaces" energéticos entre las funcionalidades reactivas del resto reactivo y las funcionalidades de unión del núcleo peptídico aumentarán exponencialmente los grados de libertad de las interacciones de unión que se producen en el sitio activo (y también complicarán la cinética de la reacción mediante una variable enorme). Este nivel de interferencia se correlacionará directamente con los grados de libertad que han sido aumentados por la interacción. Este número puede ser enorme, especialmente en un caso donde el resto reactivo puede estar interactuando con  $ES_B$  o  $TS_B$  de manera ilimitada. Por ejemplo, el estado de transición, que extrae muchas de sus propiedades de  $TS_B$ , es altamente "difuso" y está más interconectado con otras características de ES que lo que predeciría el modelo de "sitio dividido". El estado de transición no es un único "punto de ensilladura" bien definido (Baldwin y Rose, 1999) en la potencial superficie de energía. Aunque esta descripción simplificada en exceso de un punto de ensilladura puede explicar reacciones moleculares en la fase gaseosa, no basta para una descripción del estado de transición en un medio acuoso.

Ma y col (2000) argumentan que el estado de transición puede ser, en realidad, una superficie compuesta por múltiples conformaciones activadas (conjuntos homogéneos o heterogéneos con la misma estructura promediada vibracional), que es a la que la enzima se unirá realmente. Los métodos de búsqueda de modo propio han mostrado que el número de puntos de ensilladura de primer orden aumentará exponencialmente a medida que el tamaño del agrupamiento aumenta (Tsai y Jordan, 1993). Por lo tanto, esta información implica que el sistema tiene el potencial de volverse mucho más complicado si un resto reactivo también está interactuando con el centro de unión de  $TS_B$ .

En consecuencia, el objetivo de un algoritmo de diseño de inhibidores debe ser simplificar el modelo de inhibidor/enzima de modo que tenga los menores grados de libertad posibles y, en consecuencia, la mayor predictibilidad cinética. Esto puede conseguirse potencialmente mediante un esfuerzo general doble: 1) minimización del número de puntos de ensilladura en la superficie empleando el menor número posible de grados de libertad, y 2) simplificación experimental, de la manera más eficiente posible, de la naturaleza difusa del estado de transición para que pueda aproximarse (lo más cerca posible) a las suposiciones del modelo de sitio dividido de un centro de unión y reacción *independiente*.

*Problema dos: el núcleo peptídico es catalítico, y contrario a la inhibición por el resto reactivo*

Un segundo problema significativo con el método tradicional es que un núcleo peptídico de  $k_{cat}/K_m$  alta, que está fijado a un resto inhibitor reactivo, también se caracteriza por propiedades que son, por sí mismas, propicias para la renovación catalítica y, por lo tanto, contrarias a la inhibición enzimática; es decir, un núcleo peptídico que codifica esencialmente la escisión por una proteasa particular puede predisponer físicamente a la enzima hacia la escisión en un grado que no puede mitigarse por completo mediante un resto inhibitor reactivo. Dado que el núcleo peptídico es parte de una molécula de  $k_{cat}/K_m$  alta (y por lo tanto reduce la  $TS_R$ ), en primer lugar también es un análogo eficazmente renovado. Se ilustrará usando el ejemplo de un tripéptido que está enlazado al resto reactivo

fluorometilcetona. En virtud del aminoácido P1 que está implicado en la reducción del estado de transición en  $TS_R$  (como sería de esperar para un sustrato con alta  $k_{cat}/K_m$ ), se vuelve más difícil que la fluorometilcetona electrófila (o nucleófila) reactiva contrarreste este efecto (aumento de  $TS_R$ ) como lo exige la segunda suposición sobre inhibidores. En consecuencia, esta es la base de un problema principal

5 Como se ha descrito anteriormente,  $k_{cat}$  es más importante para la catálisis que  $K_m$  en enzimas óptimamente evolucionadas. Por lo tanto, las características de  $k_{cat}$  alta del componente de núcleo peptídico del inhibidor global, hace más difícil contrarrestar la reducción de  $k_{cat}$  (mediante reducción de  $TS_R$ ) por el resto reactivo. En resumen, dos de las suposiciones clave descritas anteriormente para inhibición con éxito del estado de transición se  
10 contrarrestan potencialmente por el método tradicional de diseño de inhibidores. De hecho, esto puede contribuir al gran número de fallos que se producen en el diseño de análogos del estado de transición (Wolfenden, 1999).

#### *Objetivos de un nuevo sistema de diseño de inhibidores*

15 Si los centros de unión y de reacción estuvieran realmente separados de forma tan elegante como predeciría el modelo de sitio dividido, en principio el método tradicional de diseño de inhibidores debería funcionar, dado que el resto reactivo no interferiría con el núcleo de unión peptídico (evitando de este modo el efecto "de bola de nieve" descrito), y de forma similar, dado que el núcleo de unión peptídico no estaría implicado en reducir  $TS_R$  en el centro de reacción de la enzima.

20 Un nuevo método para el diseño de inhibidores debería producir, por lo tanto, compuestos inhibidores que incluyen las siguientes características. En primer lugar, deberían conservarse contactos de unión favorables en  $ES_B$  y, posteriormente,  $TS_B$ . Este núcleo peptídico del inhibidor satisfaría entonces el criterio de ser caracterizado por interacciones de unión fuertes con la enzima que, como se ha enfatizado, es muy importante para la catálisis. En  
25 segundo lugar, el inhibidor debería contener un núcleo peptídico que no reduzca  $TS_R$  y, por lo tanto, no frustre el fin del inhibidor, que es causar el acontecimiento de inhibición opuesto (aumento de  $TS_R$ ). En tercer lugar, el inhibidor debería contener un resto reactivo que eleva independientemente  $TS_R$  sin afectar a ninguno de los contactos de unión favorables en  $ES_B$  y  $TS_B$ .

30 Estos son los objetivos de esta invención. El sistema enzima/inhibidor se simplifica en primer lugar reduciendo los grados de libertad dentro del mismo. Con ese fin, el método emplea criterios experimentales que separan los centros de unión y de reacción de la enzima, tan cercanos a las suposiciones del modelo de sitio dividido como sea posible, e impide de este modo el enlace destructivo entre el resto reactivo y el núcleo peptídico unido.

35 *El nuevo método para diseño de inhibidores: rectificación de problemas anteriores con el método de diseño de inhibidores de proteasa tradicional.*

El método experimental descrito en el presente documento está diseñado para emular el modelo de sitio dividido lo de forma más cercana posible. Las cinéticas son más empíricas de modo que los cálculos son más simplificados; el  
40 modelo está sujeto a evaluación y mejora a medida que el método está en curso. El método intenta separar la unión en la medida de lo posible de la reactividad. La esencia del enfoque es que el resto reactivo (es decir, el resto que da al inhibidor su capacidad de "bloquear" la proteasa) está fijado a un núcleo peptídico *no reactivo* (es decir, no escindible), que participa exclusivamente en la unión pero no a un grado significativo en la catálisis. Dado que está fijado a un núcleo peptídico que se une pero no es escindido por la enzima de corte, se deduce que el resto reactivo  
45 está implicado exclusivamente en reacciones en estado de transición, sin interferir con o influir en el núcleo de unión. El objetivo del método, que representa una desviación significativa de métodos actuales, es descubrir dicho péptido de unión no reactivo y usarlo, no un sustrato escindible, como base para del diseño del inhibidor.

Por consiguiente, la primer parte del enfoque de la invención (etapa I a etapa III, a continuación, particularmente  
50 etapa III) proporciona una metodología para identificar dicho núcleo peptídico. Dicho núcleo peptídico se caracteriza por una  $k_{cat}$  muy baja pero, no obstante, está marcado por una unión muy fuerte al sitio activo de la enzima diana. Este núcleo peptídico no escindible, que se une fuertemente se denomina en el presente documento "vehículo" en el método. En virtud de la fuerte unión del vehículo al sitio activo,  $ES_B$  siempre disminuye más de lo que aumenta  $ES_R$ , de modo que  $K_m$  puede ser baja o al menos constante. El fondo en este contexto es que  $ES_B$  se reduce debido a los  
55 contactos de unión *directos* favorables en el sitio activo así como a los contactos *débiles* favorables que están alejados del sitio activo que trabajan cooperativamente para reducir  $ES_B$ . Basándose en la observación de conservación de unión entre  $ES_B$  y  $TS_B$ , estos contactos de unión favorables entre el vehículo y la enzima en  $ES_B$  se refuerzan adicionalmente en  $TS_B$ . Por lo tanto, la unión eficiente entre el vehículo y la enzima para formar  $ES$  garantiza que las suposiciones mencionadas previamente en la coordenada de reacción para catálisis exitosa se  
60 cumplan: (1) interacciones de unión en  $ES_B$  y son aprovechadas; y 2)  $ES$  puede tener la opción de entrar en un estado de transición de modo que el vehículo también pueda unirse al estado de transición en  $TS_B$ .

Algunos críticos pueden argumentar que el vehículo solo se puede unir exclusivamente al nivel del estado basal (para reducir  $K_m$ ) y, por lo tanto, no puede tener interacción alguna con el conjunto de estado de transición.  
65 Específicamente, si es cierto, esto sugeriría que no se estaban produciendo interacciones de unión entre dicho vehículo y  $TS_B$ . Sin embargo, se enfatiza que, en el método de la invención, el vehículo está marcado por el sello de



calidad de que "supera" a aquellos sustratos que normalmente se caracterizarían por los valores de  $k_{cat}$  más altos posibles para la enzima diana, y por lo tanto está marcado por una unión fuerte a  $TS_B$  (etapa III). Para elaborar basándose en las suposiciones previamente establecidas, los sustratos de alta  $k_{cat}$  están alcanzando excelentes interacciones de unión a nivel del estado de transición con la enzima, ya que están marcados por una alta renovación (alta  $k_{cat}$ ). Se deduce entonces que el vehículo competitivo también debe estar marcado por interacciones de unión favorables aún mayores en el estado de transición (en  $TS_B$ ) que incluso los análogos de sustrato  $K_{cat}$  alta naturales.

Se concluye entonces, basándose en la mayor capacidad competitiva del vehículo para el sitio activo respecto al análogo de sustrato de  $k_{cat}$  alta, que el vehículo tendría una mayor afinidad por  $TS_B$  que la que los análogos de sustrato de  $k_{cat}$  alta tenían por  $TS_B$ . Por el contrario, si el vehículo tuviera una afinidad exclusiva solo por  $ES_B$  (un vehículo de  $K_m$  baja), es poco probable que se una tan favorablemente en el sitio activo de la enzima como lo harían los sustratos de alta  $k_{cat}$ , ya que la unión exclusiva a  $ES_B$  (sin unirse a  $TS_B$ ) no debería, en principio, suprimir la unión de la enzima a los estados de transición de los sustratos de alta  $k_{cat}$  para el que es naturalmente específica (basándose en el alto valor de  $k_{cat}$ ).

Se espera, por lo tanto, que este método produzca vehículos capaces de unirse con mayor afinidad al conjunto de contactos de unión en  $ES_B$  y/o  $TS_B$ , que sustratos de alta  $k_{cat}$ , que se renuevan normalmente. Un novedoso ensayo de inhibición competitiva para estos vehículos se presenta en la etapa III. La característica clave de este ensayo competitivo es que no está diseñado para identificar vehículos con una unión exclusiva y fuerte a  $ES$  (baja  $K_m$ ), sino que, en su lugar, está diseñado para identificar vehículos que tienen unión fuerte a  $ES_B$  y/o  $TS_B$ . para concluir, se postula que el vehículo está marcado por una alta afinidad por  $ES_B$  así como  $TS_B$ .

Adicionalmente y de forma importante, el vehículo es no catalítico (es decir, tiene una  $k_{cat}$  baja) y, por lo tanto, no puede reducir  $TS$  de manera que cause catálisis. Específicamente, la naturaleza no catalítica del vehículo implica que no interactúa favorablemente con  $TS_R$ . Por lo tanto,  $\Delta G_b$  no aumenta (la definición de catálisis impulsada por el estado de transición) y la velocidad catalítica de la enzima no aumenta. Hay tres posibles escenarios cinéticos para explicar esto. En el primer caso,  $TS_V$  (estado de transición con el vehículo) puede reducirse en la misma cantidad en la que se reduce  $ES$ , dando como resultado una unión uniforme (como se ha descrito anteriormente). En consecuencia, no hay cambios en la energía de activación ni en la mejora de la velocidad catalítica. En el segundo caso,  $TS_R$  puede aumentar en la misma cantidad en la que disminuyó  $TS_B$ , lo que provoca que  $TS_V$  permanezca sin cambios. En este acontecimiento,  $ES$  es menor y hay un aumento neto de la energía de activación y, por lo tanto, no hay catálisis. En el tercer caso,  $TS_R$  puede aumentar más de lo que disminuye  $TS_B$ , lo que hace que  $TS_V$  aumente, induciendo el mayor aumento posible de la energía de activación, lo que nuevamente es un escenario no catalítico. Aunque este tercer caso ofrece el escenario más inhibitorio para el vehículo, es improbable que ocurra ya que es improbable que interacciones de unión exclusivas del vehículo interactúen con el centro de reacción de  $TS_R$ .

Independientemente de la manera cinética mediante cual se previene la catálisis, el punto relevante en este contexto es que en todos estos posibles escenarios, la potenciación de la velocidad como resultado de la unión vehículo/enzima, es imposible. Esto conduce a la conclusión de que el vehículo no interactúa favorablemente con  $TS_R$ , dado que el vehículo participa solamente en la unión (dado que tiene una baja  $k_{cat}$ ), y no en la renovación. En consecuencia, el "centro de reacción" de  $TS_R$  está separado de los centros de unión de  $ES_B$  y  $TS_B$ , una situación que permite que este nuevo método se aproxime más estrechamente a las suposiciones del modelo de sitio dividido que el modelo tradicional.

Otra parte importante del método (etapa VII, a continuación) criba un resto reactivo que interactúe exclusivamente con  $TS_R$  (en oposición a  $ES_R$ ), con el objetivo final de elevar  $TS_R$ . Este cribado se lleva a cabo usando las metodologías bien conocidas en la técnica para cribar interacciones en estado de transición en  $TS_R$ . A continuación se enumeran las principales ventajas del método de la invención respecto al método tradicional. Como el método tradicional, el método de la invención *identifica eficazmente núcleos de unión peptídicos de alta afinidad por el sitio activo*. En el método de la invención, se identifica un vehículo que se une con una afinidad que es mayor que todos los potenciales sustratos de alta  $k_{cat}$  para ese sitio activo. Esta ventaja también es conferida por el método tradicional, en el que se identifica un análogo de sustrato de  $k_{cat}/K_m$  alta. Sin embargo, el análogo de sustrato de  $k_{cat}/K_m$  alta del método tradicional reduce  $TS_R$ . De este modo, mediante el método tradicional, el mismo núcleo peptídico que tiene unión fuerte a  $TS_B$  y  $ES_B$ , también interactúa con  $TS_R$ . Los centros de unión y los centros de reacción en la reacción de  $ES$  no son distinguidos por el análogo de sustrato del método tradicional. En contraste, el vehículo no catalítico identificado de acuerdo con la presente invención se une con  $TS_B$  y  $ES_B$ , pero no tiene interacciones con  $TS_R$ . Por lo tanto,  $TS_B$  y  $ES_B$  están efectivamente "separados" de  $TS_R$  en el vehículo de la invención, lo que sugiere que *el centro de unión y el centro de reacción entre  $ES$  pueden tratarse como si fueran distintos, dado que es coherente con un modelo "de sitio dividido"*.

Una ventaja principal del nuevo método respecto al método tradicional se deriva de esta división: *la adición experimental en el presente método de un resto reactivo que eleva  $TS_R$  al vehículo puede realizarse sin interferir en las interacciones de unión positivas que el vehículo comparte con  $TS_B$  y  $ES_B$ , dado que la unión y la reacción están "separadas" en el vehículo*. En contraste, la adición de un resto reactivo que eleva  $TS_R$  a un análogo de sustrato de  $k_{cat}/K_m$  alta, como en el método convencional, tiene una mayor probabilidad de interferir en las interacciones de

unión fuerte del núcleo peptídico de unión fuerte, dado que los centros de unión y de reacción están altamente interconectados y no están "divididos".

Además, el método tradicional emplea un análogo de sustrato que reduce  $TS_R$  y, por lo tanto, contrarresta la inhibición. En contraste, el vehículo elaborado a partir del método de la invención no tiene propiedades catalíticas. Esto da la segunda ventaja principal: debido a sus propiedades no catalíticas, *el vehículo identificado de acuerdo con la invención no puede reducir  $TS_R$  y por lo tanto, no funciona contra la inhibición.*

Además, como resultado de las complejidades entre las interacciones que se producen entre las partes de unión y reactiva de la molécula inhibidora producidas a partir del método tradicional, todo el sistema tradicional no es muy empírico, las cinéticas son más complicadas y difíciles de estudiar, las predicciones son más difíciles, y es, por lo tanto, más desafiante identificar un inhibidor de enzima de corte peptídico unido y potente efectivo. En contraste, la suposición de estado dividido que sustenta el método de la presente invención permite un sistema sencillo en el que las cinéticas no son muy complicadas, el sistema no es tan difícil de estudiar, las predicciones son más eficientes, y la identificación de un inhibidor de enzima de corte unido y potente es más probable. El método de la invención identifica, por lo tanto, un vehículo no catalítico (baja  $k_{cat}$ ) eficaz que aumenta  $TS_R$  de una manera que no interfiere en las interacciones de unión favorables que se producen con  $TS_B$  y  $ES_B$ . Aunque una  $k_{cat}$  de cero puede ser la situación más preferida teóricamente, una  $k_{cat}$  baja no nula también puede ser aceptable, particularmente cuando las propiedades inhibidoras del núcleo peptídico pueden suplementarse mediante funcionalización adicional con uno o más sustituyentes.

#### *Inhibición de la catálisis impulsada por desestabilización del estado basal*

Los argumentos anteriores suponen que la catálisis en estado de transición es el modo de renovación enzimática. Sin embargo, el modo de catálisis para la enzima podría ser, en su lugar, desestabilización del estado basal (figura 1c). En ese acontecimiento el método de la invención aún puede aplicarse. En la desestabilización del estado basal, el estado basal de la enzima se desestabiliza lo bastante para causar una reducción de la energía de activación  $E_a$  de modo que la velocidad de la enzima sea catalítica, aunque el estado de transición no se reduce. En este caso, la diferencia entre  $ES$  y  $TS$  se reduce. Para conseguir esto, la  $ES_B$  debe permanecer constante dado que  $TS_B$  tampoco debería reducirse. En su lugar,  $ES_R$  se eleva, lo que disminuye la energía de unión aparente (aumenta  $K_m$ ) y posteriormente eleva  $ES$  y de este modo acelera la velocidad. La aceleración de la velocidad es, por lo tanto, independiente de  $ES_B$ . En consecuencia, la energía de unión intrínseca se traslada de la unión a la catálisis, de modo que es ( $\Delta G_b$ ) constante. Murphy (1995) argumenta que esta última característica es la característica definitoria de un efecto de la desestabilización del estado basal.

Existen varios argumentos excelentes en la bibliografía que apoyan la desestabilización del estado basal como una forma significativa de catálisis. Un artículo de Jencks (1987) argumenta que la desestabilización del complejo  $ES$  es esencial para todas las formas de catálisis. Se argumenta que pequeños cambios en la desestabilización no son críticos para pequeños cambios en la catálisis, pero son esenciales para grandes aumentos en la velocidad. De hecho, se sugiere que la estabilización del estado de transición es necesaria, pero no es suficiente para las potenciaciones de velocidad.

A conocimiento de los inventores, no existen métodos que produzcan inhibidores que exploten el método de desestabilización del estado basal. Esto puede ser porque la desestabilización del estado basal no se considera en la bibliografía popular como un mecanismo serio para catálisis enzimática. Sin embargo, el método de la invención es, en principio, suficientemente versátil para producir inhibidores que inhiban enzimas que operan mediante estabilización del estado de transición, estabilización del estado basal, o una combinación de ambas. A continuación se describirá cómo se consigue la contrarrestación de la desestabilización del estado basal catalítica.

Con el fin de conseguir la inhibición, las etapas en el método de la invención identifican un núcleo peptídico no catalítico de unión fuerte (etapas I a III). Dado que el núcleo peptídico está unido fuertemente, causa un aumento de la energía de unión aparente de la enzima a través de contactos favorables en los centros de unión en el estado basal y el estado de transición. Por lo tanto,  $ES_B$  se reduce más de lo que aumenta  $ES_R$ . Esto puede hacer que  $ES$  se reduzca, lo que se traduce en una  $K_m$  sin cambios o menos. En consecuencia, este efecto por sí solo, en principio, cancelará el caso en el que se producirá la catálisis y donde se eleva  $ES$  en el escenario normal de catálisis. Se puede argumentar que  $TS_B$  también se reducirá dado que se redujo  $ES_B$  (de acuerdo con el principio de conservación entre  $ES_B$  y  $TS_B$ ). Sin embargo, el núcleo peptídico es no catalítico, lo que significa que  $TS_B$  no se redujo más de lo que se elevó  $TS_R$ , de modo que la reducción de  $TS$  no es beneficiosa para la catálisis. Esta es una propiedad intrínseca del núcleo peptídico. Además, la adición de un resto reactivo al péptido no catalítico puede causar efectos adicionales en el estado basal que interfieren en la progresión a un estado de transición. De nuevo, dado que la parte de unión del inhibidor se ha construido por separado de la parte reactiva, hay una probabilidad disminuida de que los acontecimientos de unión inhibidores del núcleo peptídico resulten influidos negativamente por el resto reactivo.

Desde la descripción hasta este punto, debería ser evidente que la invención no solo es novedosa, sino que sigue un enfoque que está contraindicado por los paradigmas previamente aceptados generalmente en la bibliografía y la

práctica de este campo. Los beneficios y el éxito empírico del método de la invención se ilustrarán en las siguientes secciones.

## PARTE II. MÉTODO DE LA INVENCION

5 Las proteasas son proteínas que catalizan la escisión de sustratos que contienen un constituyente peptídico. Dado que se encuentran universalmente y son, en muchos sentidos, representativas de las enzimas de corte como clase, las proteasas se usarán como el ejemplo arquetípico de las enzimas de corte con el fin de ilustrar el método de la invención.

10 El término "proteasa" como se usa en el presente documento significa una enzima que escinde un polipéptido de cualquier longitud, corto o largo, en un enlace peptídico, por ejemplo hidrolizando el enlace peptídico. El sustrato de una proteasa es, por lo tanto, un polipéptido. El sustrato puede ser un polipéptido de origen natural o un polipéptido sintético. La mayoría de las proteasas exhiben especificidad por ciertas secuencias peptídicas dentro de un polipéptido, y la invención está diseñada para explotar esta especificidad en la identificación de inhibidores de proteasa potentes y específicos, que se denominan en el presente documento "inactivadores de proteasa". La "potencia" se define en el presente documento como la inhibición que se produce con una unión fuerte (K<sub>i</sub> baja), y la "especificidad" se define en el presente documento como la inhibición que está marcada por una complementariedad máxima con la configuración de la enzima que causa la catálisis (por ejemplo, estado de transición o estado basal).  
15 Un tercer atributo, la "selectividad", se define en el presente documento como una característica de inhibidores que pueden discriminar entre la proteasa diana y otras proteasas. La selectividad es a menudo el resultado natural de "potencia" y "especificidad". A veces, el término "peptidasa" se usa en la técnica para identificar un subconjunto de proteasas que escinden polipéptidos cortos (es decir, péptidos). Sin embargo, el término "proteasa" como se usa en el presente documento pretende incluir las "peptidasas".

25 Los sustratos de proteasas se caracterizan y clasifican convenientemente de acuerdo con el método de Berger y Schechter (1970) (figura 2). Estos investigadores fueron los primeros en valorar la especificidad de la papaína y mostraron siete subsitios en el sitio activo de papaína con cuatro en el lado del grupo acilo (S4-S1) y tres en el lado del grupo saliente (S1'-S3'). Su nomenclatura clásica se usa en el presente documento. Las posiciones "S" se refieren a los subsitios de la enzima, mientras que las posiciones respectivas y correlativas "P" se refieren a los residuos del sustrato que se unen a ese subsitio particular. El acontecimiento de escisión del enlace cortable se produce en el surco de unión P1/S1 entre sustrato y enzima, respectivamente, donde el extremo N de un sustrato es el más cercano a los sitios S de número más alto, y el extremo C de un sustrato está más cerca de los sitios S' de número más alto.

35 Los inactivadores de proteasa identificados de acuerdo con el método de la invención normalmente tienen la fórmula general R<sub>1</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-R<sub>2</sub> en la que R<sub>1</sub> es un grupo de bloqueo opcional, Xaa es un residuo de aminoácido, n está entre 1 y 9, preferentemente entre 1 y 6, más preferentemente entre 1 y 4, más preferentemente 1, 2 o 3, y R<sub>2</sub> es un reactante inactivador de proteasa opcional. R<sub>1</sub>-(Xaa)<sub>n</sub> se denomina como núcleo o vehículo. Los reactantes inactivadores tienen las siguientes características. En primer lugar, son inertes hacia el núcleo en condiciones ambientales, cuando la enzima no está presente. En segundo lugar, se vuelven activados en presencia de la enzima. En tercer lugar, cuando están unidos a la enzima diana, reaccionan o se unen más rápidamente de lo que se disocian (Fersht, 1985). Los grupos de bloqueo son bien conocidos y se usan rutinariamente en la técnica de la química orgánica, y la invención no se limita al uso de ningún grupo de bloqueo particular en el vehículo o inactivador de proteasa; de hecho, como se ha destacado anteriormente, la presencia de un grupo de bloqueo es opcional. Los ejemplos de grupos o restos de bloqueo incluyen: Z = carbobenzoxi; B = Boc = t-butoxi; Ac = acetilo; Suc = succinilo (COOH y/o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO se pueden fijar al extremo amino); Mu = morfina; MeOS = metoxisuccinilo; glutarilo = ácido glutárico; D = D-aminoácido en lugar del L-aminoácido de origen natural; se pueden usar también aminoácidos no naturales tales como Nva-norvalina, Abu-ácido aminobutírico, como también grupos fenilo y similares.

45 Los ejemplos de reactantes inactivadores (que incluyen "reactantes suicidas" como se describen comúnmente en la bibliografía) incluyen fluorometilcetona (FMK), clorometilcetona (CMK), diazometilcetona, vinilsulfona (VS), vinilsulfonenilo (VSP o VSPH), epóxido (Ep), cetoamida (CONH o KA), clorometano, CONH-CH<sub>2</sub>-piridilo o CONH-piridilo (KPy, KPyr o K), CONH-4-morfolenilo (KM), CONH-etilo (KE, KC o KE2), un alfacetoácido (AK), un aceptor de Michael, aldehído peptídico, acetaldehído, nitrilo, hidroximato, ciclopropenona y epoxisuccinamida.

55 Los residuos de aminoácidos pueden ser aminoácidos de origen natural o aminoácidos no naturales, tales como norleucina y ornitina. Pueden ser D-aminoácidos o L-aminoácidos, y pueden incluir derivatizaciones o modificaciones de cualquier tipo. Los aminoácidos se pueden unir por enlaces peptídicos o por cualquier otro tipo de enlace, tales como enlaces éster. Pueden ser alfa-aminoácidos, beta-aminoácidos, peptoides (que contienen uno o más sustituyentes en los sitios N de amida de la cadena principal en lugar de o además de los sustituyentes en las posiciones alfa amino de las cadenas principales de poliamida) o análogos peptídicos en los que uno o más átomos de un péptido han sido sustituidos por diferentes elementos atómicos o por grupos funcionales, con el fin de obtener propiedades mejoradas para uso farmacofórico. Los péptidos pueden ser de cualquier longitud.

La parte del inactivador de proteasa diferente del reactante inactivador se denomina en el presente documento el núcleo peptídico. Estructuralmente, el núcleo peptídico se representa mediante  $R_1-(Xaa)_n$  o, si no hay ningún grupo de bloqueo, simplemente  $(Xaa)_n$  (véase anteriormente). El núcleo peptídico incluye uno o más aminoácidos (P a P') que se unen a uno o más aminoácidos (S a S') en el sitio de unión al sustrato en la proteasa diana (figura 2).

El método de la invención puede emplearse para identificar inhibidores de proteasas producidas por organismos, tales como bacterias, hongos y protozoos, que son patógenos para animales o plantas, o para cualquier proteasa cuya inhibición sirva para un propósito útil. Preferentemente, el inactivador de proteasa es selectivo para una proteasa específica de un organismo patógeno o está asociado con una patología particular, y no inhibe otras proteasas no diana del huésped. La proteasa diana puede ser una proteasa conocida o desconocida.

Un experto en la materia apreciará que todas las etapas del método descritas pueden realizarse o, como alternativa, una o más etapas pueden omitirse a discreción del investigador, dependiendo, por ejemplo, de las características conocidas de la proteasa, los sustratos y/o los resultados de determinaciones anteriores. Por ejemplo, el cribado general para la escisión del péptido (etapa I) puede omitirse en el caso de una proteasa bien caracterizada. Del mismo modo, el ensayo de sustratos candidatos (etapa IV) o inactivadores de proteasas (etapa VIII) por su capacidad para inhibir la escisión de sustratos naturales de la proteasa puede omitirse si el tiempo y el dinero son escasos, ya que esta etapa proporciona información que es útil pero no es necesaria para la identificación definitiva de un inhibidor de un sitio activo de la proteasa.

Además, como también reconocerá un experto en la materia, el orden en que se realizan algunas de las determinaciones puede modificarse. Por ejemplo, el estudio de selectividad (etapa IX) puede realizarse inmediatamente después de la etapa VII, parte B, que identifica el potencial inhibidor de los reactantes inactivadores enlazados covalentemente. En este caso, el investigador puede desear valorar la selectividad de los inhibidores potenciales antes de pasar realmente al tiempo y los gastos de realizar ensayos de estado de transición o de estado basal en la etapa VII-parte C. Deben realizarse las siguientes etapas, sin excepción, pero pueden realizarse en cualquier orden y no están limitadas a ensayos cinéticos: etapa II (cribado de escisión de sustrato), y etapa III (ensayo competitivo). La etapa VII (ensayo estado de transición o de estado basal) puede realizarse cuando sea deseable.

Como se ha destacado anteriormente, el método de la invención puede realizarse usando un material de partida que es una proteasa diana purificada o una mezcla en bruto que contiene la actividad proteasa. Una vez que la mezcla en bruto ha sido caracterizada, se utiliza de la misma manera que la proteasa purificada, excepto que se añade en sustitución de la proteasa purificada. Por supuesto, cuando está disponible, es preferible emplear la proteasa purificada como un material de partida. Debe entenderse que los procedimientos descritos a continuación son aplicables igualmente a proteasas diana purificadas y a mezclas en bruto; sin embargo, si hay modificaciones, adiciones o eliminaciones en el protocolo experimental que sean sugeridas para mezclas en bruto, estas también se describen. La cantidad usada es la cantidad que es proteolíticamente detectable en el dispositivo de detección.

*Etapas preliminar (etapa P): detección preliminar de condiciones de ensayo óptimas definidas para escisión del sustrato*

El entorno óptimo para escisión proteolítica por la proteasa diana se establece antes de realizar los experimentos que conducen a la identificación de un inhibidor del estado de transición de la proteasa. A este respecto, es útil la información o determinaciones sobre el pH y otras condiciones de ensayo (por ejemplo, temperatura, requisitos del cofactor y condiciones del tampón) que permitan la catálisis óptima del sitio activo. Además, si se pueden obtener o están disponibles datos de caracterización preliminares, tales como una idea general de la clase mecanicista de la proteasa, esta información es útil para optimizar las condiciones para la catálisis. Los ejemplos de clases mecanicistas incluyen cisteína proteasas, serina proteasas, proteasas aspárticas y metaloproteasas.

Este ensayo preliminar para determinar las condiciones de ensayo óptimas para la escisión del sustrato preferentemente utiliza sustratos representativos de la proteasa diana. Por ejemplo, un sustrato de endopeptidasa representativo tal como Z-Phe-Arg-AFC se usaría si la proteasa diana fuera una cisteína proteasa de tipo catepsina L, o se emplearía Z-Arg-AFC si se esperara que la proteasa fuera una serina proteasa. AFC representa el cromóforo 7-amino-4-trifluorometilcumarina, que emite fluorescencia tras la escisión del péptido. Como alternativa, se puede emplear un cromóforo que cesa de emitir fluorescencia tras la escisión. Los ejemplos de otros cromóforos adecuados incluyen para-nitro-anilina (PNA), 7-amino-4-metilcumarina (AMC) y 7-amino-4-carbamoilmetilcumarina (ACC), donde la elección del cromóforo puede estar dictada por: coste y dificultad de síntesis; longitud de onda para la detección de fluorescencia; compatibilidad con la proteasa; y otras consideraciones prácticas.

Donde la proteasa diana es una proteasa purificada, las concentraciones de sustrato representativas en el ensayo preliminar son, preferentemente, al menos de 50 a 100 veces mayores que la concentración de enzima para garantizar condiciones de saturación, y también es preferible que sean menores que el intervalo micromolar con el fin de prevenir la introducción de variables que potencialmente puedan introducir fenómenos cinéticos no lineales. En este ensayo, la proteasa purificada se añade a la cantidad saturante de sustrato en tampón de ensayo.

La proteasa diana también puede ser parte de una "mezcla en bruto". En ese caso, los ensayos preliminares se alteran tal como se describe con más detalle a continuación.

#### A. Determinación del pH e intervalo de pH óptimo

5 De todas las optimizaciones de ensayo, la determinación del intervalo de pH óptimo para la proteasa diana es la más importante. Un punto de pH de partida puede deducirse normalmente de la fuente biológica de la proteasa diana o puede que ya se conozca de antemano. Por ejemplo, la cisteína proteasa de *Taenia* está presente en los lisosomas del parásito *Taenia* (un entorno ácido), por lo que se empleó un tampón ácido con citrato 0,4 M, pH 4,9 (documento WO 00/63350) para estudios de actividad de proteasa. El perfil de pH de la proteasa diana puede investigarse determinando un intervalo de pH para una batería de sustratos representativos para la clase del sitio activo (por ejemplo, sustratos de endopeptidasa si la proteasa es una endopeptidasa, sustratos de aminopeptidasa si la proteasa es una aminopeptidasa, y similares). Se traza una curva de pH frente a actividad y se determina el pH, preferentemente hasta el centésimo grado, para la escisión máxima de los sustratos más representativos. En los casos en que se observan variaciones en el pH óptimo para diferentes sustratos, el pH más cercano al pH apropiado para la ubicación biológica de la proteasa diana es normalmente el pH óptimo para estudios posteriores. Preferentemente, los ensayos se llevan a cabo al pH óptimo  $\pm 1$  unidad de pH, más preferentemente  $\pm 0,5$  unidades de pH, de la forma más preferente  $\pm 0,1$  unidades de pH.

#### 20 B. Determinación de las condiciones exógenas óptimas

Se puede seguir una estrategia similar a la anterior para determinar si es necesario añadir componentes exógenos para promover la actividad proteasa. Por ejemplo, las cisteína proteasas a menudo requieren un entorno reductor para la actividad, las calpaínas se activan por la adición de calcio y las metaloproteasas comúnmente requieren un cofactor metálico para la activación. Por lo tanto, las condiciones para la escisión óptima por la proteasa diana variarán de proteasa a proteasa y se deben determinar en consecuencia. Por ejemplo, se determinó que debe añadirse L-cisteína 10 mM al tampón de ensayo para la cisteína proteasa de *Taenia* con el fin de optimizar las condiciones de escisión para el sustrato de endopeptidasa representativo, Z-Phe-Arg-AFC (documento WO 00/63350).

#### 30 C. Determinación de la temperatura de incubación óptima

Las temperaturas de incubación del ensayo también se pueden modificar para determinar la temperatura óptima para la escisión de la proteasa. Si la proteasa diana proviene de un ser humano, esta temperatura será normalmente de 37 °C, que es la temperatura fisiológica para la mayoría de las actividades enzimáticas. Para la proteasa del parásito humano *Taenia*, se determinó que la temperatura óptima para la escisión era de 37 °C (documento WO 00/63350).

#### 40 D. Determinación del tiempo de incubación óptimo

Una vez que las condiciones anteriores en el ensayo se han definido, puede ser útil incubar los sustratos más altamente escindidos (conocidos como "sustratos de alta kcat") individualmente con la proteasa diana, a continuación construir un gráfico de tiempo frente a escisión. El tiempo en el que menos del 10 % de reacción se ha completado debe tenerse en cuenta para lecturas futuras. Una reacción que ha avanzado hasta menos del 10 % de finalización es normalmente una en la que las concentraciones de sustrato permanecen saturantes, evitando de este modo advertencias pleiotrópicas dependientes de la concentración que pueden producirse si se reducen las concentraciones de sustrato, tal como se describe más adelante. Esto puede complicar las valoraciones cinéticas que se realizan más tarde. Por lo tanto, si la reacción ha avanzado demasiado, y las concentraciones de sustrato están alteradas, las variables cinéticas pueden no ser fiables.

#### 50 E. Proteasa diana en una "mezcla en bruto"

Como se ha destacado anteriormente, la proteasa diana puede ser una proteasa purificada y aislada, o puede ser parte de una mezcla en bruto. Una "mezcla en bruto" es una colección o combinación de componentes biológicos dentro de los cuales existe la proteasa diana. Normalmente, la mezcla en bruto es una muestra biológica no purificada o parcialmente purificada. En los ensayos que emplean una mezcla en bruto, es especialmente importante definir condiciones catalíticas óptimas tal como se ha descrito anteriormente. Cuanto más "finamente ajustado" esté el entorno de ensayo, mayor es la posibilidad de reducir el número de proteasas que están activas en esas condiciones definidas. Incluso cuando se han determinado las condiciones ambientales óptimas para la escisión de una batería de sustratos, aún existe la posibilidad de que las isoformas de la proteasa o incluso más de una proteasa funcionen de manera óptima en las condiciones dadas. Sin embargo, incluso en el caso de que más de una proteasa funcione de manera óptima en un entorno de ensayo dado, aún es posible e incluso probable que los mecanismos bioquímicos en el acontecimiento catalítico sigan algún patrón conservado. Esto se basa en el hecho de que la escisión de más de una proteasa es óptima en las condiciones de ensayo definidas debido a mecanismos bioquímicos similares dentro del sitio activo. De hecho, la conservación bioquímica significativa a menudo está presente a nivel del sitio activo para diferentes clases de proteasas. Por ejemplo, tanto la cisteína como la serina

proteasas avanzan con un mecanismo similar que emplea un aducto tetraédrico con el sustrato en uno de los estados de transición importantes (Kamphuis y col., 1984; Polgar y col., 1988).

Sin un análisis en profundidad, es imposible valorar si el mecanismo de dos o más proteasas en un entorno específico está o no completamente conservado. No obstante, y sin pretender estar sujetos a ninguna teoría particular de actividad o mecanismo biológico, estos procedimientos continúan con la suposición de que existe una conservación del mecanismo de sitio activo de más de una proteasa que opera en una condición ambiental dada, y que un inhibidor que es específico para ese sitio activo debe suprimir el acontecimiento catalítico para esas proteasas. Incluso si esta suposición no es completamente correcta, se espera que los procedimientos perfilados a continuación produzcan un inhibidor que tenga cierta afinidad por el sitio activo de uno u otro o de todos. Tal como se demuestra en los ejemplos, se produjeron los mismos inhibidores (Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK) para la proteasa purificada que para la mezcla en bruto que incluía la proteasa. Si bien esta descripción supone que más de una proteasa estará activa en una condición ambiental muy específica, de hecho pueden existir mezclas en bruto que contienen solo una proteasa que es activa en las condiciones definidas.

El procedimiento para determinar el entorno catalítico óptimo para una proteasa presente en una mezcla en bruto es similar al perfilado anteriormente, con los siguientes refinamientos opcionales. Hasta que se determine el tiempo de incubación óptimo, normalmente se emplean tiempos de incubación largos (por ejemplo, 18 - 24 horas). Los procedimientos pueden variar dependiendo de si se sabe algo sobre la clase mecanicista de la proteasa. En el ensayo de optimización de la actividad preliminar descrito a continuación, el término "actividad" se usa indistintamente con "proteasa" ya que, por definición, la proteasa en una mezcla en bruto no está purificada.

La mezcla en bruto se prepara a partir de una muestra biológica usando procedimientos que están diseñados para aislar proteínas y materiales proteicos a partir de otros componentes celulares, tales como lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Las técnicas particulares usadas dependen de la fuente biológica conocida o sospechada de la proteasa diana. Se conocen en la técnica muchos procedimientos para la liberación de proteínas, y la invención no se limita a ningún procedimiento particular para preparar la mezcla en bruto. Por ejemplo, en el caso de la proteasa de la proteasa de *Taenia*, se sospechó que la proteasa era una proteína de membrana periférica. En consecuencia, se realizó una agitación en vórtice rigurosa de los parásitos en tampón ácido seguida de centrifugado, lo que provocó la liberación de la actividad similar a la cisteína proteasa (basándose en los perfiles del sustrato escindido y el inhibidor) en el sobrenadante (documento WO 00/63350). Por otro lado, si se sospecha que la proteína está unida a la membrana, se puede emplear un método de solubilización con detergente.

Si se desea, la mezcla en bruto puede purificarse adicionalmente. Por ejemplo, puede someterse a una cromatografía de exclusión por tamaño, tal como filtración en gel, que separa los componentes en la mezcla en bruto por tamaño. Los medios de filtración en gel están disponibles de varios proveedores, incluyendo BioSeptra, Pharmacia y otros. Por ejemplo, la mezcla en bruto que contiene la actividad proteolítica puede cargarse en una columna de filtración en gel y fraccionarse. Las fracciones supervisadas usando las condiciones óptimas para la escisión determinadas anteriormente pueden usarse para detectar subfracciones que contienen la actividad deseada. Opcionalmente, se puede usar primero una columna de filtración en gel con un amplio intervalo de separación, seguido por un estrechamiento de esta columna (mediante un cambio de la resina de filtración en gel) hasta el intervalo que más adecuadamente purificará parcialmente la proteasa. Si la actividad no puede disolverse en solución, entonces puede ser necesaria una estrategia de purificación parcial independiente. Opcionalmente, también se puede realizar una purificación adicional de la proteasa diana, tal como mediante cromatografía de intercambio iónico o de fase inversa.

Preferentemente, se estudia un amplio intervalo de pH. El conocimiento del pH del entorno biológico del que se deriva la enzima de interés biológico es útil, aunque no necesario. Si se conoce o se sospecha la clase mecanicista de la proteasa, se construye un perfil de pH frente a actividad usando uno o más sustratos representativos. Si no se conoce la clase mecanicista, se construye una curva de pH frente a actividad para los sustratos que representan las diferentes clases mecanicistas. Posibles sustratos para diferentes clases mecanicistas se incluyen en la siguiente tabla. Por ejemplo, los posibles sustratos incluyen Z-Phe-Arg-X para cisteína proteasas y Z-Arg-AFC para serina proteasas, donde X representa el grupo de detección (por ejemplo, X es 7-amino-4-trifluorometilcumarina).

Ejemplos de sustratos representativos para diversas enzimas

<b>Enzima</b>	<b>Sustrato representativo</b>
Catepsina B	B-LRR_AFC
Catepsina C	GR-AFC
Catepsina D	Z-RGFFP-AFC
Catepsina G	Suc-GGF-AFC
Catepsina H	L-R-AFC
Catepsina L	Z-FR-AFC
Catepsina K	B-AGPR-AFC
Quimotripsina	Suc-LLVY-AFC

<b>Enzima</b>	<b>Sustrato representativo</b>
Elastasa	MeoSuc-AAA-AFC
Tripsina	Z-R-AFC
Uroquinasa	Glutarilo-GR-AFC
Plasmina	Z-AKK-AFC
Enzima conversora de interleucina (ICE)	Ac-YVAD-AFC
Aminopeptidasa B	L-K-AFC
Aminopeptidasa M	L-L-AFC

Después de la construcción del perfil de pH frente a actividad, los resultados se revisan para determinar el pH óptimo y el sustrato específico que se empleará para la detección. Si no se conoce la clase mecanicista de la proteasa, se realiza una valoración y se toma una decisión basada en un análisis de la actividad proteasa con respecto a los diversos sustratos ensayados. Se pueden observar varias actividades enzimáticas diferentes dentro de la mezcla en bruto; las actividades se ponen de manifiesto por la división observada de diversos sustratos representativos. La elección de qué actividad investigar queda a discreción del investigador. Por ejemplo, se pueden elegir las condiciones que generan la mayor escisión en un sustrato específico. Por otro lado, se podría elegir un pH particular, en casos en los que la actividad a ese pH parece ser una actividad biológica de interés. En el caso de la proteasa de *Taenia* (documento WO 00/63350), la actividad elegida para una investigación adicional fue la actividad más alta observada a pH ácido. Esto se debió a que se sospechaba que la proteasa de interés estaba ubicada en los lisosomas, un orgánulo ácido. La actividad seleccionada para la investigación se derivó de un sobrenadante resultante de una extracción con ácido, y se observó actividad máxima a pH 4,9, que era equivalente al pH de los lisosomas.

Después de que se ha elegido una actividad basada tras la escisión observada del sustrato específico, se puede refinar el pH óptimo. Se debe advertir de que se pueden observar picos dobles en las curvas de pH frente a actividad, que a menudo representan enzimas solapantes o isoformas dobles de la misma enzima. La demostración de dichos picos, que se desvían del comportamiento en forma de campana, es indicativa de más de una enzima principal que opera al pH indicado.

Una vez que se identifican el pH óptimo y el sustrato de detección general, se construye una curva de dosis-concentración de mezcla en bruto con respecto a una actividad de escisión de sustrato. La mezcla en bruto se añade en concentraciones crecientes al sustrato específico al pH óptimo determinado. A continuación, se sigue la actividad de la proteasa en cada concentración a lo largo del tiempo. Se determinan la concentración y un tiempo en que se registra la actividad.

Las variables exógenas, temperatura de incubación óptima y tiempo de incubación óptimo se determinan como se ha descrito anteriormente para la proteasa diana purificada.

#### *Etapa 1. Cribado general de sustratos proteicos para identificar patrones de escisión preferidos*

Esta es un cribado opcional que puede realizarse inicialmente o más tarde durante el método con el fin de obtener información general sobre las preferencias de escisión de la proteasa diana. Más específicamente, este cribado se usa para identificar patrones en los sitios P3, P2 y P1 de sustratos que están asociados con la escisión del sustrato. Este cribado se realiza normalmente usando proteínas de origen natural como sustratos. Se prefiere que los sustratos proteicos contengan un complemento completo de aminoácidos con el fin de llevar a cabo el cribado más general. Los ejemplos de sustratos proteicos preferidos incluyen albúmina e insulina. Si se conoce el sustrato natural de la proteasa, entonces esta proteína se usa como fuente para la escisión del sustrato. En el ejemplo 1, se emplea la inmunoglobulina G humana como fuente de proteína para analizar la escisión por parte de la cisteína proteasa de *T. solium*, dado que se había determinado previamente que esta proteína puede servir como una diana natural para la escisión. Los sustratos proteicos también se pueden elegir en función de la ubicación biológica esperada de la proteasa. Por ejemplo, se sabe que las cisteína proteasas ácidas escinden proteínas importadas generales como la albúmina, por lo que la albúmina podría usarse en la detección de una cisteína proteasa. Preferentemente, se usa espectroscopía de masas para seguir la escisión del sustrato proteico.

La proteasa se incuba en un tampón de ensayo en las condiciones óptimas para escisión según lo determinado en el ensayo de optimización preliminar. Los patrones de escisión se analizan para determinar las preferencias de escisión de la proteasa, es decir, aminoácidos o clases de aminoácidos que aparecen frecuentemente en posiciones P3, P2 y/o P1 de los sustratos cribados. Si no se observan escisiones, la concentración de proteasa, las condiciones y/o sustratos de reacción se modifican hasta que se observe escisión.

#### *Etapa II. Determinación de sustratos de alta y de baja kcat*

Este es otro procedimiento de cribado. Permite la detección *in vitro* del o de los sustratos peptídicos más eficaces de la proteasa diana (sustratos de alta kcat). También se identifican sustratos que no se escinden bien (sustratos de baja kcat).

#### A. Cribado de sustratos sintéticos

Este procedimiento de cribado identifica el o los sustratos sintéticos que son escindidos de la forma más eficaz por la proteasa diana. Preferentemente, los sustratos cribados son tripéptidos, dipéptidos y/o compuestos que comprenden aminoácidos individuales, pero se pueden usar péptidos más largos si se desea. Los extremos N de los sustratos cribados se derivatizan opcionalmente (por ejemplo, con un grupo protector como resultado de síntesis química), y un grupo de detección se une preferentemente al extremo C para facilitar la detección del acontecimiento de escisión. Debe entenderse que el método no está limitado al uso de sustratos que tienen grupo de protección y/o grupo de detección particular alguno, y que un grupo de detección puede unirse al extremo N en lugar de o además del grupo de detección idéntico o diferente en el extremo C.

Un grupo de detección que es muy adecuado para el presente método es un grupo fluorométrico tal como 7-amino-4-trifluorometilumarina (AFC), que puede detectarse mediante un aparato fluorómetro de alta calidad. En el contexto de la presente invención, un grupo fluorométrico es uno que es no fluorescente cuando se fija al núcleo peptídico (que puede ser un único aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, y así sucesivamente sin limitación) pero emite fluorescencia cuando se escinde. Sin embargo, debe destacarse que la detección fluorométrica no es el único mecanismo mediante el cual puede medirse la actividad proteasa. De hecho, en la técnica ya se conocen varios métodos incluyendo aquellos que implican efectos de isótopo cinético (Cleland, 1995). Cualquiera puede ser elegido a discreción del investigador; la invención no pretende estar limitada por la elección de ningún grupo de detección particular. En el ejemplo 2, se obtuvieron monopéptidos, dipéptidos y tripéptidos enlazados a AFC con una variedad de permutaciones en P3-P1 de Enzyme Systems Products (Livermore, CA) y se escindieron para liberar el grupo AFC, que luego se midió como una molécula libre mediante el fluorómetro (absorbancia de AFC: 400 nm, emisión de AFC 505 nm). La escisión de AFC se convierte en cantidades molares, basándose en una curva patrón previamente establecida para el fluorómetro disponible.

El investigador puede elegir cribar una amplia clase de sustratos peptídicos o una clase más limitada de sustratos peptídicos. Dados 20 L-aminoácidos de origen natural, el número total de tripéptidos, dipéptidos y/o compuestos que comprenden aminoácidos individuales teóricamente disponibles para el cribado es 8.420. Cuando se trata con números tan grandes, la ventaja de la accesibilidad a instrumentación de alto rendimiento, tal como un sistema *microarray* o instrumentación robótica, se hace evidente. Sin embargo, si esta instrumentación no está disponible, la mayor parte del procedimiento puede realizarse de manera bastante económica con tubos de vidrio Flint de 10 por 50 mm (disponibles de Fisher Scientific), una incubadora y un fluorómetro general u otro dispositivo de detección.

El coste y el tiempo a menudo dictan que se use un panel más pequeño de sustratos en el cribado. En ese caso, los sustratos que son representativos de aquellas proteínas escindidas por la proteasa en vista de su clase mecanicista conocida o sospechada se emplean preferentemente. Existen varios medios para seleccionar sustratos representativos para la proteasa diana. Por ejemplo, el cribado por espectroscopía de masas puede proporcionar información sobre qué combinaciones de aminoácidos en P3-P1 se prefieren para la escisión por la proteasa diana. Además, si se conoce un sustrato natural de la proteasa, los sustratos representativos pueden predecirse analizando los aminoácidos en las posiciones P1, P2 y/o P3 del sustrato conocido y seleccionando los sustratos que tienen aminoácidos con características similares (por ejemplo, hidrófobos, polares, no polares) en las posiciones correspondientes. Además, se puede conocer u observar que ciertos aminoácidos en ciertos sitios son preferidos en vista de la clase de sitio activo de la proteasa diana. Por ejemplo, muchas serina proteasas prefieren una arginina en P1.

Independientemente de cuántos sustratos se usen, la proteasa diana se incubaba, individualmente, con cada uno de los sustratos disponibles usando las condiciones proteolíticas óptimas determinadas en el ensayo preliminar. Es útil que el sustrato se pueda preincubar en el tampón de ensayo durante un corto período de tiempo con el fin de alcanzar un estado equilibrado (por ejemplo, aproximadamente 20 minutos), antes de la adición de la proteasa. La proteasa no debe añadirse demasiado tarde. En el ejemplo 2, se determinó que el sustrato de endopeptidasa, Z-Phe-Arg-AFC ( $Z = C_6H_5-CH_2-O-CO-$ , grupo de bloqueo para el extremo N) se escinde de forma más eficiente que muchos otros sustratos en una pequeña biblioteca para la proteasa de la *Taenia*. Esta valoración se basó en la escisión rápida del grupo fluorométrico AFC.

#### B. valoración de parámetros cinéticos para escisión del sustrato

Cuando la proteasa diana se purifica y ha sido cuantificada, se calcula  $V_{max}$  para la escisión de cada sustrato, siempre que la concentración de la proteasa sea conocida. Dado que  $k_{cat}$  es una función directa de  $V_{max}$ , estos valores se pueden determinar con bastante rapidez. Por ejemplo, si se usa AFC como el grupo de detección,  $k_{cat}$  y  $V_{max}$  se calculan a partir de la cinética de liberación de los grupos AFC. El resultado es una representación cinética para la escisión del sustrato por la proteasa diana. Si no se puede determinar la concentración de proteasa (como en una mezcla en bruto), solamente se calcula  $V_{max}$ . Debe destacarse que  $K_m$  no necesita ser calculada y normalmente no se calcula en esta valoración.

#### C. Identificación de sustratos de alta y de baja $k_{cat}$



Basándose en los resultados anteriores, se identifican aquellos sustratos con los valores más altos y más bajos para  $k_{cat}$  (o  $V_{max}$ , donde se desconoce la concentración de proteasa). Los sustratos de alta  $k_{cat}$  se emplearán como compuestos de detección para la proteasa diana, así como una fuente para la competencia de potenciales núcleos de unión peptídicos (etapa III) e inhibidores (etapa VII).

5 Los sustratos de baja  $k_{cat}$  (o baja  $V_{max}$ ) pueden dividirse en dos clases: sustratos que no están unidos y, por lo tanto, no se renuevan, y sustratos que están unidos pero no se renuevan (unión no catalítica), y potencialmente bloqueados en el sitio activo. Los sustratos que obedecen a la última condición son de interés como inhibidores potenciales de la actividad proteasa, ya que están unidos pero no poseen características bioquímicas que conduzcan a la renovación. Se denominarán "vehículos" a partir de este punto, ya que son "suministrados" al sitio activo. Como se ha descrito anteriormente, es esta posibilidad la que conferirá ventajas significativas al vehículo unido, dado que el objetivo de diseño del núcleo peptídico es identificar un sustrato que reduce la energía de unión del complejo enzima/sustrato ( $ES_B$ ) and la energía de unión del estado de transición ( $TS_B$ ) pero *no* reduce la energía de reactividad del estado de transición ( $TS_R$ ) como lo haría un núcleo peptídico unido catalíticamente. *Tal como se enfatizó en la parte I, se postula que la explotación de  $ES_B$  y  $TS_B$  por un inhibidor es un beneficio clave del método de la invención.*

### *Etapa III. Identificación de sustratos inhibidores unidos no catalíticamente*

20 Este ensayo de unión se realiza en el conjunto de sustratos de baja  $k_{cat}$  y distingue sustratos no unidos de sustratos unidos, pero no catalíticos. Más específicamente, el ensayo permite la identificación de emparejamientos de enzima/sustrato que están marcados por una unión muy fuerte a  $ES_B$  y/o  $TS_B$ , pero sin un efecto reductor de  $TS_R$ , de modo que los centros "de unión" y los centros "de reacción" de la enzima están efectivamente separados. (Como se recordará,  $ES_R$  es enteramente independiente de  $ES_B$ ,  $TS_B$  y  $TS_R$  y, por lo tanto, no se considera en gran medida en esta descripción).

30 Es una característica única de esta invención que identifica núcleos que son hidrolizados solo mínimamente o no lo son en absoluto por enzimas diana, pero que tienen características de unión sustancial en el sitio activo. Se pueden usar métodos no cinéticos para este ensayo, tales como resonancia magnética nuclear u otra espectroscopía para valorar la unión dentro de los complejos enzima-sustrato. Sin embargo, el modo más conveniente y preferido de la invención prefiere ensayos de unión competitiva.

35 Además de identificar aquellos sustratos de baja  $k_{cat}$  que exhiben una unión fuerte a la configuración de la enzima que impulsa la catálisis, este ensayo selecciona además sustratos que están tan fuertemente unidos que inhiben la escisión de sustratos de alta  $k_{cat}$ . El resultado final es la identificación de un tripéptido, dipéptido o motivo de un único aminoácido que es capaz de unirse al sitio activo de una manera cinéticamente más favorable que la combinación de tripéptido, dipéptido o único aminoácido más comúnmente unida (aquellos que normalmente tienen una alta relación  $k_{cat}/K_m$ ). Un ejemplo específico de este ensayo se proporciona en el ejemplo 3. Los sustratos no catalíticos unidos fuertemente identificados de acuerdo con esta etapa se denominan "no escindibles" o "no hidrolizables" en el presente documento, y se denominan inhibidores o inactivadores en el presente documento y representan sustratos que se escinden a solo una pequeña medida como máximo, y que se unen no catalíticamente a la proteasa diana.

45 Tal como se menciona en la parte I, se puede argumentar que los sustratos fuertemente unidos en esta etapa se unen solamente a  $ES_B$  y no a  $TS_B$ , en el caso donde la estabilización del estado de transición impulsa la catálisis para una enzima específica. Por lo tanto, dicha unión sería indicativa de solo una inhibición del estado basal. Sin embargo, una característica clave de esta etapa es que los sustratos unidos están superando a los sustratos de alta  $k_{cat}$  que participan en la catálisis uniéndose también a  $TS_B$ . Por lo tanto, si un "vehículo" de sustrato competitivo unido en este caso se une más favorablemente que dicho sustrato de  $k_{cat}$  alta, se postula que también debe unirse a  $TS_B$ , la configuración que estaría marcada por las características de unión más fuertes. Este sería, por lo tanto, el modo de inhibición, dado que el sustrato de alta  $k_{cat}$  está unido más fuertemente al estado de transición.

55 La determinación de  $K_m$  para una gran cantidad de sustratos puede ser una tarea que consume mucho tiempo si no se dispone de instrumentación avanzada y recursos extensos. Para minimizar ese problema, este ensayo está diseñado para seleccionar rápida y eficazmente sustratos que tienen un valor muy bajo de  $K_m$  (o  $K_i$  en las etapas a continuación), sin el uso de los recursos exhaustivos o modelización cinética (nótese que la  $K_m$  real no se determina). Se puede analizar rápidamente un gran panel de sustratos con afinidades de unión extremadamente fuertes por la proteasa diana.

60 La potencial inhibición competitiva de la proteasa diana se determina en un proceso de dos partes. En primer lugar, se identifica una agrupación inicial de sustratos de baja  $k_{cat}$  que se unirán a la proteasa más favorablemente que un cóctel que comprende un pequeño número de los sustratos de  $k_{cat}$  superior. El objetivo de esta parte del ensayo es obtener un perfil muy bien diferenciado que represente una inhibición ordenada de la escisión por proteasa de los sustratos de alta  $k_{cat}$ , por los sustratos competidores de baja  $k_{cat}$ . El perfil cualitativo de la inhibición es más importante en este contexto que la adquisición de valores cuantitativos. A continuación, la dosis del cóctel aumenta constantemente mediante una mezcla de sustratos de alta  $k_{cat}$  constantemente diversificada y más concentrada, de

una manera que impone una mayor rigurosidad en el ensayo competitivo (cribados de dosificación múltiple). La diferenciación entre los sustratos de baja kcat basándose en la capacidad de competencia se incrementa de este modo, permitiendo la selección de solo los péptidos unidos más fuertemente, ya que el tamaño de la agrupación disminuye constantemente.

Se espera que el aumento de la rigurosidad que resulta de un aumento en la "dosificación" del cóctel seleccione aquellos sustratos que tienen el mayor potencial inhibitorio. Este método sirve como un mecanismo de "filtración" eficaz para identificar una agrupación de sustratos inhibidores del panel original. Esta agrupación final se puede evaluar cinéticamente para sus valores de  $K_i$  (que también son equivalentes al valor de  $K_m$  del sustrato).

#### A. Elección de sustratos de alta y de baja kcat

Del panel completo de sustratos valorados, se elige un grupo (normalmente el 1 % superior) de sustratos con los valores de kcat más altos para componer un "cóctel SUPERIOR", y se elige un segundo grupo (por ejemplo, el 20 % inferior) de sustratos con los valores más bajos de kcat para ensayo como "sustratos INFERIORES". Las elecciones de kcat baja idealmente incluirán sustratos que no se escinden en absoluto. La elección del porcentaje de partida se basa subjetivamente en lo que el investigador determina que es "alto" y "bajo", y se puede modificar en función del resultado de los experimentos. Sin embargo, un punto de partida razonable es elegir sustratos que exhiban valores kcat en el 1 % superior de todos los sustratos seleccionados para sustratos de alta kcat y aquellos que exhiben valores kcat en el 1 % más bajo para sustratos de baja kcat. Como recordatorio, el término "vehículo" se usa para referirse a ese subgrupo de sustratos de baja kcat que puede inhibir la escisión del cóctel SUPERIOR (por lo tanto, estos sustratos se suministran al sitio activo).

Para ilustrar, se supone que el cóctel SUPERIOR contiene, en orden creciente de kcat, los sustratos "v", "w", "x", "y", y "z" (teniendo "z" el valor de kcat más alto). El cóctel INFERIOR (la agrupación inicial de sustratos de baja kcat) puede contener, en orden creciente de kcat, los sustratos "a", "b", "c", "d" y "e", (teniendo "a" el valor de kcat más bajo).

#### B. Análisis de la agrupación inicial

El experimento comienza con un ensayo competitivo del primer sustrato de kcat más baja (es decir, "a") contra el cóctel SUPERIOR, seguido por el segundo sustrato de kcat más baja (es decir, "b"), y así sucesivamente. Las condiciones de ensayo son las identificadas en el ensayo de optimización preliminar. El cóctel SUPERIOR se añade al sustrato de kcat más baja determinada (es decir, "a") en el tampón de ensayo y se le permitió equilibrarse durante un corto periodo de tiempo (aproximadamente 20-30 minutos). Cada uno de los sustratos en el cóctel SUPERIOR debería estar presente a igual concentración. A continuación, se añade la proteasa diana. Todos los sustratos de kcat INFERIOR además de "a" (es decir, "b", "c", "d", "e") se ensayan individualmente y por separado para su potencial para inhibir el cóctel SUPERIOR. La concentración del sustrato de kcat baja ensayado debería ser equivalente a la concentración individual de cada sustrato en el cóctel SUPERIOR, y se recomienda que cada una de estas concentraciones sea al menos de 50 a 100 veces la concentración de la enzima disponible para garantizar condiciones de saturación. Por ejemplo, si el sustrato de baja kcat "a" está presente a 1  $\mu\text{M}$ , cada uno de los sustratos de alta kcat elegidos para el cóctel (es decir, "v", "w", "x", "y", "z") deberían ser 1  $\mu\text{M}$  cada uno en el tampón de ensayo final. Dado que la concentración de la enzima es al menos 100 veces menor (es decir, la concentración enzimática puede ser 1 picomolar), las condiciones de saturación aún se cumplen.

Dado que el sustrato de baja kcat está siendo ensayado como un inhibidor competitivo, su constante de unión se denominará a continuación  $K_i$ , mientras que la afinidad de la enzima para cada sustrato de kcat alta individual en el cóctel SUPERIOR se denominará  $K_{ma}$  (con  $K_{ma}$  = el promedio de valores de  $K_m$  para los sustratos de alta kcat. Nótese que  $K_i$  y  $K_{ma}$  son puramente teóricas y no se calculan en este punto. No es necesario determinar la  $K_i$  real de estos vehículos hasta más tarde, y no es necesario calcular nunca  $K_{ma}$  en absoluto. De hecho, la ausencia de cálculo requerido de  $K_i$  en esta fase en el método es una característica importante que elimina un tiempo y un coste significativos. Dado que tanto el cóctel SUPERIOR como el sustrato de kcat baja ensayado están en cantidades saturantes, se presume que este escenario refleja el Perfil II descrito en los antecedentes donde  $[S] > K_{ma}$ , y de ahí la energía de unión aparente de  $[ES]$  estará por debajo del de  $E + S$ . El objetivo de esta primera parte del proceso es obtener un perfil *relativo* de capacidad inhibitoria por los sustratos de baja kcat. En este contexto no se enfatiza la inhibición cuantitativa. Varios escenarios resultantes son posibles.

*Escenario I. Perfil II con baja concentración de sustrato de kcat baja:* En este escenario, la inhibición de la proteasa diana se observa para varios de los sustratos de baja kcat y un perfil de inhibición para los sustratos de baja kcat se obtiene sin análisis adicional.

*Escenario II. Sin inhibición:* Aunque es improbable, es posible que no se observe ninguna inhibición para ninguno de los sustratos de baja kcat en este ensayo inicial. Sin pretender estar limitados por la teoría, esto podría ser atribuible a los casos inusuales donde la enzima no emplea sus subsitios P3-P1 en su acontecimiento catalítico. Si se obtiene una inhibición insatisfactoria en el primer cribado, se pueden llevar a cabo uno o más de los siguientes tres experimentos (escenarios IIA, IIB y IIC).

*Escenario IIA. Perfil II con baja concentración de sustrato de kcat baja pero número reducido de sustrato de kcat alta en el cóctel:* En este experimento, se mantienen las mismas condiciones de ensayo con respecto a la concentración de sustrato de kcat baja y el cóctel, excepto que el número de sustratos de kcat en el cóctel original se reduce. En otras palabras, se emplea un porcentaje inferior de cóctel INFERIOR tal un 0,1 % o un 0,2 % de cóctel en lugar de un 1,0 % de cóctel INFERIOR. Si esta estrategia tiene éxito, la reducción del número de sustratos de alta kcat en este cóctel dará un perfil de inhibición. Como en el escenario I, es importante "fijar" las concentraciones antes de avanzar a la segunda parte de este proceso (el cribado de dosis secundario).

*Escenario IIB. Perfil II con alta concentración de sustrato de kcat baja.* En este experimento, la concentración de sustrato sigue siendo saturante, sin embargo la concentración del sustrato de kcat baja ensayado aumenta. Un ejemplo de un medio para hacer esto sería emplear la misma concentración del sustrato de baja kcat que el total de todas las concentraciones en el cóctel. Siguiendo el ejemplo indicado anteriormente, si 1  $\mu\text{M}$  estuviera presente en cada uno de los sustratos de alta kcat en el cóctel SUPERIOR para 5 sustratos, la nueva concentración de sustrato de baja kcat puede ser de 5  $\mu\text{M}$ . (De nuevo, la concentración de enzima permanece baja a, por ejemplo, 1 pM). Sin pretender estar limitados por la teoría, se cree que la dinámica browniana puede permitir mayores colisiones entre el sustrato de baja kcat y la enzima incluso a través de las concentraciones de cada sustrato individual en el cóctel todavía son saturantes para la proteasa ( $[S] > K_m$ ) y de acuerdo con perfil II. Nuevamente, si esta estrategia tiene éxito, aumentar las concentraciones de los sustratos de baja kcat dará un perfil de inhibición.

*Escenario IIC. Perfil I con baja concentración de sustratos de alta kcat.* En algunos casos, puede ser preferible desplazar el ensayo a un escenario tipo perfil I donde la concentración de sustrato de cada componente en el cóctel SUPERIOR no sea saturante ( $[S] < K_m$ ). En este caso, la concentración del sustrato de kcat baja ensayado sigue siendo saturante, pero la concentración de cada sustrato de kcat alta en el cóctel se reduce por debajo de la  $K_m$  natural para ese sustrato individual. En esencia, el ensayo se desplazó desde las condiciones de perfil II antes, a un escenario de tipo perfil I. En este caso, la energía de unión aparente de  $[ES]$  será mayor que la de  $E + S$ , lo que aumenta las posibilidades de inhibición por parte del sustrato de kcat baja competitivo, ya que este último aún se encuentra en una concentración saturante y se favorece su unión al sitio activo de la proteasa debido al aumento de la dinámica browniana. De nuevo, las concentraciones se equilibran hasta que se observa un claro patrón de diferenciación (perfil de inhibición) con inhibición aparente por varios de los sustratos de baja kcat.

Cuando finalmente se consigue un perfil de inhibición, los sustratos de baja kcat diferenciados se promueven al cribado secundario (la segunda parte del proceso) para una diferenciación adicional, y los sustratos de baja kcat que no inducen inhibición de la proteasa diana se eliminan de la agrupación de selección. Como se señaló anteriormente, aquellos sustratos de baja kcat que también son inhibidores se denominan en el presente documento "vehículos" ya que de hecho se suministran al sitio activo de la proteasa diana. Dado que  $[S] > K_m$ , es importante "fijar" la concentración de los sustratos de baja kcat (el vehículo) y la concentración de los sustratos de alta kcat para futuras etapas.

### C. Cribado de dosis secundario de vehículos

En este ensayo de cribado, las condiciones se hacen más rigurosas para permitir una mayor diferenciación del potencial inhibidor de cada uno de los vehículos recientemente descubiertos. La concentración de los sustratos de alta kcat en el cóctel SUPERIOR aumenta. Por ejemplo, si se usó un cóctel SUPERIOR al 1 % en el análisis inicial, ahora se prepara un cóctel al 2 % de sustratos de alta kcat que incluye todos los sustratos de II, que se encuentran en el 2 % superior de los valores de kcat. Los experimentos de los inventores han demostrado que aumentar el porcentaje de cóctel aumenta la diferenciación del potencial inhibidor dentro de sustratos de baja kcat (ejemplo 3). Los vehículos promocionados a partir de los cribados iniciales anteriores se ensayan una vez más para determinar la capacidad competitiva de inhibición con los nuevos cócteles. Sus concentraciones deben establecerse inicialmente como idénticas a las que fueron "fijadas" en los protocolos previos. También se mantiene la concentración de cada sustrato de kcat alta en el cóctel. La adición de cada uno de los nuevos sustratos en el nuevo cóctel también debe ser equivalente a la concentración de cada componente en el cóctel al 1 %. En otras palabras, el cóctel debe prepararse como antes, excepto que se añade una concentración igual de los sustratos adicionales a la mezcla. Por ejemplo, si la concentración de cada componente en el cóctel original era de 1  $\mu\text{M}$ , entonces cada nueva adición posterior a la mezcla también debería ser de 1  $\mu\text{M}$ . Si se obtuvo el perfil de inhibición como en uno de los experimentos descritos en el escenario II, las concentraciones iniciales son las mismas que las que fueron "fijadas", excepto que se aumenta el número de componentes del sustrato en el cóctel. Esta estipulación se aplica a los cuatro casos mencionados anteriormente.

En principio, se espera una mayor competencia entre el vehículo y el cóctel al 2 % que entre el vehículo y cóctel al 1 %, ya que una mayor combinación de sustratos de alta kcat favorables está disponible ahora para la proteasa diana para la colisión.

En este punto, un cociente inhibidor del vehículo ( $V$ ) se determina opcionalmente para los vehículos promocionados. Este es igual a la potencia de inhibición  $P$  multiplicada por el mantenimiento de la inhibición  $M$ , de modo que  $V = P * M$ .  $P$  es igual al porcentaje de inhibición en presencia del cóctel superior, y  $M$  es igual al porcentaje de inhibición en

presencia del último cóctel empleado. En este caso, este sería el cóctel al 2 %. Cuanto mayor es el valor de V, mayor es la inhibición. Se ha observado en los experimentos de los inventores (ejemplo 3) que el valor V proporciona un método conveniente para determinar la inhibición como resultado del cóctel. Asignar vehículos a diferentes niveles se vuelve bastante sencillo. Por ejemplo, en el ejemplo 3 se descubrió que los valores V de Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC para la inhibición de la proteasa purificada eran iguales a 0,585, 0,552 y 0,452, respectivamente (usando el primer cóctel para P y el último cóctel para M). Este grupo definió el primer "nivel" de vehículos. En el segundo "nivel", se descubrió que B-VPR-AFC, Z-SY-AFC, Z-RR-AFC y B-LGR-AFC se caracterizaron por valores de V iguales a 0,116, 0,09, 0,09 y 0,07, respectivamente. Una ruptura entre los dos niveles era claramente identificable. La utilidad de esta fórmula es que las clasificaciones se vuelven bastante sencillas, simples y rápidas. También se hace referencia a una medida adicional de "robustez" en el ejemplo 3, aunque se emplea únicamente como una medida cualitativa de la eficacia inhibitoria del vehículo.

Además, se observó en experimentos de los inventores sobre inhibición por parte de vehículos de la proteasa de *T. solium* (ejemplo 2) que los vehículos con menos potencial inhibitorio se marcaron mediante valores V más bajos y, por lo tanto, estaban más inclinados a perder potencial inhibitorio en comparación con los vehículos con altos potenciales inhibidores. Desde un punto de vista cualitativo, también se observó que la robustez de la inhibición era mayor en vehículos con mayor potencial inhibitorio (es decir, M-LY-FMK).

Este cribado proporciona un nivel adicional de diferenciación entre vehículos de kcat baja. Normalmente, se mantiene el mismo perfil inhibitorio relativo de los vehículos que produjeron inhibición superior en el cribado inicial, mientras que los vehículos con menor potencial inhibitorio tienen sus valores de inhibición previos eliminados. Si se realiza esta etapa, los vehículos inhibidores de nivel superior con los valores más altos de V se promueven al cribado de dosis terciario.

#### 25 *D. Cribado de dosis terciario de vehículos*

Siguiendo el ejemplo actualmente en uso, los vehículos que son promovidos desde el cribado de dosis secundario compiten con un cóctel al 3 % por el sitio activo de la proteasa. Los mismos comentarios formulados anteriormente sobre la elección de las concentraciones apropiadas se aplican para este procedimiento de cribado. Se debe hacer una mención sobre los criterios de selección de vehículos. La Inhibición de la escisión de componentes de la proteasa diana en el cóctel de alta kcat es el criterio principal para la selección. Por lo tanto, la importancia insignificante se coloca en este punto en la variable kcat para el vehículo y se coloca más en la capacidad inhibitoria (medida como % de inhibición en este contexto, aunque equivaldrá a Ki baja). Por ejemplo, si "a" y "b" son los sustratos de kcat más baja con "a" teniendo un valor de kcat menor que "b", es muy posible que se elija "b" por su capacidad inhibitoria competitiva respecto a "a", aunque el valor de kcat de "b" fuera más alto que el valor de kcat de "a". De nuevo, las clasificaciones se basan en el porcentaje de inhibición de la escisión por parte de la proteasa diana del cóctel, normalmente determinado por el valor V, y no del valor de kcat. Los sustratos de baja kcat que se usan para la competencia deben permanecer en un porcentaje inferior del cribado de la etapa II, en función de un número arbitrario elegido por el investigador (por ejemplo, el 20 % inferior).

Idealmente, estos valores de kcat serán tan bajos en el cribado de la etapa I que la mayoría de los vehículos con kcat baja tienen valores de kcat similares. El objetivo de este proceso de cribado es identificar los vehículos que se espera que tengan la Ki más baja, independientemente de las diferencias en sus valores de kcat.

#### 45 *E. Cribados de dosis final de vehículos*

Se llevan a cabo cribados de dosis adicionales de vehículos, según sea necesario o deseable. El porcentaje de cóctel de los sustratos de alta kcat se incrementa progresivamente y se añade a los vehículos "promovidos" de las etapas anteriores, lo que permite un medio para eliminar los vehículos con menos potencial inhibitorio. El objetivo es obtener un perfil de datos en el que los mismos vehículos proporcionen patrones de inhibición similares incluso cuando se aumenta la competencia de sustratos altamente escindidos. En otras palabras, aquellos vehículos que inhiben de forma congruente la enzima a pesar del aumento en los componentes del cóctel son vehículos que deberían promoverse como candidatos inhibidores principales. A medida que los cribados continúan con una mayor rigurosidad, los vehículos que fueron inhibidores en etapas anteriores deberían salir del patrón de inhibición y los vehículos más robustos deberían permanecer. Por lo tanto, la adición de cóctel continúa hasta que se alcanza un porcentaje del cóctel que diferenciará y clasificará la capacidad de inhibición del vehículo sin tener que haber determinado realmente Ki.

El investigador detiene los cribados cuando se consigue la confianza de que una lista de vehículos de baja kcat puede clasificarse de forma congruente como inhibitoria de la escisión del cóctel por parte de la proteasa diana. Esta selección se puede llevar a cabo rápida y eficazmente desde un punto de partida original de 8.420 combinaciones totales de vehículos potenciales, si se desea. La lista final es una clasificación de estos vehículos basándose en perfiles de inhibición congruentes en los cócteles al 1 %, 2 %, 3 % y así sucesivamente. El 10 % superior de estos vehículos clasificados (u otro porcentaje arbitrario) se eligen para el cálculo Ki en la siguiente etapa.

#### F. Determinación de valores de $K_i$ para los vehículos más inhibidores

Una vez que se identifica un conjunto manejable de vehículos candidato, la determinación de  $K_i$  puede continuar a través de métodos de modelización cinética convencionales que ya están bien descritos en la técnica. Normalmente, la concentración de inhibidor varía experimentalmente de 0,5 a 5,0 veces  $K_i$  con el fin de obtener un buen valor de  $K_i$ . Por lo tanto, la determinación de la  $K_i$  continúa tratando el vehículo como se haría con un inhibidor y el cóctel y los componentes individuales del cóctel como se haría con un sustrato. La concentración agregada de sustratos debe mantenerse a un nivel de saturación (de 50 a 100 veces  $K_m$ ). Independientemente de si se usa un cóctel o un sustrato de alta  $k_{cat}$  en el cóctel como sustrato de la proteasa, los valores de  $K_i$  para el vehículo como un inhibidor competitivo deben ser similares contra todos los sustratos, ya que  $K_i$  para un inhibidor en una proteasa diana está en función del inhibidor y el sitio activo y es independiente del sustrato.

Se recomienda que la derivación de  $K_i$  continúe mediante ajuste no lineal, aunque también se pueden emplear derivaciones mediante métodos adecuados, tales como Eadie Hofstee, Hanes y Cornish-Bowden, si no se dispone de acceso a modelos informáticos no lineales. Debido a las mayores posibilidades de error de no linealidad aumentada para el primer método e interpretaciones erróneas de datos a bajas concentraciones y baja velocidad para el último método, estos gráficos no se prefieren respecto a los métodos no lineales. También se pueden usar representaciones gráficas secundarias del método de Lineweaver-Burke, pero no se prefiere. Sin embargo, los gráficos clásicos de Lineweaver Burke no se emplean normalmente para estas u otras determinaciones cinéticas en este procedimiento. Un aspecto conveniente de este cálculo es que los valores  $K_i$  determinados para estos inhibidores también son equivalentes al valor de  $K_m$  del vehículo cuando se usa como sustrato.

#### G. Clasificación final

Esta etapa concluye con una clasificación de vehículos inhibidores candidatos. Cuanto menor sea el valor de  $K_i$ , mayor será la clasificación atribuida al vehículo. La determinación de  $K_i$  es la base de la clasificación final. En este punto, el panel inicial de sustratos se ha filtrado a unos pocos candidatos de  $k_{cat}/K_m$  baja que tienen capacidad inhibidora. La ventaja de este enfoque es que la determinación de  $K_i$  puede diferirse hasta que se haya llevado a cabo un esquema de filtración masivo, lo que hace que esta forma de clasificación de los vehículos sea muy ágil.

#### H. Ventaja teórica de la etapa III

Lo siguiente es un breve resumen de las ventajas de esta etapa. Una descripción más elaborada se expuso en la parte I. En primer lugar, el vehículo identificado está marcado por una unión fuerte con  $ES_B$  y  $TS_B$ . El hecho de que sustratos de alta  $k_{cat}$  sean superados por el vehículo habla de la eficiencia con que el vehículo se une no solo a  $ES_B$ , sino también a  $TS_B$ . En segundo lugar, mientras que este vehículo se une con  $TS_B$  y  $ES_B$ , está marcado por una  $k_{cat}$  baja y, por lo tanto, no tiene interacciones con  $TS_R$ . Por lo tanto,  $TS_B$  y  $ES_B$  están efectivamente "separados" de  $TS_R$  en el vehículo, lo que sugiere que el centro de unión y el centro de reacción entre  $ES$  son distintos, como es coherente con un modelo de "sitio dividido". Por lo tanto, la segunda gran ventaja es que la adición experimental de una  $TS_R$  que eleva el resto reactivo en etapas posteriores (etapa VII en adelante) al vehículo es *poco probable que interfiera en las interacciones de unión positivas que comparte el vehículo con  $TS_B$  y  $ES_B$* , ya que la unión y la reacción están "separadas" en el vehículo. En tercer lugar, debido a sus propiedades no catalíticas, no puede reducir  $TS_R$  y, por lo tanto, *no produce una situación que sea contraria a la inhibición*. La cuarta gran ventaja del método es que su simplificación a suposiciones de "sitio dividido", permite un sistema simple en el que la cinética no es muy complicada, el sistema no es tan difícil de estudiar, las predicciones son más eficientes y es más probable la identificación de un inhibidor de proteasa unido y potente.

#### I. Observaciones adicionales

1. *Vehículos de unión lenta*. Los fenómenos de unión lenta se refieren a aquellos inhibidores de vehículo de unión fuerte que no siguen normalmente la cinética de los inhibidores reversibles. En estos casos, el equilibrio se alcanza muy lentamente entre el enzima-inhibidor y la enzima, y por lo tanto se requieren al menos segundos o minutos para observar el estado estacionario. A pesar de su interacción no covalente, las afinidades del inhibidor de unión lenta por la enzima son tan altas que incluso cantidades menores inhibirán la enzima diana. Por lo tanto, un inhibidor unido muy fuertemente tiene una constante de velocidad lenta para la formación de  $[EI]$  lo que significa que una velocidad de inhibición lenta se vuelve obvia en el modelo cinético. Sin embargo, los inhibidores unidos menos fuertemente también pueden mostrar una unión lenta, especialmente si se unen a una velocidad mayor. Los vehículos de unión lenta pueden analizarse mediante varios modelos cinéticos conocidos en la técnica (Szedlacsek y Duggleby, 1995) que, aunque limitados en número, a menudo pueden distinguir este fenómeno.

2. *Unión de sustrato que no implica P3-P1*. Aunque se sabe que los residuos que se unen al sitio activo de una proteasa pueden variar de P5 a P4' (Berger y Schechter, 1970), las posiciones de subsitio P3 a P1 son los candidatos más probables para la unión y, por lo tanto, se eligen inicialmente para el análisis en el método de la invención. Sin embargo, la proteasa diana puede no utilizar los sitios P3-P1 para la unión. Si no se observa inhibición para ningún vehículo, la biblioteca se puede volver a configurar para buscar en sitios que no sean P3-P1. Por ejemplo, el núcleo tripeptídico se puede utilizar para cribar otros tripletes, como sitios P1'-P3 'o sitios P2-P1', etc.

Si es necesario, varias partes diferentes del sustrato pueden cribarse para unión a la biblioteca de sustratos.

### 3. Viabilidad del ensayo.

- 5 a. Si cualquiera de los niveles de sustrato o vehículo debe elevarse a niveles milimolares con el fin de obtener la saturación, entonces los efectos de la fuerza iónica, la unión no específica y la inhibición final pueden provocar resultados cinéticos engañosos.
- 10 b. Una concentración de sustrato de 10 veces Km puede no ser suficiente para la saturación de la enzima. Por lo tanto, se sugiere que cuando se requieren condiciones de saturación como en el caso de obtener un escenario de perfil II, se deben emplear concentraciones de sustrato que sean mayores que 10 veces Km, preferentemente mayores que 50 veces Km, más preferentemente mayores que 100 veces Km.
- 15 c. La contaminación de los reactivos, la inhibición del sustrato o las influencias del estado estacionario también pueden causar efectos no lineales y deben evitarse.
- d. Un sustrato de kcat alta puede servir para activar la enzima (como lo haría un componente activador exógeno) y complicar la interpretación de los resultados cinéticos.
- 20 La etapa III para una mezcla en bruto continúa como lo haría para una proteasa purificada, excepto que se usa Vm en lugar de kcat.

### *Etapa IV: ensayos de inhibición natural*

- 25 En este contexto, los principales vehículos candidatos se ensayan por su capacidad para inhibir la escisión de sustratos naturales. En el ejemplo 4, un vehículo líder para la cisteína proteasa de *T. solium*, suc-Leu-Tyr-AFC se caracterizó por su capacidad para inhibir la escisión natural de proteasa de la IgG humana, como se observó por análisis de transferencia de Western.
- 30 Se elige un sustrato natural del que podría esperarse que fuera una diana para la escisión por la proteasa basándose en la biología de la proteasa diana. Por ejemplo, si la proteasa está ubicada en los lisosomas (por ejemplo, una cisteína proteasa), las moléculas del sustrato diana pueden incluir las que son importadas al lisosoma (por ejemplo, albúmina). Si se sospecha que la proteasa degrada membranas fisiológicas (por ejemplo, actividad colagenasa), se puede elegir colágeno como un sustrato natural. Preferentemente, se utiliza un análisis de espectrometría de masas para el análisis de la reacción de escisión debido a su velocidad. La pérdida de puntos comunes de escisión en el sustrato natural cuando la proteasa está en presencia del vehículo es un signo distintivo de la potencia del vehículo.
- 35 Esta información pretende solamente añadir una dimensión cualitativa adicional a la potencia de los inhibidores clasificados para clientes potenciales, pero no pretende servir como un criterio de selección para la promoción o clasificación de vehículos. Por lo tanto, esta etapa es opcional y debe llevarse a cabo solo cuando el tiempo y los recursos están disponibles.
- 40

### *Etapa V: valoración de vehículos unidos no catalíticamente para identificar propiedades del estado de transición*

- 45 En esta etapa, que es opcional, se examina el núcleo peptídico recién identificado superior para determinar su potencial para participar en la unión del estado de transición: esta propiedad se calibra observando el efecto de modificar la estructura química del cromóforo enlazado y del núcleo peptídico. Si luego se decide emplear el segundo mejor núcleo peptídico u otros núcleos peptídicos, también ellos pueden ser cribados para determinar el carácter del estado de transición. No es probable que el núcleo mismo participe en la unión del estado de transición, dado que el núcleo peptídico tiene una afinidad de unión fuerte y lo más probable es que participe en la reducción de ES únicamente; no obstante, se pueden identificar algunos compuestos que sí participan en TS<sub>B</sub>. Es decir, el núcleo puede formar enlaces que se fortalecen en TS<sub>B</sub>. El proceso para llevar a cabo la evaluación del estado de transición es sustancialmente idéntico al proceso descrito a continuación en la etapa VII (C) y, por lo tanto, los detalles más profundos se dejarán para esa sección. En esencia, el vehículo se trata como si fuera un inhibidor para el cual se conoce Ki, pero kcat es demasiado baja para adaptarse a una kcat/Km exacta. Esta etapa de la invención toma prestados valores de kcat/Km para cada inhibidor y sus mismos análogos de cromóforo en una serie homóloga de péptidos (llamada serie de inhibidores), de los miembros respectivos de la misma serie de péptidos (llamada la serie paralela) vinculados a un cromóforo diferente, donde se sabe que cada miembro de la última serie es al menos ligeramente escindible. Esto permite un gráfico interseries de los valores de Ki del inhibidor trazados contra el Km/kcat análogo respectivo de cada miembro respectivo de la serie paralela.
- 50
- 55
- 60

- En primer lugar, se obtiene o se sintetiza una nueva serie de sustratos análogos que portan un grupo de detección diferente. Por ejemplo, si Z-Leu-Leu-Leu-AFC es el vehículo ensayado, un sustrato análogo podría ser Z-Leu-Leu-Leu-X donde X representa otro grupo de detección lábil (no un reactante inactivador, es decir, a diferencia de la etapa VII) tal como 7-amino-4-metilcumarina (AMC). El nuevo grupo X es, preferentemente, más lábil que el grupo
- 65

florógeno original, y la escisión del grupo X es un acontecimiento detectable. Esta parte del procedimiento es desafiante ya que el núcleo peptídico es, por su naturaleza, no propicio para la catálisis. Tener acceso a una amplia variedad de grupos X cuando se diseña el sustrato análogo es útil, como lo es el acceso a un instrumento de detección muy sensible. En el ejemplo anterior, la X elegida es una que es más escindible de Z-Leu-Leu-Leu que AFC.

En segundo lugar, los residuos individuales en el núcleo peptídico del vehículo y el sustrato recién sintetizado varían para una posición única en el péptido (por ejemplo, para un núcleo Leu-Tyr-AMC, se podría valorar Pro-Tyr-AMC, Phe-Tyr-AMC, Ile-Tyr-AMC, Val-Tyr-AMC, etc., en paralelo con sus análogos de AFC): la teoría es que estas series de análogos sondan el estado de transición. Como se describe a continuación en la etapa VII (C), el log (Ki) del vehículo (los péptidos unidos a AFC en este contexto) se representa frente a los valores logarítmicos (Km/kcat) para los respectivos sustratos análogos correspondientes (los péptidos unidos a AMC en este contexto) que han sido medidos en esta etapa. Preferentemente, el gráfico de interseries contiene una docena o más puntos de datos. Los puntos de datos, que pueden distribuirse de manera difusa en el gráfico, se someten luego a un ejercicio de ajuste de línea para identificar al menos uno, y más habitualmente hasta tres o más líneas rectas coexistentes no idénticas; cada punto puede asignarse a más de una de las líneas identificadas. Se puede usar cualquiera de los diversos algoritmos estadísticos de ajuste de línea; tal como se conocen comúnmente en la técnica. Para cada línea, el valor de regresión, también conocido como el valor de correlación R, se multiplica por la pendiente para obtener la puntuación de estado de transición, usando la siguiente ecuación, como se describe y discute en la etapa VII.

$$TSS_x = R / (ABS(1 - M) * 1 / P) \\ = (R * P) / (ABS(1 - M))$$

donde:

R= valor de regresión

M= pendiente

P = número de puntos en la línea

X = un reactante inactivador seleccionado

El uso de P es opcional, ya que no es crítico para la valoración del mecanismo de inhibición. En casos donde  $m = 1$  (el caso altamente improbable donde se ha identificado la inhibición de la etapa que determina la velocidad), se debe emplear el valor de "0,99" en sustitución de "1", con el fin de evitar la división por 0.

Se espera que la línea con la puntuación más alta del estado de transición sea la que tenga una pendiente más cercana a 1,0, ya que representa la relación ideal entre los análogos del estado de transición para la etapa de corte. Cuanto mayor es la puntuación del estado de transición, mayor es la posibilidad de que se produzca un acontecimiento de unión en el estado de transición del vehículo. Además, si no hay una correlación en el estado de transición, se examinará una correlación en el estado basal. En la etapa V, la mezcla en bruto se trata de manera idéntica a la utilizada para la proteasa purificada, excepto que se emplea Vm en lugar de kcat. En consecuencia, se traza Km/Vm frente a Ki en lugar de kcat/Km frente a Ki.

#### *Etapa VI. Estudio de selectividad de vehículos*

En esta etapa, que es opcional, se examinan los vehículos elegidos superiores por su capacidad para inhibir solamente la proteasa diana en comparación con un panel de otras proteasas dentro de las mismas y diferentes clases mecanicistas de sitio activo. Preferentemente, deberían elegirse diferentes proteasas humanas que representen la totalidad de clases de proteasas, incluyendo cisteína proteasas, serina proteasas, metaloproteasas, aminopeptidasas, proteasas aspárticas, y otras, aunque también pueden usarse paneles más pequeños. Cuanto mayor sea el número de estas proteasas, más versátil será el método. Los sustratos usados en estos ensayos (contra los cuales se ensayan los vehículos superiores) deben ser representativos de la clase de proteasa respectiva. Por ejemplo, Z-Phe-Arg-AFC es un sustrato representativo para cisteína proteasas y Z-Arg-AFC es un sustrato representativo para serina proteasas. Para realizar este ensayo, el vehículo ensayado se configura a una concentración varias veces mayor que su valor de Ki deducido, de modo que inhibe la proteasa diana lo más cerca posible de la inhibición máxima (idealmente del 100 %). Este es un caso de perfil II donde se espera que la energía de unión aparente del complejo vehículo/enzima sea mayor que la energía de la enzima y el vehículo por sí mismos (por lo tanto,  $[I] > K_i$ ). El sustrato para este ensayo se basa en la clase de la proteasa diana identificada. Por ejemplo, si la enzima diana es una cisteína proteasa, Z-Phe-Arg-AFC sería un sustrato adecuado para empleo para este ensayo inicial.

Las condiciones congruentes para la proteasa, el vehículo y las adiciones de sustrato sintético representativo se mantienen de un ensayo a otro. La proteasa es el último componente añadido a la mezcla de ensayo. Se mencionan aquellos vehículos que inhiben selectivamente solamente la proteasa diana y se establece una clasificación de selectividad. Idealmente, la clasificación de selectividad es paralelo a la clasificación de vehículos obtenido de la etapa III.

En cualquier caso, el establecimiento de esta clasificación de selectividad no pretende servir como criterio para

eliminar cualquier vehículo, ya que cada vehículo es solo una parte de la molécula inhibidora final, y dado que la adición de un reactante inactivador a este núcleo peptídico también tiene el potencial de impartir selectividad al vehículo. En cambio, esta etapa sirve como un "punto de control" para proporcionar información de selectividad para el vehículo en este punto en el proceso.

5 *Etapa VII. Síntesis y recogida de combinaciones de vehículo/inactivador de proteasa que forman un vehículo de estado de transición potencialmente "potente"*

10 La etapa VII es opcional, y el protocolo general puede emplearse, por ejemplo, después de la etapa II, en absoluto, o usar análogos no peptídicos de un núcleo peptídico eficazmente inhibidor.

15 En este punto, se ha empleado un criterio de eliminación con el fin de determinar uno o más vehículos de baja  $k_{cat}$ , rápida y eficazmente, que concomitantemente tienen los valores de  $K_i$  más bajos posibles para la unión al sustrato (en el ejemplo de los inventores, utilizando los sitios P3-P1) en el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, estos vehículos exhiben los estados de energía de unión aparente más bajos posibles para las posiciones de unión de la proteasa diana (S3-S1) cuando se complejan con esta. También se ha recopilado cierta información de selectividad mediante las preferencias de los vehículos por la proteasa diana en comparación con un panel de otros sustratos. Además, dependiendo de los resultados del análisis de puntuación del estado de transición en la etapa V anterior, es posible (aunque no necesario) que estos vehículos incluso tengan un carácter de estado de transición parcial y no covalente (que sería especialmente notorio en los casos en que el mecanismo enzimático incluye una gran cantidad de estados de transición intermedios). En cualquier caso, estos sustratos ahora son "vehículos" probados con un bajo estado de energía aparente [EV], una característica que puede explotarse con el fin de diseñar y proporcionar un intermedio reactivo (el "reactante inactivador") que es potencialmente capaz de bloquear el sitio activo de una manera coherente con la inhibición del estado de transición. El reactante inactivador puede unirse a la proteasa diana de forma reversible o irreversible, aunque en muchas aplicaciones es preferible que el reactante inactivador se una irreversiblemente a la proteasa diana. La unión puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, los análogos comunes del estado de transición para cisteína y serina proteasas implican un aducto tetraédrico permanente. El enfoque en esta etapa es, por lo tanto, identificar reactantes inactivadores que pueden impartir carácter de estado de transición a los vehículos de manera que el inhibidor global estará marcado por un valor de  $K_i$  extremadamente bajo. La combinación de vehículo y reactante inactivador en un solo compuesto se denomina en el presente documento un "inactivador de proteasa". Esos inactivadores de proteasa con propiedades del estado de transición se denominarán "inactivadores de proteasa en estado de transición" o TSPI.

35 La elección de qué reactante inactivador enlazar al extremo C del aminoácido P1 en el vehículo es arbitraria, y se basa en si se espera que se conserve o no el mecanismo de la proteasa identificada. Por ejemplo, en casos donde los aductos tetraédricos son importantes como etapas limitantes de la velocidad (por ejemplo, cisteína y serina proteasas), se prefieren las moléculas que tendrán el potencial a través de un ataque nucleófilo o electrófilo (basado en la molécula) para imitar la etapa limitante de la velocidad tetraédrica. En el caso del ejemplo 1, se emplea una fluorometilcetona y vinilsulfona que se espera que produzcan aductos tetraédricos con el sitio activo. No obstante, una gran variedad de excelentes compuestos electrófilos y nucleófilos está disponible en el mercado para unirse al o los vehículos candidatos superiores, tales como fluorometilcetona, clorometilcetona, diazometilcetona, vinilsulfona, epóxido, cetoamida, clorometano, aceptor de Michael, aldehído peptídico, epóxido, acetaldehído, nitrilo, hidroximato, ciclopropenona y epoxisuccinamida. Se pueden obtener de varios proveedores, incluidos Enzyme Systems Products.

45 La selección de un vehículo de unión fuerte en la etapa IV debería disminuir la necesidad de un reactante inactivador altamente reactivo. Esta es una ventaja especial para el diseño de fármacos ya que los reactantes inactivadores altamente activos pueden impartir efectos tóxicos en el sistema fisiológico. Por ejemplo, la fluorometilcetona (FMK) es un reactante inactivador que es importante para la inhibición de la cisteína proteasa diana en el ejemplo 5. Sin embargo, la FMK no se prefiere como parte de un compuesto farmacológico final ya que se sabe que conlleva toxicidad potencial debida a su liberación de metabolitos de fluorocitrato. Por lo tanto, una variedad de reactantes inactivadores, algunos de los cuales son altamente activos y otros que no lo son, deberían incluirse como parte de la mezcla de reactantes inactivadores seleccionados para unirse al vehículo. Se prefiere elegir reactantes inactivadores que no sean altamente reactivos, dado que el núcleo peptídico de unión fuerte ya proporcionará un mecanismo para la inhibición. Es aún más importante elegir inhibidores que son inactivos en ausencia de enzima. También es preferible incluir reactantes inactivadores que inhiban de forma reversible la proteasa, con el fin de aumentar su seguridad en caso de sobredosis o diagnóstico incorrecto. La preocupación fisiológica es que un efecto secundario tóxico, debido a un acontecimiento de unión irreversible, no se puede revertir con un inhibidor competitivo. Este es especialmente el caso para el uso de inhibidores en el tratamiento a largo plazo de enfermedades y trastornos como la osteoporosis, la enfermedad de Alzheimer, el cáncer o la artritis.

65 Sin embargo, varios autores en este campo (McKerrow y col., 1999) han observado que la toxicidad derivada de la inhibición irreversible es menos preocupante cuando se requieren ciclos cortos de tratamiento, como en el caso de las infecciones microbianas. La ventaja de un inhibidor irreversible, por supuesto, es que la modificación del enlace covalente del sitio activo diana es permanente y potente, y por lo tanto no puede superarse. Adicionalmente, la desventaja de la supuesta toxicidad de un inhibidor irreversible tampoco puede ser un problema cuando, como en



este contexto, el modelo de diseño en este contexto está configurado para producir inhibidores altamente específicos y unidos (es decir, el núcleo peptídico es extremadamente selectivo y está fuertemente unido). Además, estos inhibidores deberían ser útiles en dosis bajas, no tóxicas debido a su potencia. Por lo tanto, hay casos en que se prefieren los medicamentos irreversibles y, por lo tanto, esta decisión debe basarse en la fisiología de la enfermedad así como en el metabolismo esperado del inhibidor en el cuerpo. Estos problemas de toxicidad son más acuciantes cuando se optimiza el compuesto en un fármaco más adelante en el canal de descubrimiento de fármacos. Aunque no hay una única respuesta al tipo de inhibidor (es decir, reversible o irreversible) preferido, debe destacarse que la preferencia general en la comunidad científica es por inhibidores reversibles. Sin embargo, debe entenderse en cualquier caso que la invención no está limitada a la elección o reversibilidad relativa de cualquier reactante inactivador particular.

La primera etapa de este procedimiento es enlazar una variedad de reactantes inactivadores con el o los vehículos superiores. La segunda parte del procedimiento determina, para cada inactivador de proteasa recién sintetizado, la concentración de inhibidor requerida para alcanzar el 100 % de inhibición de la proteasa diana ( $CE_{100}$ ), produciendo una lista ordenada de candidatos potenciales a inactivadores de proteasas en estado de transición (TSPI). La tercera parte del procedimiento identifica cuáles de estos candidatos son, de hecho, inactivadores de proteasa en estado de transición (TSPI), y proporciona una lista clasificada final de TSPI. En el caso de que el modo de acción del inhibidor de la proteasa sea la inhibición de un efecto catalítico en el estado basal, se seleccionará el mejor inhibidor de la proteasa en estado basal.

#### A. Enlace covalente de reactante inactivador al vehículo

El enlace del reactante inactivador al vehículo sigue los procedimientos comúnmente implementados de enlace de aminoácidos como se notifica en la técnica de la síntesis orgánica. El reactante inactivador está enlazado normalmente al extremo C del núcleo peptídico, reemplazando al grupo de detección que se había enlazado al vehículo en las etapas anteriores. No existe límite en cuanto a la variedad de reactantes inactivadores que pueden enlazarse a un vehículo superior para generar posibles TSPI; de hecho, cuanto mayor sea la variedad de reactantes inactivadores ensayados, mayor será la posibilidad de desarrollo exitoso de un TSPI. Ensayar más de un vehículo superior también aumenta la probabilidad de un "acierto" exitoso. Sin embargo, cuando los recursos son limitados, es preferible desarrollar una gran biblioteca de compuestos compuesta por el vehículo superior enlazado a cualquiera de los numerosos reactantes inactivadores, en lugar de múltiples bibliotecas de diferentes vehículos usando cualquiera de un número menor de reactantes inactivadores.

En este punto, se ha identificado el vehículo superior para la inhibición que tiene una unión favorable con  $ES_B$  y  $TS_B$ . El enfoque ahora se desplaza a la búsqueda de reactantes inactivadores que son capaces de unirse exclusivamente a  $TS_R$  (o  $GS_R$ ), si la desestabilización del estado basal es el mecanismo para la catálisis). Por lo tanto, la proporción de unión del vehículo debe mantenerse constante, mientras que los reactantes inactivadores se criban para unión a  $TS_R$  (o  $GS_R$ ).

Los dos siguientes ejemplos (situación 1 y situación 2) son ilustrativos. Los vehículos candidatos superiores se clasifican de acuerdo con los criterios de la etapa III. En la situación 1, que se representa en la figura 3, los vehículos de clasificación superior están relativamente cerca en composición de aminoácidos. Este es el caso más habitual, ya que se esperaría una homología significativa en los sitios activos de los vehículos más activos, especialmente si se cribaran todos los 8.420 aminoácidos. En la situación 2, hay una gran variación en el núcleo peptídico de aminoácidos entre los vehículos de clasificación superior.

#### Vehículos de clasificación superior de la etapa III

Situación 1	Situación 2
1. Z-LLL-AFC	1. Z-LLL-AFC
2. Z-LLY-AFC	2. Z-VPR-AFC
3. Z-LLW-AFC	3. Z-LLW-AFC
4. Z-LLR-AFC	4. Z-VPP-AFC
5. Z-VLL-AFC	5. Z-PVV-AFC
6. Z-LLP-AFC	6. Z-PVL-AFC

Z-LLL-AFC se elige como el núcleo peptídico primario. Z-LLL estaría luego enlazado a cada uno de un número muy alto de reactantes inactivadores a su vez. El resultado es una serie de compuestos que tienen un núcleo peptídico homólogo (es decir, los mismos aminoácidos en el mismo orden) pero diferentes reactivos inactivadores. Si hay recursos disponibles, es preferible tener varias docenas de reactantes inactivadores diferentes, cada uno enlazado a una copia del núcleo peptídico. Opcionalmente, este mismo procedimiento se puede aplicar al segundo vehículo de clasificación más alta con el fin de aumentar las posibilidades de descubrir un potente inactivador de proteasas. El resultado para la situación 1 usando cinco reactantes inactivadores diferentes U, V, W, X, Y y Z es el siguiente:

Lista de enlazados más preferidos para la situación 1 (sin clasificar)	Lista de enlazados preferidos siguientes para la situación 1 (sin clasificar)
--	---

Z-LLL-U	Z-LLY-U
Z-LLL-V	Z-LLY-V
Z-LLL-W	Z-LLY-W
Z-LLL-X	Z-LLL-X
Z-LLL-Y	Z-LLY-Y
Z-LLL-Z	Z-LLY-Z

5 Para la situación 2, el segundo mejor núcleo peptídico de vehículo (Z-VPR-) podría derivatizarse además del mejor núcleo peptídico, Z-LLL, si se desea. El número total de permutaciones para cada vehículo de clasificación superior refleja el número de reactantes inactivadores que están siendo ensayados. Los ejemplos de estas combinaciones que se ensayarán en la situación 1 incluyen Z-Leu-Leu-Leu-fluorometilcetona, Z-Leu-Leu-Leu-vinilsulfona y Z-Leu-Leu-Leu-cetoamida.

*B. Ensayos de inhibición para determinar inactivadores candidatos de proteasa en estado de transición*

10 Una vez que se sintetizan los inactivadores de proteasa, se ensayan las concentraciones a las que inducen el 100 % de inhibición de la proteasa diana ( $CE_{100}$ ) y se clasifican en consecuencia. El cóctel SUPERIOR que se empleó en la etapa final de selección de vehículos de la etapa III se emplea como fuente de competencia para los inhibidores. El resultado es una clasificación de los inactivadores de proteasa en estado de transición candidatos con los inactivadores de proteasa de más alta clasificación que tienen los valores  $CE_{100}$  más bajos, es decir, el inactivador  
15 que sigue siendo efectivo a las concentraciones más bajas es el mejor en la clasificación. El proceso incluye las siguientes etapas.

20 *Etapla uno: cribado inicial.* Cada inactivador de proteasa se incuba en primer lugar con el cóctel SUPERIOR de sustratos de alta kcat que proporcionó la diferenciación final de los vehículos en la etapa III. Por ejemplo, si se empleó un cóctel de kcat alta al 7 % en los cribados finales de la etapa III, es conveniente usarlo como la fuente de partida de la competencia en este contexto. El inactivador de proteasa se incuba a una concentración igual a la concentración de cada componente individual de sustrato de kcat alta en el cóctel. Los controles positivos y negativos se establecen como se describe en el ejemplo 5, y el % de inhibición se calcula en consecuencia.

25 *Etapla dos: estudios de dilución del inhibidor y determinación de  $CE_{100}$ .* Es posible (aunque improbable) que se pueda establecer una clasificación de inhibidores en este punto de partida arbitrario siempre que al menos uno de los inactivadores de proteasa inhiba la proteasa diana en un 100 %. En ese caso, ese inhibidor es el inhibidor de clasificación superior seguido por inhibidores que tienen potenciales inhibidores más bajos (o los valores de  $CE_{100}$  más bajos). Sin embargo, es más probable que numerosos inhibidores inhiban la proteasa diana al 100 % a las  
30 concentraciones seleccionadas. En ese caso, la concentración de cada uno de esos inactivadores de proteasa se reduce hasta que se pueda determinar una  $CE_{100}$ . Por ejemplo, los incrementos de dilución de 10 veces son un buen punto para comenzar, pero el grado de dilución queda a discreción del investigador. El resultado del ensayo es una lista de candidatos clasificados de inactivadores de proteasa. Los inhibidores de clasificación más alta en esta etapa son los que tienen la  $CE_{100}$  más baja. Es decir, exhiben una inhibición completa de la proteasa a la concentración de  
35 inhibidor más baja.

Lista de  $CE_{100}$  más preferidas para la situación 1

1. Z-LLL-X
2. Z-LLL-Y
3. Z-LLL-Z
4. Z-LLL-U
5. Z-LLL-V
6. Z-LLL-W



Lista de  $CE_{100}$  preferidas siguientes para la situación 1

1. Z-LLY-V
2. Z-LLY-W
3. Z-LLY-X
4. Z-LLY-U
5. Z-LLY-Z
6. Z-LLY-Y

40 *Etapla tres: determinación de  $K_i$  del inhibidor y modo de inhibición, y reclasificación según  $K_i$ .* Ahora se determina la  $K_i$  para los inactivadores de proteasas de clasificación superior (es decir, aquellos con los valores de  $CE_{100}$  más bajos). Esta es una etapa lenta, y queda a discreción del investigador decidir cuántos compuestos candidatos deberían promoverse a esta etapa. De hecho, una de las ventajas más significativas de este método es que difiere el cálculo de  $K_i$  a un punto "tardío" en el método, cuando ya se ha producido un cribado sustancial, reduciendo de este modo el número de inhibidores candidatos con respecto a los cuales es necesario realizar este cálculo.

45 Las concentraciones de inhibidor son preferentemente al menos de 0,5 a 5 veces la  $K_i$  con el fin de determinar el valor de  $K_i$ . Cualquiera de los sustratos del cóctel con alta kcat o el cóctel completo puede emplearse en esta etapa, ya que la  $K_i$  del inhibidor de la enzima es la misma independientemente del sustrato. Sin embargo, se recomienda que  $K_i$  se determine de forma independiente usando al menos 3 sustratos independientes con el fin de tener confianza en el cálculo. El ajuste no lineal o el gráfico de Dixon pueden emplearse para determinar la  $K_i$  de los  
50 inactivadores de proteasas de clasificación superior. Tal como se describió en la etapa III, las derivaciones de Eadie

Hofstee, Hanes, Cornish-Bowden y las representaciones gráficas secundarias de los métodos de Lineweaver Burke no se recomiendan para los valores de determinación de  $K_i$  respecto al ajuste no lineal. Los gráficos directos de Lineweaver Burke no deben usarse para la determinación de  $K_i$ . Si el tiempo no es limitante, las constantes de velocidad de pseudo-primer orden ( $K_{app}$ ) se pueden valorar a partir de pendientes de tiempo frente al gráfico del registro natural del porcentaje de actividad restante. Finalmente, se construye un gráfico usando Eadie Hofstee o Hanes para determinar el modo de inhibición.

Estos métodos se emplean para valorar el tipo de inhibición, es decir, inhibición competitiva, no competitiva, incompetitiva o irreversible. De acuerdo con los procedimientos realizados hasta ahora, se espera que el modo de inhibición sea competitivo o irreversible, pero alternativamente podría operar mediante mecanismos incompetitivos o no competitivos. La decisión sobre el modo preferido para la inhibición debe ser tomada por el investigador, basándose en el objetivo fisiológico del fármaco diana tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, los tratamientos a largo plazo pueden requerir el uso de inhibidores reversibles menos tóxicos, mientras que los tratamientos a corto plazo pueden utilizar los inhibidores irreversibles más potentes. Por lo tanto, esta etapa puede ser útil para determinar qué tipo de inhibición candidata se prefiere. El método para determinar la inhibición irreversible es bien conocido en la técnica. Los inactivadores de proteasa se reclasifican en este punto, por lo que aquellos con la  $K_i$  más baja se convierten en los inactivadores de proteasas de clasificación superior. En la mayoría de los casos, un valor  $CE_{100}$  bajo se correlacionará con un valor de  $K_i$  bajo. Por lo tanto, la clasificación resultante puede ser la misma que la obtenida en los cálculos de  $CE_{100}$ , o puede ser ligeramente diferente y, por lo tanto, la determinación del valor de  $K_i$  es opcional, ya que se puede deducir del valor de  $CE_{100}$  calculado. En casos raros, la clasificación de  $K_i$  es significativamente diferente de la clasificación de  $CE_{100}$ , y debido a esa posibilidad, la determinación y clasificación de  $K_i$  son las etapas preferidas.

Nuevamente es importante enfatizar que solamente es necesario llevar a cabo estos ensayos para inhibidores candidatos que representan el único vehículo SUPERIOR enlazado a diferentes reactantes inactivadores (por ejemplo, los compuestos "más preferidos" para la situación 1, que tienen el núcleo peptídico SUPERIOR, LLL, como su núcleo peptídico). La investigación del segundo vehículo de clasificación superior (compuestos "siguiente preferido" para la situación 1, LLY es el núcleo peptídico) es opcional.

Volviendo a la ilustración de los inventores, se supone que los valores de  $K_i$  se determinaron para los 3 compuestos superiores en las listas de  $CE_{100}$ . El resultado típico del experimento es que se obtiene la lista idéntica. Aunque es poco probable que la actividad de  $CE_{100}$  se desvíe de la clasificación de  $K_i$ , se prefiere realizar la valoración de todos modos debido a la complicación por diversas variables cinéticas. Los inhibidores de clasificación más alta tienen la  $K_i$  más baja.

Lista de  $K_i$  más preferidas para la situación 1

1. Z-LLL-X
2. Z-LLL-Y
3. Z-LLL-Z



Lista de  $K_i$  preferidas siguientes para la situación 1

1. Z-LLY-V
2. Z-LLY-W
3. Z-LLY-X

### C. Determinación de inactivadores de proteasa en estado de transición (TSPI)

De forma mecanicista, los inactivadores de proteasa candidatos superiores inhiben la conformación de la enzima que corresponde al estado de transición del sustrato o inducen la inhibición en la geometría de la enzima que complementa el estado basal del sustrato. El mecanismo de inhibición depende completamente de la enzima específica, como ya se describió en la sección de teoría. Los inhibidores candidatos se valoran en primer lugar por su potencial como análogos del estado de transición, proporcionando de ese modo un criterio de selección adicional (es decir, carácter de estado de transición) a partir del cual se seleccionan los inactivadores de proteasa candidatos superiores. Se emplea una "puntuación de estado de transición" para valorar la inhibición del estado de transición. Si el mimetismo del estado de transición resulta ser su modo de inhibición, los inactivadores de la proteasa candidatos se refinan para una potencia aún mayor en la inhibición del estado de transición. Por lo tanto, el proceso ofrece la oportunidad de un ajuste fino a nivel molecular para identificar inhibidores que imitan de manera más potente un estado de transición e inhiben la actividad enzimática lo más cerca posible de la etapa que determina la velocidad. Preferentemente, se identifican inactivadores de proteasas que inhiben la enzima en la etapa que determina la velocidad.

Para evaluar el carácter de estado de transición, se valora la correlación entre la potencia de inhibición por los inactivadores de proteasa y la eficacia de escisión de una serie cogenérica de vehículos sustituidos de forma análoga. Esta correlación ha sido bien documentada en la técnica. Si se observa una correlación, sugiere que las energías de unión de la interacción enzima-ligando pueden emplearse para impulsar la inhibición de una manera similar a la empleada para impulsar la catálisis. En otras palabras, las características mecánicas responsables de la hidrólisis del sustrato, por un lado, y la inactivación enzimática por el inhibidor, por el otro, pueden ser similares.

Volviendo a la situación 1 en el ejemplo ilustrativo, Z-LLL-X se clasificó como el compuesto inhibidor de elección más

alto basándose en su valor de  $K_i$ . Este compuesto con la clasificación más alta se selecciona para un análisis posterior y se convierte en el compuesto "original". El objetivo es analizar el carácter del estado de transición del reactante inactivador fijado a Z-LLL, que en este ejemplo es "X". Sin pretender estar limitado por ninguna teoría o mecanismo en particular, se desea que el reactante inactivador eleve  $TS_R$  en el estado de transición, y no afecte a  $ES_R$  en el estado basal. De acuerdo con la creencia de que las interacciones de Z-LLL del núcleo peptídico ahora se conservan en  $ES_B$  y  $TS_B$ , ya se ha observado una excelente capacidad de unión (como lo demuestra el bajo valor de  $K_i$ ). Además, este núcleo tiene la ventaja adicional de que no está unido no catalíticamente y, por lo tanto, no se espera que reduzca  $TS_R$  (lo que contrarrestaría la potencia del reactante inactivador). Para confirmar este hecho, se realizan las siguientes etapas para determinar si el reactante inactivador (X) induce la inhibición en el estado de transición ( $TS_R$ ) sin interacción con el estado basal. El ensayo de los reactantes inactivadores clasificados segundo y tercero (es decir, Y y Z en el ejemplo de la situación 1) también se puede realizar, si se desea.

*Etapas:* clasificación de inactivadores de proteasa en estado de transición

15 1.  $K_i$  para el inhibidor original y  $k_{cat}/K_m$  para el vehículo original

El inhibidor superior y sus vehículos análogos se denominarán ahora "inhibidor original" y "vehículo original". Por ejemplo, en la situación 1 del ejemplo ilustrativo, el vehículo original es Z-LLL-AFC y el inhibidor original es Z-LLL-X.  $K_{cat}$ ,  $K_m$  y  $V_m$  para el vehículo ya fueron determinadas usando métodos cinéticos convencionales tal como se describió en la etapa III.  $K_i$  se determinó para los inactivadores de proteasa en la etapa VII (B). Como se ha destacado anteriormente, se prefiere el ajuste no lineal a los métodos de Eadie Hofstee, Hanes, Cornish-Bowden y representaciones gráficas secundarias de Lineweaver-Burke, y los gráficos directos de Lineweaver Burke no se recomiendan para calcular  $K_{cat}$ ,  $K_m$  y  $V_m$ . Por ejemplo, si el vehículo superior es Z-Leu-Leu-Leu-FMK, entonces se determinan la  $k_{cat}$ ,  $K_m$  y  $V_m$  para Z-Leu-Leu-Leu-AFC (dado que AFC es el grupo de sustrato fluorométrico congénico). La  $K_i$  de Z-LLL-FMK ya se ha determinado por la etapa VII (B) anterior.

2. Construcción de un perfil de  $K_m/k_{cat}$  frente a  $K_i$  y un perfil de  $K_m/k_{cat}$  frente a  $K_m$  para inhibidores de proteasa análogos estructuralmente y sus vehículos

30 Los perfiles cinéticos se desarrollan con adaptaciones. Aunque se prefiere una biblioteca de 8420 vehículos que contienen grupos cromóforos para los ensayos en las etapas II y III, es más económico sintetizar los inhibidores correspondientes (que contienen funcionalidades de inactivación en lugar de cromóforos) solo según sea necesario. Por lo tanto, en ausencia de la "biblioteca 8420" paralela completa de inhibidores, las permutaciones de los inhibidores mejor promovidos se seleccionan y desarrollan tal como se describe a continuación. El principio es producir un grupo sistemáticamente variado de núcleos peptídicos a partir del cual identificar las características relacionadas con TS a través de ejercicios de regresión lineal en gráficos de datos cinéticos.

Los inhibidores caracterizados por sustituciones de un solo aminoácido frente al inhibidor original se sintetizan junto con vehículos idénticamente sustituidos si no existen ya. Aunque es preferible en el núcleo elegir sustituciones de monoaminoácidos, se permite una sustitución más extensa siempre que sea igual en el inhibidor y el vehículo. Los pares de inhibidor/vehículo contienen sustituciones en la posición idéntica de la parte peptídica del inhibidor y el vehículo. En la situación 1 del ejemplo ilustrativo, si "X" para el vehículo superior era FMK, de modo que el inactivador de proteasa superior después de la clasificación de  $K_i$  era Z-Leu-Leu-Leu-FMK, entonces los ejemplos de pares de inhibidor/vehículo sustituidos de forma conservativa incluyen Z-Leu-Leu-Tyr-FMK/Z-Leu-Leu-Tyr-AFC, Z-Phe-Leu-Leu-FMK/Z-Phe-Leu-Leu-AFC y Z-Leu-Pro-Leu-FMK/Z-Leu-Pro-Leu-AFC. Los ejemplos de pares de inhibidor/vehículo sustituidos de forma no conservativa incluyen Z-Leu-Leu-Arg-FMK/Z-Leu-Leu-Arg-AFC, Z-Leu-Lys-Leu-FMK/Z-Leu-Lys-Leu-AFC y Z-Asp-Leu-Leu-FMK/Z-Asp-Leu-Leu-AFC. La expresión "de forma no conservativa" refleja en este contexto permutaciones que pueden introducir diferencias considerables en el comportamiento del núcleo peptídico análogo con respecto al núcleo peptídico original, por ejemplo, reemplazando un residuo de aminoácido relativamente no polar en un péptido original con un residuo de aminoácido mucho más polar.

Después de que se han sintetizado, se determina  $K_i$  para estos inactivadores de proteasa análogos si no se conoce ya.  $K_{cat}$ ,  $K_m$  y, opcionalmente,  $V_m$  se determinan para los vehículos relacionados. Estos valores se representan gráficamente en la siguiente etapa y se usan para determinar el carácter de estado de transición del inhibidor original. El objetivo final de esta parte del método es determinar si el inhibidor original (en la situación 1, esto es Z-LLL-X) está inhibiendo específicamente en el estado de transición (presumiblemente, elevando  $TS_R$ ). Para cada reactante inactivador, por ejemplo X, se debe sintetizar un número suficiente de pares de inhibidor/sustrato para que pueda construirse una línea aceptable en el análisis de regresión lineal.

60 Al determinar qué sustituciones de aminoácidos realizar para generar los pares inhibidor/análogo de vehículo óptimos, el investigador puede guiarse por la información recopilada previamente sobre el inhibidor original y compuestos relacionados.

Caso 1: la elección se realiza basándose en inhibición de vehículo anterior

65 Es posible que, tras la revisión de los resultados de los datos de inhibición del vehículo, se descubran "motivos" de

inhibición similares. Esto se ilustra usando el ejemplo más preferido de la situación 1, donde Z-LLL-X es el inactivador de proteasa (inhibidor original) y Z-LLL-AFC es el vehículo original. Los datos muestran varios vehículos que fueron clasificados como altos y diferían del original por un solo aminoácido. Este es un caso óptimo, pero también es probable considerando la conservación en la unión. Los emparejamientos análogos se construyen basándose en esa lista. Por ejemplo, si LLY-AFC, LLW-AFC, LLR-AFC, VLL-AFC y LLP-AFC fueran inhibidores y ocuparan una clasificación alta en la lista de vehículos, se utilizarán para las sustituciones. De hecho, en este caso, parece que L es preferido en P2.

Los siguientes parámetros cinéticos se determinarían en esta etapa:

Kcat/cm para:	Ki para:
a. LLL-AFC	LLL-X
b. LLY-AFC	LLY-X
c. LLW-AFC	LLW-X
d. LLR-AFC	LLR-X
e. LLV-AFC	LLV-X
f. LLP-AFC	LLP-X
g. LLV-AFC	LLV-X
h. LLQ-AFC	LLQ-X
i. LLT-AFC	LLT-X
j. LLS-AFC	LLS-X
k. LLT-AFC	LLT-X
l. LLM-AFC	LLM-X
m. LLG-AFC	LLG-X
n. LLE-AFC	LLE-X

#### *Caso 2: se usan indicios para elegir las sustituciones*

La revisión de los datos del vehículo no puede producir una lista en la que solo haya una diferencia de aminoácidos. En ese caso, los datos del vehículo anteriores deben estudiarse con más profundidad. Por ejemplo, si se observa que L ocupa un lugar destacado en P2 en la mayoría de los vehículos con carácter inhibitor, entonces L se empleará en P2. Si también se observa que V en P1 tiene un efecto inhibitor, esta puede ser una sustitución que se intentaría (por ejemplo, Z-VLL-AFC y Z-VLL-X). De forma similar, si se observó que R en P3 proporciona inhibición en la lista de vehículos, entonces se empleará un emparejamiento similar (por ejemplo, Z-LLR-AFC y Z-LLR-X).

#### *Caso 3: no hay indicios disponibles a partir de la lista de vehículos*

En este caso, las sustituciones son completamente a discreción del investigador. Se pueden hacer sustituciones en cualquiera o todas las posiciones del vehículo de unión. Estas sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas, pero es preferible comenzar con cambios conservativos (por ejemplo, aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófobos o aminoácidos polares por aminoácidos polares).

#### *Caso 4: Truncamiento*

También puede ser deseable ensayar pares de inhibidor/vehículo dipeptídicos o núcleos peptídicos de un solo aminoácido. Por ejemplo, pueden emplearse Z-LL-AFC y Z-LL-X en la situación 1 del ejemplo ilustrativo.

*3. Determinación de si los reactantes inactivadores son inhibidores en el estado de transición o el estado basal: gráficos de  $\log(K_i)$  del inhibidor frente a  $\log(K_m/k_{cat})$  del vehículo, y  $\log(K_i)$  del inhibidor frente a  $\log(K_m)$  del vehículo*

Para la clase de compuestos inhibidores (derivados de un único original) que contienen un reactante inactivador particular, el  $\log(K_i)$  del inhibidor se representa gráficamente frente al  $\log(K_m/k_{cat})$  de su vehículo relacionado. Opcionalmente, también se prepara un gráfico de  $\log(K_i)$  del inhibidor frente a  $\log(K_m)$  del vehículo. Preferentemente, uno de cada uno de estos gráficos se construye para cada reactante inactivador individual analizado.

Por ejemplo, en la situación 1 del ejemplo ilustrativo, la clasificación de  $K_i$  mostró a Z-LLL-X, Z-LLL-Y y Z-LLL-Z como los primeros, segundos y terceros inhibidores. Por lo tanto, cada uno de ellos podría servir como un inhibidor original. Suponiendo que Z-LLL-X es el primer inhibidor original que se examinará (siendo Z-LLL-AFC el vehículo original), que los pares análogos de inhibidor/vehículo se sintetizaron como se ha descrito anteriormente (es decir, pares de inhibidor/vehículo) Z-LLY-X/Z-LLY-AFC, Z-LLW-X/Z-LLW-AFC, Z-LLR-X/Z-LLR-AFC, Z-VLL-X/VLL-AFC y Z-LLP-X/Z-LLP-AFC), y que las constantes cinéticas se calcularon, el  $\log(K_i)$  del inhibidor se representa gráficamente contra el  $\log(K_m/k_{cat})$  para los vehículos para cada uno de los pares en el mismo gráfico,

obteniéndose información sobre el carácter potencial de estado de transición de los inhibidores que contienen X como el reactante inactivador. Del mismo modo, se puede representar gráficamente  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$  para los vehículos para valorar el carácter potencial de estado basal de los inhibidores que contienen X como reactivo inactivador. Es decir, se realizan dos gráficos para reactante inactivador X: (1)  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/K_{cat})$  y (2)  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$ .

Opcionalmente, podrían construirse gráficos adicionales para reactantes inactivadores Y y/o Z, usando Z-LLL-Y/Z-LLL-AFC y pares de inhibidor/vehículo estructuralmente análogos, y Z-LLL-Z/Z-LLL-AFC y pares estructuralmente análogos, respectivamente, para valorar el carácter de estado de transición y/o estado basal de los inhibidores que contienen Y y/o Z.

En este punto, se realiza una valoración general de si el reactante inactivador para el inhibidor original de interés está actuando o no para inhibir como inhibidor del estado de transición o como inhibidor del estado basal. Tal como se describió previamente en la sección de antecedentes, las enzimas pueden emplear desestabilización del estado basal o estabilización del estado de transición (o una combinación) para impulsar la catálisis. Un inhibidor efectivo con baja  $K_i$  puede unirse al estado de transición de la enzima o al estado basal de la enzima, dependiendo de qué modo de catálisis use la enzima. Debe quedar claro ahora que el método de la invención supone que el modo de catálisis para la proteasa (es decir, estabilización del estado de transición, desestabilización del estado basal, o ambas) no se conoce de antemano. De hecho, una importante fortaleza del método es que esta información se obtiene y se capitaliza empíricamente durante la puesta en práctica del método.

Para determinar el mecanismo mediante el cual funciona el reactivo inactivador, se realiza una regresión lineal en cada gráfico y se realiza una comparación simple del valor de R (es decir, la métrica de correlación de línea estadística) entre los dos gráficos. Si el valor de R es mayor para el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/K_{cat})$ , entonces los inhibidores que contienen el reactante inactivador inhiben la actividad de proteasa actuando sobre el estado de transición. Por el contrario, si el valor de R es mayor para el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$ , entonces los inhibidores que contienen el reactante inactivador inhiben la actividad proteasa al actuar sobre el estado basal. Suponiendo que la correlación es mayor para el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/K_{cat})$  (es decir, interacción del estado de transición, que es el caso típico), la puntuación del estado de transición se calcula como se describe inmediatamente a continuación. Si, en cambio, el valor de R es mayor para el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$ , la inhibición del estado basal está en funcionamiento y el investigador debería pasar a la "etapa tres" a continuación, que analiza adicionalmente la inhibición del estado basal.

Es probable que el modo de inhibición sea el mismo siempre que el componente del núcleo peptídico de los inhibidores sea idéntico. Por ejemplo, los inhibidores originales de baja  $k_{cat}$  Z-LLL-Y y Z-LLL-X actuarán normalmente como inhibidores del estado de transición o como inhibidores del estado basal. Como entre los dos modos de inhibición, la inhibición del estado de transición es más probable ya que se ha descubierto que los bajos valores de  $K_i$  están asociados con la inhibición del estado de transición con mayor frecuencia que con la inhibición del estado basal.

Aunque es poco probable, sigue siendo posible que los inhibidores que incluyen X como el reactante inactivador, por ejemplo Z-LLL-X y sus inhibidores estructuralmente análogos que contienen X, puedan tener una mejor correlación para el gráfico del estado de transición (es decir,  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/K_{cat})$ ) que la gráfica del estado basal (es decir,  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$ ), mientras que los inhibidores que contienen los mismos vehículos pero incluyen Y como reactante inactivador, es decir, Z-LLL-Y y sus inhibidores estructuralmente análogos podrían tener una mejor correlación para el gráfico del estado basal que el gráfico del estado de transición. Se predice que Z-LLL-X actuará como un inhibidor del estado de transición y pasará a la siguiente etapa del proceso a continuación. Por otro lado, se predice que Z-LLL-Y actuará como un inhibidor del estado basal y pasaría a la "etapa tres" a continuación. Surge la pregunta: si solamente se buscará un reactante inactivador, se debe buscar el inhibidor del estado de transición Z-LLL-X (o uno de sus análogos), o se debe buscar el inhibidor del estado basal Z-LLL-Y (o uno de sus análogos). Una opción es buscar siempre el inhibidor del estado de transición. Sin embargo, la práctica preferida es buscar el inhibidor que tenga el valor de  $K_i$  más bajo, ya sea inhibidor del estado de transición o inhibidor de estado basal. Si Z-LLL-X tiene un valor de  $K_i$  menor que Z-LLL-Y, se prefiere que Z-LLL-X se promueva a la siguiente etapa. Por otro lado, si Z-LLL-X tiene un valor de  $K_i$  más alto que Z-LLL-Y, Z-LLL-Y debe buscarse con preferencia a Z-LLL-X debido a su valor de  $K_i$  más bajo. La razón fundamental para elegir buscar el reactante inactivador que produce el compuesto original con el valor de  $K_i$  más bajo (en contraposición a la elección basada simplemente en el mecanismo de inhibición) es que los inhibidores de  $K_i$  más baja son más potentes. Como resultado, en el contexto del diseño del fármaco, el inhibidor de  $K_i$  más baja permite usar dosificaciones más bajas de manera efectiva. Además, la unión fuerte reflejada en la  $K_i$  inferior también implica un cierto nivel de selectividad.

#### 4. Determinación de la puntuación del estado de transición para un reactante inactivador

Si se busca la inhibición del estado de transición, se puede determinar la puntuación del estado de transición (TSS) para el reactante inactivador que caracteriza al inhibidor basándose en el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/K_{cat})$  para el inhibidor y sus análogos estructurales, como se ha detallado anteriormente. Se espera que los inhibidores con un alto carácter de estado de transición sean altamente específicos y potentes para el sitio activo de la proteasa

diana, así como demuestran cierta selectividad, al menos en principio. La potencia de la inhibición es una característica adicional que se incorpora en la "puntuación del inhibidor" final para inhibidores particulares, como se explica en detalle más adelante.

5 La fórmula para TSS refleja tres propiedades importantes de la inhibición del estado de transición. En primer lugar, un reactante inactivador que imparte buen carácter de estado de transición al inhibidor original (y análogos estructurales que contienen el mismo reactante inactivador) se caracteriza por un alto valor de R para una regresión lineal realizada en el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/k_{cat})$  para el inhibidor original y sus análogos estructurales (todos contienen el mismo reactante inactivador). Un alto valor de R implica que las energías de unión de interacción de enzima-ligando se pueden emplear de una manera mecanicista similar para impulsar la inhibición a medida que se emplean para impulsar la catálisis. Esto significa que existe una "complementariedad" eficaz entre el inhibidor y el estado de transición al que se está uniendo. En segundo lugar, la regresión lineal realizada para el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/k_{cat})$  produce una línea con una pendiente M cercana a 1,0. Esto implica que una modificación estructural produce el mismo cambio incremental de energía de unión en un inhibidor que en el estado de transición. En consecuencia, los puntos de datos del inhibidor del estado de transición que corresponden a una línea con una pendiente más cercana a 1,0 en un gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/k_{cat})$  tienen un carácter del estado de transición más alto. En la situación final donde la pendiente = 1,0, los inhibidores pueden realmente unirse a una conformación enzimática que corresponde a la etapa de determinación de la velocidad. En tercer lugar, la línea debe tener tantos puntos como sea posible, con el fin de aumentar la confianza estadística. Todos estos atributos se incorporan en la puntuación del estado de transición para un reactante inactivador X particular ( $TSS_X$ ) que se calcula mediante la fórmula:

$$TSS_X = R / (ABS(1-M) * 1/P) \\ = (R * P) / (ABS(1-M))$$

25

donde:

R = valor de regresión

M = pendiente

P = número de puntos en la línea

30

X = un reactante inactivador seleccionado

El uso de P es opcional, dado que no es crítica para la valoración del mecanismo de inhibición.

35 En casos donde  $M = 1$  (el caso altamente improbable donde se ha identificado inhibición de la etapa que determina la velocidad), debe emplearse el valor de "0,99" en sustitución de "1", con el fin de prevenir la división por 0.

40 Como un ejemplo de esta puntuación del estado de transición, si se representaron gráficamente 6 puntos, la línea que mejor se ajusta usando la mayoría de esos puntos es la que se usará. Si se desea, se pueden emplear programas estadísticos para determinar la línea que mejor se ajusta. Aquellos puntos que se usaron para componer la línea representan inactivadores de proteasa en estado de transición. Los puntos que se desvían sustancialmente de la línea para reducir la puntuación se eliminan y se consideran no inhibidores del estado de transición. Por ejemplo, en la figura 3 el punto "e" representado por Z-LLV-AFC/Z-LLV-X está desactivado en la parte superior izquierda del diagrama de flujo, y por lo tanto no se considera que sea un inhibidor del estado de transición. Por lo tanto, es importante señalar que la puntuación del estado de transición es atribuible a una serie particular de reactantes inactivadores. En otras palabras, el reactante inactivador "X" ha sido cribado para su capacidad para unirse al estado de transición del vehículo respectivo. Se deduce que todos los inhibidores reflejados en el gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/k_{cat})$  para X (siempre que no hayan sido descartados en el cálculo de regresión lineal) tienen la misma puntuación del estado de transición  $TSS_X$ .

50 Por ejemplo, dado que Z-LLV-X, Z-LLL-X, Z-LLY-X son parte de la serie de reactantes inactivadores "X", estos inhibidores comparten, todos, la misma puntuación del estado de transición. Del mismo modo, si Z-LLV-Y, Z-LLL-Y, Z-LLY-Y son parte de la serie de reactantes inactivadores "Y", entonces todos estos inhibidores compartirán la misma puntuación del estado de transición  $TSS_Y$ . Una vez que se ha llevado a cabo esta diferenciación entre dos o más reactantes inactivadores, se pueden comparar inhibidores originales que tienen los mismos núcleos peptídicos pero diferentes reactantes inactivadores. Para continuar con el ejemplo, si la serie "X" tiene una puntuación del estado de transición más alta que la serie "Y", entonces una comparación entre los inhibidores originales Z-LLL-X y Z-LLL-Y dará como resultado la conclusión de que Z-LLL-X tiene un carácter del estado de transición más elevado que Z-LLL-Y. Nótese también que inhibidores individuales *dentro de cada* serie de reactantes inactivadores (es decir, inhibidores con diferentes núcleos peptídicos pero el mismo reactante inactivador que, por definición, se caracterizan por la misma TSS) pueden compararse y clasificarse, si se desea, determinando puntuaciones de inhibidor individuales, tal como se detalla a continuación.

65 El investigador puede ajustar la rigurosidad que desea tener en la puntuación del estado de transición. Cuanto mayor es la rigurosidad de la TSS, mayor es la confianza que se deposita en la capacidad de unión del estado de transición del reactante inactivador. Preferentemente, la TSS es al menos aproximadamente 22,5, más preferentemente al menos aproximadamente 97. Por ejemplo, si se decide que se necesita una TSS mínima de 100,

la regresión lineal se realizará solo sobre ese subconjunto de puntos que produce una TSS de al menos 100. Debe entenderse que la puntuación del estado de transición de un gráfico puede aumentarse solamente sacrificando puntos en el gráfico (por ejemplo, eliminando valores atípicos) para aumentar el valor de regresión, R, también conocido como el valor de correlación. Sin embargo, reducir P, el número de puntos, funciona en contra del esfuerzo  
 5 *reduciendo* la TSS, aunque en una cantidad menor. Si se eliminan demasiados puntos, P puede volverse tan baja que la confianza en la regresión lineal desaparezca. En ese punto, puede ser necesario sintetizar y ensayar más inhibidores o reducir la rigurosidad. El número de puntos utilizados para calcular la TSS es preferentemente al menos 5, más preferentemente al menos 8. La TSS final refleja un equilibrio entre una regresión lineal realizada con  
 10 demasiados puntos (el caso donde no hay suficiente confianza en la capacidad de unión del estado de transición de los inhibidores) y una regresión lineal realizada con muy pocos puntos (el caso donde la confianza estadística en la línea está en cuestión). Una docena o más de puntos de datos son aceptables y pueden ser preferidos.

#### 5. Determinación de puntuaciones del estado de transición para los siguientes mejores reactantes inactivadores.

15 Como se ha destacado anteriormente, gráficos del estado de transición preferentemente se construyen posteriormente para la siguiente mejor serie de reactantes inactivadores. Para ilustrar en el ejemplo de los inventores, Z-LLL-Y fue el inactivador de proteasa con la segunda mejor clasificación. En consecuencia, ahora, Z-LLL-Y sirve como original, y las desviaciones sobre su tema se hacen de manera similar a como se ha descrito anteriormente. El resultado es que la puntuación del estado de transición ahora se puede asignar al original Z-LLL-Y  
 20 y su serie modificada. De esta manera, la puntuación del estado de transición de Z-LLL-Y se puede comparar con la puntuación del estado de transición de Z-LLL-X, que anteriormente se clasificó más alto. Si la puntuación del estado de transición de Z-LLL-Y es mayor que la puntuación de Z-LLL-X, Z-LLL-Y se clasificará más alta que Z-LLL-X, aunque se clasificará más abajo en la lista clasificada por  $K_i$ .

25 A continuación, puede construirse un gráfico del estado de transición para el tercer mejor inactivador de proteasa. En el ejemplo de los inventores, este sería Z-LLL-Z. A continuación se compara con los otros reactantes inactivadores que se cribaron previamente, y así sucesivamente.

30 Se pueden construir muchos gráficos del estado de transición. *El objetivo en este contexto es determinar qué reactantes inactivadores (por ejemplo, X, Y o Z) están inhibiendo eficazmente con el núcleo peptídico unido no catalíticamente (Z-LLL), en TSR.* Eventualmente se consigue una gran lista de resultados del estado de transición. Es totalmente posible que se descubra una variante de inactivador de proteasa que tenga una puntuación del estado de transición más alta que el original que estaba siendo ensayado. Se compone una lista de resultados. Aquellos reactantes inactivadores que tienen las puntuaciones más altas reciben la clasificación más alta.  
 35

*Construcción de gráficos para la situación 1, los siguientes vehículos más preferidos.* Dependiendo del tiempo y los recursos, el procedimiento anterior se puede realizar en los siguientes vehículos más preferidos de la situación 1 (figura 3a). En el caso de la ilustración de los inventores, el proceso se llevaría a cabo en Z-LLY-V.

#### 40 6. Determinación de puntuaciones individuales del inhibidor del estado de transición

Después de que se ha calculado la TSS, se puede determinar una puntuación de inhibidor "I" para cualquier inhibidor dado. La puntuación de inhibidor incorpora la característica de "potencia" del inhibidor, como se refleja en la  $K_i$  para cualquier inhibidor dado, para complementar la puntuación del estado de transición determinada  
 45 previamente. Aunque una alta puntuación del estado de transición implica alta especificidad y selectividad para el sitio activo de la proteasa diana, no implica con tanta fuerza la potencia del acontecimiento de inhibición, aunque generalmente la tendencia en la técnica es que los inhibidores del estado de transición tiendan también a ser muy potente. Dos inhibidores pueden tener un alto carácter del estado de transición, pero no necesariamente serán igualmente potentes. Cuanto mayor sea el valor de "I" para un inhibidor, más alta será la clasificación del inhibidor.  
 50 Nótese que la puntuación de inhibidor "I" también se puede calcular para un inhibidor del estado basal, tal como se explica en la "etapa tres" a continuación.

La puntuación de inhibidor un inhibidor de transición ( $I_{TS}$ ) puede calcularse de la siguiente manera:

$$55 \quad I_{TS} = \log (TSS/(K_i)).$$

La puntuación de inhibidor "I" puede usarse para diferenciar entre varios tipos de inhibidores. Por ejemplo, tal como se ha aludido anteriormente en la descripción del cálculo de TSS, la puntuación de inhibidor puede diferenciar entre inhibidores individuales que son parte de la misma serie de reactantes inactivadores y que, en consecuencia, tienen  
 60 la misma TSS. Cada uno de estos, a su vez, también puede considerarse un potencial candidato a TSPI. Por ejemplo, "I" se puede usar para diferenciar la capacidad del inhibidor entre Z-LLL-X, Z-LLY-X y Z-LLV-X, siempre que  $K_i$  sea diferente para cada uno de los inhibidores, mientras que TSS no puede (dado que TSS es la misma para cada uno de estos). Además, "I" se puede usar para diferenciar entre inhibidores que tienen el mismo valor de  $K_i$  siempre que tengan diferentes resultados del estado de transición. En este caso, el inhibidor con el mayor valor de  
 65 "I" será el que tenga el mayor carácter del estado de transición (según lo determinado por TSS). Por ejemplo, si Z-LLL-X y Z-LLL-Y tienen una  $K_i = 1 \times 10^{-10}$ , pero Z-LLL-X tiene una TSS más alta, entonces Z-LLL-X producirá un valor



de "I" más alto que Z-LLL-Y.

Es importante destacar que "I" también se puede usar para diferenciar entre inhibidores con diferentes valores de Ki y diferentes valores de TSS. Claramente, cuando un inhibidor caracterizado por un alto carácter del estado de transición (un sello distintivo de un buen inactivador de proteasa) y un valor bajo de Ki (otro sello distintivo de un buen inactivador de proteasa) se compara con otro inhibidor (caracterizado por un carácter del estado inferior de transición y un valor de Ki más alto), la fórmula para calcular "I" fuerza el resultado de que el inhibidor anterior tiene un valor "I" más alto y se clasifica por delante de este último. Comparar Z-LLL-X y Z-LLL-T en la tabla siguiente para ver un ejemplo de esta situación.

Ejemplo: parámetros cinéticos para diversos inhibidores

Valor	Z-LLL-X	Z-LLL-Y	Z-LLL-U	Z-LLL-W	Z-LLL-T
R	0,95	0,90	0,99	0,99	0,90
m	0,98	0,89	0,99	0,99	0,89
p	10	5	10	5	10
TSS	475	40,9	990	990	40,9
Ki	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$
I	12,6	11,6	11,9	10,9	7,6

Por otro lado, un inhibidor puede caracterizarse por una TSS alta pero también por un alto valor de Ki (evidenciando una unión más floja), mientras que otro inhibidor se caracteriza por una Ki más baja (unión más fuerte), pero también una TSS más baja. El cálculo del valor "I" para cada uno de estos inhibidores permite compararlos directamente. Dependiendo de las magnitudes relativas de los respectivos valores de TSS y Ki, "I" podría ser mayor para un inhibidor o para el otro. Por ejemplo, Z-LLL-U en la tabla anterior tiene una muy alta puntuación del estado de transición (990), pero un valor de Ki ligeramente mayor ( $10^{-9}$ ) que Z-LLL-Y (TSS = 40,9; Ki =  $10^{-10}$ ). En este caso, el valor de "I" de Z-LLL-U (11,9) es mayor que el valor de "I" de Z-LLL-Y (11,6), y por lo tanto Z-LLL-U tiene una clasificación más alta que Z-LLL -Y. Se puede observar que el carácter del estado de transición del inhibidor predomina en este sistema *siempre que la diferencia entre los valores de Ki no sea mayor que un factor de aproximadamente 10*.

De este modo, en este contexto, cuando la diferencia entre los valores de Ki es mayor que un factor de 10, el valor de Ki se cobra más importancia como una medida de la capacidad de inhibición que el carácter del estado de transición. Este caso se ilustra mediante una comparación entre Z-LLL-W (TSS = 990; Ki =  $10^{-8}$ ) y Z-LLL-Y (TSS = 40,9; Ki =  $10^{-10}$ ). Aunque Z-LLL-W tiene una puntuación del estado de transición significativamente mayor que la puntuación del estado de transición para Z-LLL-Y, su alto valor de Ki (Ki =  $10^{-8}$  para Z-LLL-W frente a Ki =  $10^{-10}$  para Z-LLL-Y) hace que tenga un valor de "I" menor que Z-LLL-Y (I = 10,9 para Z-LLL-W e I = 11,6 para Z-LLL-Y). Por lo tanto, Z-LLL-Y tiene una clasificación más alta que Z-LLL-W. *En general, Ki comienza a predominar sobre la puntuación del estado de transición cuando los valores de Ki entre dos inhibidores difieren en un factor mayor a 10*. Debe entenderse que la ecuación usada para calcular "I" no es invariable, sino que puede ser ajustada por el investigador, según se desee, para dar más o menos peso a la Ki en comparación con la TSS. Por ejemplo, podría aplicarse un coeficiente al numerador (TSS) o al denominador (Ki) de la relación TSS/Ki para alterar los pesos relativos de las dos variables. El objetivo de la puntuación de inhibidor es servir como un eficaz instrumento de diferenciación cuantitativa para comparar inhibidores marcados por diferencias en sus capacidades de unión y su carácter del estado de transición.

**Clasificaciones finales.** El resultado de los procedimientos anteriores es que se realiza una clasificación final de inhibidores. Preferentemente, los inhibidores que tienen los valores de "I" más altos son promovidos a la siguiente etapa. La justificación para esto es que el valor de "I" clasifica los inhibidores que tienen la combinación más óptima de carácter del estado de transición y unión potente. Como alternativa, el investigador puede clasificar inhibidores basándose únicamente en la puntuación del estado de transición, que no incorpora el valor de Ki. Esto podría hacerse cuando el carácter del estado de transición es la característica más deseable, por ejemplo, en un diseño de fármaco particular. Por supuesto, cuando los inhibidores se clasifican usando solo TSS, los inhibidores individuales dentro de una serie de reactantes inactivadores tienen, todos, la misma puntuación del estado de transición y, por lo tanto, no serán diferenciables a menos que se valores también alguna otra característica.

**Etapa dos: Ajuste fino de inactivadores de proteasa en estado de transición**

Este procedimiento puede llevarse a cabo en casos donde los recursos económicos y el tiempo están disponibles. El inactivador de proteasa del estado de transición superior se ajusta finamente para obtener inhibición aún más cerca de la etapa que determina la velocidad.

**1. Permutaciones estructurales del reactante inactivador**

En esta etapa, el núcleo peptídico del TSPI se deja sin cambios, pero se emplean permutaciones de la parte del reactante inactivador y los compuestos inactivadores resultantes se analizan para la puntuación del estado de

transición. Por ejemplo, si Z-Leu-Leu-Leu-FMK se clasifica como el TSPI más alto, se utiliza una variante del grupo del reactante inactivador (FMK). Si se desea, se puede preparar una biblioteca combinatoria basándose en el reactante inactivador (en este caso, FMK) y se pueden emplear muchas permutaciones de la estructura original de FMK para el cribado del estado de transición. Los cambios estructurales introducidos por la química combinatoria pueden ser finos o groseros. Por ejemplo, en el caso de la FMK, un cambio potencial podría implicar la sustitución del átomo de flúor con un átomo de cloro, o incluso una alteración más sutil como un cambio en la estereoquímica de la estructura. El objetivo es descubrir la estructura que produzca la puntuación más alta del estado de transición. En principio, este inhibidor debe estar lo más cercano posible a la etapa que determina la velocidad de la proteasa diana. De este modo, se obtiene una nueva biblioteca de TSPI.

## 2. Modificación estructural del vehículo

En esta etapa, se emplea el mismo procedimiento que anteriormente, excepto que se refina la parte del vehículo (es decir, el núcleo peptídico) del inactivador de la proteasa del estado de transición. La parte de reactante inactivador del TSPI permanece constante. Por lo tanto, se emplea un enfoque combinatorio para refinar los vehículos. Esto se puede hacer de muchas maneras. Las modificaciones pueden incluir la sustitución de un D-aminoácido por un L-aminoácido, la sustitución de otros aminoácidos y otros cambios estructurales. De nuevo, el objetivo es mejorar la puntuación del estado de transición del TSPI.

### Etapa tres: Identificación y clasificación de inactivadores de proteasa en estado basal (GSPI)

Como se ha destacado anteriormente, se puede descubrir que algunos inactivadores de proteasa inhiben la proteasa en el estado basal y no en el estado de transición. Los inhibidores con una correlación más fuerte (según lo determinado por R) entre  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$  en comparación con su correlación en  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/k_{cat})$  se promueven a esta etapa. Este procedimiento analiza inactivadores de proteasa en estado basal (GSPI) en el caso de que los inactivadores de proteasa de  $K_i$  baja identificados en la etapa VII no produzcan inhibidores de estado de transición razonables, según lo determinado por una buena puntuación de inhibidor.

Cada proteasa tiene un mecanismo exclusivo para la catálisis. Históricamente, se pensaba que los inhibidores con bajos valores de  $K_i$  actuaban en el estado de transición de la proteasa porque es aquí donde se esperan las interacciones cooperativas clásicas de Pauling. Sin embargo, como se destacó en la introducción, la investigación ha demostrado que un mecanismo significativo para la catálisis por parte de algunas proteasas también puede incluir la desestabilización del estado basal como un medio para reducir la energía de reacción libre catalítica. A veces, este mecanismo puede ser aún más importante que la reducción de la energía en el estado de transición. Los inhibidores con bajos valores de  $K_i$  pueden estar actuando inhibiendo un estado basal en aquellas proteasas en las que la desestabilización del estado basal sirve como modo de acción para la catálisis.

Por consiguiente, si los inactivadores de proteasa de baja  $K_i$  identificados en etapas anteriores no parecen ser inhibidores del estado de transición, pueden valorarse y diferenciarse, de acuerdo con el presente método, para su potencial inhibidor del estado basal. La puntuación del estado basal  $GSS_x$  para una serie particular de inhibidores que contiene el reactante inactivador X se obtiene de una manera idéntica a la puntuación del estado de transición para una serie particular de reactantes inactivadores excepto que se toma del gráfico de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m)$  en lugar de  $\log(K_i)$  frente a  $\log(K_m/k_{cat})$ . La puntuación del estado basal es, por lo tanto:

$$GSS_x = R / (ABS(1-M) * 1/P)$$

donde:

R = valor de regresión

M = pendiente

P = número de puntos en la línea

X = un reactante inactivador seleccionado

En este contexto P es opcional por las mismas razones que es opcional para la  $TSS_x$ . Una puntuación del estado basal más alta equivale a un reactante inactivador más potente. La puntuación de inhibidor "I" para un inhibidor del estado basal (es decir,  $I_{GS}$ ) también se calcula de forma análoga al cálculo de la situación de inhibición del estado de transición. Específicamente, la puntuación de inhibidor del estado basal es:

$$I_{GS} = \log(GSS/ABS(K_i))$$

Los mismos argumentos presentados anteriormente para la puntuación de inhibidor en relación con la puntuación del estado de transición, también se aplican a la puntuación del estado basal. Una vez más, generalmente es preferible usar la puntuación de inhibidor como el método para clasificar los inhibidores de estado basal.

### Aplicación de la puntuación de inhibidor para análogos escindibles

Las fórmulas anteriores ( $TSS$ ,  $GSS$ ,  $I_{TS}$  e  $I_{GS}$ ) también se pueden aplicar a inactivadores que están enlazados a

sustratos altamente escindibles. El método de enlazar inactivadores a sustratos altamente escindibles ya es bien conocido en la técnica. Sin embargo, el uso de los sistemas de puntuación anteriores para identificar y optimizar inactivadores que interactúan con energías de estado de transición o estado basal es novedoso.

5 *Etapas cuatro: ajuste fino de inactivadores de proteasa en estado basal*

Las modificaciones estructurales del inactivador de proteasas modelo se realizan como se ha descrito anteriormente en la etapa dos, y los compuestos resultantes se ensayan para una puntuación de estado basal mejorada. En primer lugar, el reactante inactivador se modifica estructuralmente manteniendo la parte del vehículo constante para deducir el reactante inactivador modificado que produce la puntuación de estado basal más alta. En segundo lugar, la parte del vehículo del inactivador de proteasa se modifica estructuralmente para obtener la puntuación de estado basal más alta. Nuevamente, este procedimiento es opcional y se lleva a cabo cuando el tiempo y los recursos están disponibles.

15 *Etapas cinco: caracterización de inhibidores finales*

Los inhibidores finales se caracterizan preferentemente usando diversos métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen la dependencia del tiempo de la inactivación, la observación de la cinética de saturación, la protección del sustrato, los ensayos de irreversibilidad y la medición del número de sitios de inhibidor fijados a la enzima. Las constantes de velocidad de pseudo primer orden ( $K_{app}$ ) pueden valorarse a partir de la pendiente del tiempo frente al  $\ln$  del porcentaje de actividad restante. Las representaciones gráficas secundarias de  $1/K_{app}$  frente a  $1/I$  proporcionarán  $K_i$  y  $K_2$ .

25 *Revisión de las ventajas teóricas de la etapa VII*

La ventaja de esta etapa es que se identifica un resto reactivo, para la adición al vehículo, con lo que dicho resto reactivo parece reaccionar exclusivamente en TSR. Como se describió anteriormente, dado que los centros de unión y de reacción son bien distinguidos por el vehículo, no se espera que el resto reactivo interfiera en las interacciones de unión favorables que están presentes en el vehículo. Además, se espera que la eficacia del aumento de TSR causado por el resto reactivo se potencie sustancialmente porque el vehículo no participa en la reducción de TSR, ya que es no catalítico.

*Advertencias*

35 Sin pretender estar sujetos a ninguna teoría particular, se observa que se hacen varias suposiciones para los cálculos anteriores. Como ya se sabe en la técnica, se toman medidas experimentales para garantizar que estas suposiciones sean válidas. En los casos en que no lo son, se utilizan los métodos experimentales factibles que están publicados en la técnica para corregir las suposiciones que son violadas.

40 *Suposición 1.*  $K_m$  corresponde a la constante de disociación del sustrato,  $K_s$ . Por lo tanto, es importante que las etapas de asociación o disociación no jueguen un papel limitante de la velocidad para los sustratos elegidos.  $K_m$  contiene información de unión, pero es fundamentalmente una constante cinética que se mide por definición en condiciones de estado estacionario y no en equilibrio.  $K_m$  se aproximará a la constante de disociación del sustrato solamente cuando exista una etapa lenta. Además, si el sustrato está unido con alta afinidad y la renovación es muy rápida,  $K_m$  puede no reflejar la constante de disociación verdadera, y etapas distintas de la producción intermedia del estado de transición (por ejemplo, intermedios tetraédricos en cisteína y serina proteasas) pueden ser parcial o completamente limitantes de la velocidad. En caso de que el vehículo esté tan fuertemente unido, su constante de inhibición puede no ser susceptible de cálculo en condiciones de estado estacionario. Además, la inestabilidad hidrolítica del vehículo también puede significar que la afinidad de unión no puede determinarse en condiciones de equilibrio, ya que a concentraciones del vehículo que permiten actividad enzimática residual, la velocidad a la que el inhibidor se asocia con la enzima es más lenta que la velocidad a la que se hidroliza.

*Suposición 2.* La enzima es estable durante el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio con el inhibidor.

55 *Suposición 3.* Las variaciones introducidas de aminoácidos en el vehículo son independientes de la energía de los centros de reacción del sustrato del sitio activo.

60 *Suposición 4.* Los valores de  $K_{cat}/K_m$  reflejan la misma etapa que determina la velocidad en toda la serie de sustratos. Por lo tanto, la constante de velocidad para la transformación no catalizada con enzimas del sustrato al producto no cambia para la serie y esta misma etapa química comprende el estado de transición para cada uno de los sustratos usados en la correlación.

*Suposición 5.* Los fenómenos de unión lenta deben tenerse en cuenta al evaluar los resultados cinéticos.

65 *Suposición 6.* Si el vehículo se une demasiado fuertemente, puede ser difícil determinar la  $K_i$ .

*Suposición 7. Problemas de laboratorio. Se aplican las mismas posibilidades de error que las que se describieron en la sección de advertencias de la etapa III.*

La etapa VII para una mezcla de proteasa en bruto procede como para una proteasa purificada, excepto que  $V_m$  se emplea como un sustituto de  $k_{cat}$ , ya que se desconoce la concentración de la proteasa. El gráfico de estado de transición apropiado es, entonces,  $K_i$  frente a  $K_m/V_m$ . Dado que no se conoce en la técnica ninguna referencia para este procedimiento para una mezcla en bruto, la correlación puede estar más dispersa de lo que estaría para una proteasa purificada. En este caso, la puntuación de estado de transición puede necesitar ser más liberal para una sopa en bruto de lo que sería para una proteasa purificada.

#### *Etapa VIII. Ensayos de sustrato natural*

Si se desea, los principales TSPI o GSPI candidatos se analizan por su capacidad para inhibir la escisión de sustratos naturales *in vitro*, en cultivo celular, y/o *in vivo*. Esta información ayuda a caracterizar los inhibidores, pero no pretende servir como un criterio de selección para la clasificación final.

Se selecciona un sustrato que se espera que sea una diana de escisión natural para una proteasa particular. Por ejemplo, si la proteasa se aísla de los lisosomas (por ejemplo, una cisteína proteasa), entonces las moléculas de sustrato diana pueden incluir las que se importan al lisosoma, tales como albúmina. Si se espera que la proteasa degrade las membranas celulares, se puede elegir colágeno como un sustrato natural. La escisión se puede analizar usando espectroscopía de masas o análisis de transferencia de Western, por ejemplo. La potencia del inhibidor está determinada por su capacidad para impedir la escisión del sustrato. Una mezcla en bruto se trata de manera idéntica a una proteasa purificada.

#### *Etapa IX. Ensayo de escisión diferencial para identificar TSPI o GSPI que son selectivos para la proteasa diana*

Esta etapa proporciona datos de selectividad para los TSPI y GSPI de clasificación alta identificados hasta el momento. Tal como ya se ha mencionado, la selectividad es una característica importante de un fármaco inhibidor de proteasa, ya que este es, preferentemente, capaz de inhibir la proteasa diana del patógeno pero incapaz de inhibir proteasas generales del huésped humano o no humano. Para evaluar la selectividad, los controles y las configuraciones del ensayo apropiados son similares a los descritos previamente en la etapa VI. Los inhibidores se evalúan por su capacidad para inhibir las proteasas del huésped en la misma clase mecanicista que la proteasa diana, así como por su capacidad para inhibir otras proteasas del huésped. Idealmente, los inhibidores se ensayan en una amplia variedad de proteasas del huésped. Los TSPI o GSPI preferidos inhiben la proteasa diana pero no las otras proteasas. La valoración de la selectividad del inhibidor en esta etapa del proceso es útil porque estos TSPI y GSPI candidatos representan compuestos casi "finales". Sin embargo, estos compuestos pueden modificarse aún más, y estas modificaciones posteriores pueden alterar la selectividad. Por lo tanto, la ejecución de esta etapa, aunque importante, sigue siendo opcional, y puede o no servir como criterio de selección para una nueva clasificación de la lista de TSPI o GSPI. Como mínimo, esta etapa sirve para verificar el grado de selectividad que el TSPI o GSPI de clasificación alta exhibe para la proteasa diana. En otros casos, esta etapa puede utilizarse como una herramienta para volver a clasificar los compuestos en la lista de TSPI o GSPI. La mezcla en bruto se trata de manera idéntica a una proteasa purificada en esta etapa.

#### *Etapa X. Refinamiento adicional de TSPI y GSPI de clasificación alta*

El o los compuestos inactivadores de proteasa de partida se pueden refinar adicionalmente, si se desea, ensayando variaciones estructurales adicionales del compuesto. Debe entenderse que las modificaciones estructurales de los TSPI de cualquier tipo se pueden realizar, y los compuestos resultantes se pueden ensayar, en cualquier fase del proceso, sin limitación. Sin embargo, el refinamiento estructural normalmente se hace más económicamente más tarde en el proceso que más temprano. Los ejemplos de refinamientos adicionales incluyen los siguientes procedimientos.

*Adición de uno o más aminoácidos al núcleo peptídico para interactuar con subsitios enzimáticos adicionales.* En este método, se añaden uno o más aminoácidos a las posiciones N-terminales y/o C-terminales (subsitios P o P') del inactivador de proteasa, y la actividad del compuesto resultante se compara con la del compuesto original para determinar si el nuevo compuesto es un inhibidor más potente (y/o más selectivo) de la proteasa diana. Por ejemplo, la extensión de un inactivador de proteasa tripeptídico tal como Leu-Leu-Leu-FMK puede incluir la adición de uno o más de los 20 aminoácidos naturales en P4 del compuesto original y, adicionalmente, P5 si se desea.

*Modificación estereoquímica.* Las composiciones estereoquímicas de los aminoácidos del subsitio P-P' pueden modificarse (por ejemplo, cambiando un estereoisómero D a un estereoisómero L o viceversa). Las permutaciones quirales del reactante inactivador también se pueden considerar, si son posibles.

#### *Etapa XI: Construcción de una biblioteca combinatoria en el armazón del compuesto de partida*

Una vez que se ha identificado un TSPI o GSPI de partida, la molécula final se puede usar como un armazón para

una biblioteca combinatoria. La construcción de la biblioteca combinatoria es un procedimiento estándar y está bien referenciado en la técnica. Por ejemplo, se descubre que Z-LLL-FMK era un compuesto de partida como resultado de los experimentos de los inventores con la cisteína proteasa de *Taenia solium* (ejemplo 8). Este compuesto se puede emplear luego como la molécula original para las permutaciones combinatorias para potenciar el efecto

5 inhibidor. Además, este procedimiento permite la identificación y optimización de las partes del inhibidor que se caracterizan por la relación estructura biológica/actividad de manera que los aminoácidos en el inhibidor original ya no formen parte de la molécula final. Esta es una consideración importante, ya que se esperaba que los aminoácidos sean metabolizados fácilmente por el cuerpo y, por lo tanto, es poco probable que lleguen a convertirse en compuestos finales de fármacos.

10 *Etapa XII: Cristalización de la proteasa diana y modelización por ordenador*

En los casos en los que se ha identificado un inhibidor para la proteasa o para una mezcla en bruto, puede ser deseable cristalizar la proteasa con su inhibidor y llevar a cabo refinamientos adicionales del descubrimiento de fármacos usando algoritmos de modelización por ordenador. Este proceso de refinamiento es conocido en la técnica e incluye, pero no se limita a, la utilización de relaciones de actividad-estructura cuantitativas tridimensionales (QSAR) que incluyen análisis de campo molecular comparativo y QSAR bidimensionales que incluyen QSAR de holograma molecular y determinaciones de valores propios para determinar una hipótesis farmacofórica del TSPI o GSPI de partida, y el análisis de acoplamiento de los TSPI de partida con estructuras diana, incluidas las funciones de energía potencial suave, espacial, basada en rejilla y los programas de acoplamiento, incluidos los algoritmos Monte-Carlo, Ligand-Pile Up y Probe.

20 *Etapa XIII: adición de moléculas de suministro*

Una vez que se ha finalizado el compuesto de partida, se pueden añadir moléculas de suministro al compuesto, que incluyen potenciadores de partición aceite-agua a compuestos de partida candidatos. Una molécula de suministro es un sustituyente o molécula asociada independiente que potencia la permeabilidad de una molécula de fármaco a través de las membranas, preferentemente sin reducir la eficacia farmacofórica de las otras propiedades del fármaco.

30 **Ejemplos**

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

35 *EJEMPLO 1: Determinación de condiciones ambientales óptimas para escisión por la cisteína proteasa de Taenia solium purificada y la mezcla en bruto de Taenia solium ("etapa P", la etapa preliminar)*

*Determinación de las condiciones óptimas para la cisteína proteasa de Taenia purificada*

40 Se purificó una cisteína proteasa de la pared de un quiste de *Taenia solium* a partir de la pared del quiste. Los detalles de esa actividad de purificación y caracterización de la cisteína proteasa se relatan en la patente WO 00/63350 (publicada el 26 de octubre de 2000). En esta etapa, el pH exacto y las condiciones ambientales para permitir la catálisis óptima del sitio activo para esta cisteína proteasa se determinaron mediante el método de la invención con un pH de 4,9 con el requisito de cisteína 10 mM. La temperatura de incubación óptima para la actividad fue de 37 °C.

*Determinación de las condiciones óptimas para preparación de la "mezcla en bruto".*

Se empleó una mezcla en bruto de quistes de *Taenia solium* congelados en seco. Aunque ya se conocían los parámetros de actividad óptima de la cisteína proteasa purificada, se deseaba determinar nuevamente la actividad óptima a partir de una nueva "mezcla", para determinar cuáles eran esas condiciones y para obtener la confianza de que eran similares. Debido a las numerosas proteasas en esta mezcla, la atención brindada para obtener el entorno catalítico operacional óptimo para la cisteína proteasa diana fue especialmente crítica. Cuanto más "ajustado finamente" sea el entorno determinado, mayor es la posibilidad de que se reduzca el número de proteasas que están activas dentro de esa región ambiental. No obstante, cuando se determinen las condiciones ambientales para la escisión óptima de una batería de sustratos, aún existía la posibilidad de que existan isoformas de la proteasa o incluso más de una proteasa de manera óptima en las condiciones dadas. Sin embargo, incluso en el caso de que exista más de una proteasa a un nivel óptimo para una condición ambiental dada, aún era posible y probable que los mecanismos bioquímicos en el acontecimiento catalítico siguieran algún patrón conservado. Esto se basa en el hecho de que la escisión por más de una variedad de proteasa sería óptima en las condiciones ambientales específicas solamente debido a mecanismos bioquímicos similares dentro del sitio activo. De hecho, ya se observó una conservación significativa en el nivel de sitio activo para diferentes clases de proteasas.

65 Sin embargo, sin un análisis en profundidad, fue imposible valorar si dos o más variedades de proteasas en un ambiente específico tenían un mecanismo completamente conservado en común. Sin embargo, estos procedimientos siguen de inmediato la suposición de que existía una conservación del mecanismo del sitio activo de

más de una proteasa que operan en una condición ambiental dada, y que un inhibidor que era específico para ese sitio activo, debe suprimir el acontecimiento catalítico para esas proteasas. Incluso si esta suposición no se cumplió por completo, se formuló la hipótesis de que los procedimientos descritos a continuación producen un inhibidor que tenía cierta afinidad por el sitio activo de uno u otro o de todos. Como se destacará en ejemplos posteriores, se produjo el mismo inhibidor para la proteasa purificada que para la mezcla en bruto. Nuevamente, la descripción previa supone que más de una proteasa estará activa en una condición ambiental muy específica. Sin embargo, no debe descuidarse el hecho de que puede haber habido una sola proteasa activa en esta condición.

Los procedimientos utilizados para determinar el entorno óptimo de la mezcla en bruto fueron los siguientes:

#### 1. Preparación de la mezcla en bruto.

La mezcla en bruto se preparó de la siguiente manera. Se obtuvieron quistes de *Taenia solium* congelados en seco de cerdos cisticercóticos de 6 a 12 meses de edad de aldeas en un área endémica de cisticercosis porcina en México. Los metacestodos se diseccionaron cuidadosamente de los tejidos parasitados, se lavaron tres veces con PBS y se liofilizaron. Los extractos de parásitos se prepararon suspendiendo 0,01 gramos de quistes congelados en seco en 10 ml de tampón de extracción (citrato 0,4 M, pH 4,9). Los quistes se agitaron en vórtice durante tres intervalos de cinco minutos con incubaciones intermitentes (5 min) a 4 °C. El material particulado se eliminó por centrifugación (20.000 x g, 120 min) y la fracción soluble resultante se filtró (0,2 µM).

#### 2. Determinación del pH óptimo.

Se construyó una amplia curva de pH frente a actividad usando un sistema tampón de citrato-fosfato (CP) (Maniatis). En este ensayo, se usó Z-Phe-Arg-AFC (Enzyme Systems Products, proveedor) para cribar para actividad, ya que se sabe que este sustrato es un sustrato común para cisteína proteasas. La incubación de Z-Phe-Arg-AFC con una pequeña cantidad de mezcla en bruto produjo una curva de pH en forma de campana frente a actividad con un pH óptimo a 4,9, que era idéntico al pH óptimo de la proteasa purificada.

#### 3. Optimización de la actividad de la mezcla en bruto.

Una vez que se identificaron los pH óptimos y el sustrato de detección general, se determinó la curva de dosis-concentración en mezcla en bruto, con respecto a la actividad de escisión de sustrato. La mezcla en bruto se añadió en concentraciones crecientes a Z-Phe-Arg-AFC al pH óptimo determinado. A continuación, se siguió la actividad de la proteasa en cada concentración a lo largo del tiempo. Se determinaron la concentración y el tiempo en que se registró la actividad. Los resultados demostraron una actividad proteolítica detectable después de 5 horas de incubación con el sustrato, con tan solo 10 µl de material de partida.

#### 4. Determinación de variables exógenas y temperatura de incubación óptima.

La actividad proteolítica mediante la mezcla en bruto sobre Z-Phe-Arg-AFC se potenció mediante la adición de L-cisteína 10 mM al tampón de ensayo.

Los resultados proporcionaron las variables óptimas dentro de las que incubar la mezcla en bruto en ensayos posteriores.

#### EJEMPLO 2. Determinación de Sustratos de alta y de baja kcat ("etapa II")

En esta etapa, el sustrato más eficaz para la detección de la cisteína proteasa (sustrato de kcat alta) se determinó in vitro junto con aquellos sustratos que no eran bien escindidos (sustratos de baja kcat). De aquí en adelante, las siguientes condiciones se refieren a todos los ensayos: "tampón de ensayo" se refiere a citrato 0,4 M, pH 4,9 (el pH óptimo de la proteasa). El tiempo de incubación fue de 18 horas a 37 °C. Estas condiciones fueron determinadas por los datos preliminares de los inventores como las mejores para la evaluación cinética de la proteasa. Todos los sustratos se compraron frescos de Enzyme Systems Products (Livermore, CA) y se usaron dentro de los 3 meses posteriores a la fecha de compra para garantizar la situación más estable. Los experimentos se realizaron en minitubos de cultivo de Borosilicato 6X50 mM (Fisher Scientific), y se empleó un fluorómetro (Turner) para la detección de la escisión de AFC.

#### A. Cribado de sustratos sintéticos

Dado que las posibilidades de 8.420 aminoácidos completos para la escisión no estaban disponibles, se emplearon sustratos representativos. Por lo tanto, este ejemplo también puede emplearse para demostrar cómo este método se puede adaptar a situaciones en las que solo se emplean subconjuntos de sustratos para su uso con esta etapa y para las etapas siguientes. Con el fin de elegir este subconjunto, se eligieron los aminoácidos representativos (es decir, seleccionados entre las categorías de ácido, básico, no polar, sin carga) para crear tantas categorías de motivos como sea viable para las posiciones P3-P1 con un conjunto de 67 péptidos pequeños (véanse las listas en la figura 4a y la figura 4b). La cisteína proteasa diana de *Taenia solium* se aisló usando los métodos de purificación

descritos previamente en la patente WO 00/63350.

Aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  (o una cantidad detectable proteolíticamente) de la cisteína proteasa diana purificada se incubó individualmente, con 1  $\mu\text{g}$  de cada uno de los sustratos disponibles en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo. Durante esta configuración, el sustrato se preincubó en el tampón de ensayo durante un corto período de tiempo (20 minutos) con el fin de alcanzar un estado equilibrado antes de la adición de la proteasa. Las valoraciones de escisión se basaron en la propiedad de la proteasa para escindir sustratos peptídicos sintéticos unidos en el extremo C a 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC) como se describió previamente. Los tripéptidos, dipéptidos y monopéptidos enlazados a AFC (con una variedad de permutaciones en P3-P1) estaban disponibles de Enzyme Systems Products (Livermore, CA) y se usaron como la fuente del subconjunto. Tras la incubación de preparaciones enzimáticas durante una noche (18 h, 37 °C) con péptido en tampón de ensayo (citrato, pH 4,9, suplementado con cisteína 0,01 M), se midieron las concentraciones de AFC libre fluorométricamente (excitación 405 nm, emisión 505 nm). La escisión proteolítica liberaba el grupo AFC, que se podía medir como una molécula libre mediante un fluorómetro estándar y se convertía en cantidades molares, basándose en una curva patrón previamente establecida. La simplicidad de la detección de AFC por el fluorómetro fue un factor clave que agilizó y simplificó los procedimientos.

En el ensayo, se añadió 1  $\mu\text{g}$  de la cisteína proteasa de *Taenia* purificada a una cantidad saturada de Z-Phe-Arg-AFC ( $4 \times 10^{-5}$  M) en tampón de ensayo. El experimento se realizó por triplicado y se repitió al menos 5 veces hasta estar seguros de que la variabilidad en la escisión de AFC no era estadísticamente significativa.

#### *Mezcla en bruto:*

Con el fin de preparar la "mezcla en bruto" de *Taenia solium*, se obtuvieron quistes de *Taenia solium* congelados en seco de cerdos cisticercóticos de 6 a 12 meses de edad de aldeas en un área endémica de cisticercosis porcina en México. Los metacistos se diseccionaron cuidadosamente de los tejidos parasitados, se lavaron tres veces con PBS y se liofilizaron. Los extractos de parásitos se prepararon suspendiendo 0,1 gramos de quistes congelados en seco en 10 ml de tampón de extracción (citrato 0,4 M, pH 4,9) a temperatura ambiente. Los quistes se agitaron en vórtice durante tres intervalos de cinco minutos con incubaciones intermitentes (5 min) a 4 °C. El material particulado se eliminó por centrifugación (20.000 x g, 120 min) y la fracción soluble resultante se filtró (0,2  $\mu\text{M}$ ). En los tampones de ensayo, la cantidad detectable de la mezcla en bruto, como se ha descrito anteriormente, se empleó e incubó con los sustratos diana.

#### *B. Valoración de parámetros cinéticos para la escisión óptima del sustrato primario*

La  $V_{\text{max}}$  para la escisión de sustratos por la proteasa diana purificada y la  $V_{\text{max}}$  para sustratos escindidos por la proteasa de la mezcla en bruto se calcularon, cada una, usando cálculos de modelización cinética convencionales ya descritos en la técnica.

#### *C. Identificación de sustratos de alta y baja $V_{\text{max}}$ (o $K_{\text{cat}}$ )*

Basándose en los resultados anteriores, se identificaron aquellos sustratos con los valores más altos y más bajos para  $V_{\text{max}}$ . Se determinó que el sustrato de endopeptidasa, Z-Phe-Arg-AFC (Z =  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O-CO-}$ , grupo de bloqueo para el extremo N) fue el sustrato más óptimamente escindido por la cisteína proteasa purificada, y se marcó de este modo por la  $V_{\text{max}}$  más alta. Esto fue seguido por la escisión de Z-FAR-AFC, Z-AAK-AFC, Z-AP-AFC y Z-VLR-AFC, respectivamente, en ese orden. Estos sustratos formarían el "cóctel" que se empleará en la siguiente etapa.

Se postula que hay dos posibilidades para los sustratos de baja  $V_{\text{max}}$ : 1) no se renuevan y no están unidos, o 2) están unidos de forma no catalítica, no renovados, y potencialmente bloqueados en el sitio activo. Aquellos sustratos que obedecen a la última condición eran de mayor interés para este procedimiento, ya que se esperaba que estuvieran unidos, pero no poseerían características bioquímicas conducentes a la renovación. Como se describió en los antecedentes, es esta característica la que conferiría ventajas significativas al núcleo peptídico, ya que el objetivo de este núcleo peptídico es tener interacciones de unión favorables máximas (a través de la disminución de  $\text{ES}_B$  y  $\text{TS}_B$ ), pero no reducir  $\text{TS}_R$  como lo haría un núcleo peptídico unido catalíticamente.

Basándose en los resultados de los inventores, había numerosos sustratos no escindibles y potencialmente unidos de la cisteína proteasa de *T. solium*, que incluye Z-Leu-Leu-Leu-AFC (Z-LLL-AFC), Z-Leu-Leu-Tyr-AFC (Z-LLY-AFC), Mu-Leu-Tyr-AFC (M-LY-AFC), Boc-Val-Pro-Arg-AFC (B-VPR-AFC), Z-Leu-Gly-Arg-AFC (Z-LGR-AFC), etc. (figura 4a). Normalmente, con el subconjunto completo disponible, todos los sustratos no escindibles se promocionarán inmediatamente a la siguiente etapa. Esa acción pondría fin a esta parte del procedimiento.

Sin embargo, también existe el escenario en el que no están disponibles todas las 8.420 combinaciones de péptidos completas, y por lo tanto las predicciones sobre qué sustratos también pueden ser no escindibles y unidos se realizan mediante la búsqueda de interacción. Por lo tanto, se emplean predicciones sobre qué aminoácidos estarían potencialmente "bloqueados" en cada posición del subsitio de la enzima, P1 a P3, y por lo tanto se predijo cuál de esas combinaciones de aminoácidos sería mejor promover a la siguiente etapa. Ahora se proporciona una muestra

de esta búsqueda de permutación con las siguientes etapas y puede ser usada por un investigador que no tiene acceso a los recursos del subconjunto completo.

5 1. Motivos de aminoácidos en sustratos renovados fueron identificados por primera vez. Aquellos sustratos que se escindieron proporcionaron sugerencias de motivos de aminoácidos en posiciones de subsitio específicas que se unieron en el sitio activo. Esta información es útil, aunque se usa de manera preventiva. Como los aminoácidos están en sustratos de alta  $k_{cat}$ , pueden estar implicados en la unión a  $TS_B$  y  $ES_B$ . Por ejemplo, como se ve en la figura 4a, D-VLR-AFC y Z-FR-AFC fueron ambos escindidos. En este caso, se hizo la predicción de que Leu o Phe (que cada uno tiene grupos sustituyentes no polares) en P2 se pueden unir y, por lo tanto, pueden ser potencialmente inhibidoras. Por lo tanto, se "fijo" Leu o Phe en P2 en la hipótesis de los inventores. Además, los sustratos que no fueron escindidos fueron examinados. Fue notable que tanto Mu-LY-AFC como MeoSuc-FLF-AFC (MeOS-FLF-AFC) no se escindieron. En consecuencia, fue interesante que Leu estuviera en P2. Como Leu estaba en P2 en un sustrato escindido (por ejemplo, D-VLR-AFC) y un sustrato no escindido (por ejemplo, Mu-LY-AFC), se podría suponer que este aminoácido podría estar unido al sitio activo, y ser potencialmente inhibidor (por ejemplo, en un ensayo competitivo con el sustrato más escindido, Z-FR-AFC). Por lo tanto, Leu se confirmó como fijado en P2 para la hipótesis.

20 2. Se realizó una búsqueda de "interacción" para identificar qué aminoácido funcionaba bien con L en P2. Como puede verse, Y en P1 era un sustrato potencialmente escindible y, por lo tanto, también se pudo haber unido a EY-AFC y Mu-LY-AFC. Además, V en P3 y R en P1 parecían ser importantes (por ejemplo, D-VLR-AFC, Boc-VPR-AFC).

25 3. Se realizó una búsqueda no selectiva "independiente". Independientemente de L en P2, el tema abordado es qué motivos no son escindidos. Por ejemplo, EY-AFC no se escindió y, por lo tanto, E en P2 puede haber sido un motivo potencialmente importante.

30 4. Los motivos se resumieron en una hipótesis central del vehículo. La hipótesis de los inventores para los aminoácidos en diferentes posiciones en el núcleo del vehículo, para el ejemplo de cisteína proteasa de *T. solium*, fue:

P1: R,Y  
P2: L,F,E  
P3: V

35 De nuevo, se enfatiza que este tipo de búsqueda algorítmica de aminoácidos predictivos en cada una de las posiciones del subsitio se realizará solo cuando el subconjunto completo de 8.420 aminoácidos no esté disponible. Esta hipótesis será útil después la etapa III también.

#### Resultados de la mezcla en bruto

40 En este contexto se emplearon etapas similares a las de la proteasa purificada. Como se observará, se obtuvieron conclusiones similares sobre la identificación de los inhibidores de proteasa para la mezcla en bruto, y se derivó la hipótesis idéntica (figura 4b). Es notable que los sustratos más escindidos fueron Z-FR-AFC, Z-FAR-AFC, Z-AAK-AFC, AP-AFC, Z-VLR-AFC, respectivamente. Este patrón de escisión, observado junto con otros, fue muy similar al patrón de escisión obtenido para la proteasa purificada. Basándose en estos resultados, se concluyó que la actividad proteolítica entre la mezcla en bruto y la proteasa purificada eran altamente comparables. Además, los sustratos no escindidos también fueron muy similares, aunque hubo variaciones sutiles en la escisión relativa para los sustratos no escindidos. Sin embargo, esto se esperaría, dado que las lecturas fluorométricas tenderán a tener una variación sutil a lecturas más bajas debido a los efectos de fondo.

#### EJEMPLO 3: identificación de sustratos inhibidores unidos no catalíticamente ("etapa III")

55 Hubo dos objetivos para esta etapa. En primer lugar, se usó para determinar cuál de los sustratos de baja  $V_{max}$  de la etapa II también exhibía un valor de  $K_m$  bajo. Este experimento diferenciaría entre aquellos sustratos de baja  $V_{max}$ , que exhibían baja renovación debido a la falta de unión, y aquellos, que tenían  $V_{max}$  bajas debido a la fuerte unión no catalítica de la proteasa. El objetivo era identificar el último de estos. Desde un punto de vista cinético, se identificaron aquellos emparejamientos de enzima/sustrato que estaban marcados por una unión muy fuerte (ES es baja ya que  $ES_B$  se reduce más de lo que se eleva  $ES_R$ ,  $TS_B$  se redujo, pero  $TS_R$  no) pero sin  $TS_R$  reducido. En segundo lugar, la etapa se empleó para diferenciar aquellos sustratos que estaban tan fuertemente unidos que inhibían la escisión de todos los sustratos de alta  $V_{max}$ . El resultado fue una secuencia de un tripéptido, dipéptido o motivo de aminoácido individual, donde el péptido era capaz de unirse al sitio activo de una manera cinéticamente más favorable que la combinación de tripéptido, dipéptido o aminoácido más comúnmente unida (aquellos que normalmente tendrían una alta relación  $K_{cat}/K_m$ ).

65 A. Elección de sustratos de alta y baja  $V_{max}$ .



El 1,4 % superior de sustratos (de 67) en el panel completo de sustratos con los valores más altos de Vmax fueron elegidos para componer un "cóctel al 1,4 % SUPERIOR". (Se emplea "Vmax" en este contexto aunque también se puede usar Kcat). Debido a la menor cantidad de sustratos, no se eligió un porcentaje para los sustratos de "% INFERIOR". Como alternativa, todos los sustratos que no fueron escindidos como se determina por un valor de 10  $\mu\text{M}/\text{h}$  o menos, fueron elegidos para ser ensayados en esta etapa por su capacidad competitiva. En lo sucesivo, el término "vehículo" representará sustratos de baja Vmax que fueron capaces de inhibir la escisión de porcentajes de cócteles. En este caso, se ensayaron los "vehículos" que inhibieron la escisión del cóctel al 1,4 % SUPERIOR (se suministraron en el sitio activo). Basándose en los resultados de la etapa II, el cóctel al 1,4 % superior estaba compuesto por Z-Phe-Arg-AFC, el sustrato más altamente escindido.

Se llevaron a cabo varios ensayos para establecer el nivel de rigurosidad para los sustratos de % SUPERIOR. Se determinó en el transcurso de varios experimentos que se pudo obtener una diferenciación en los resultados de la inhibición al complementar el cóctel con 1 sustrato. En otras palabras, el aumento del cóctel porcentual se realizó a través de un aumento de incremento en 1 sustrato. Este aumento de un incremento proporcionó la demostración del fenómeno de "dilución" de la inhibición.

#### B. Análisis de la agrupación inicial

El experimento comenzó con un ensayo competitivo entre los sustratos de Vmax baja no escindidos y el sustrato de Vmax más alta, Z-Phe-Arg-AFC. Las concentraciones se modificaron entre el sustrato de baja Vmax y Z-Phe-Arg-AFC, como se ha descrito anteriormente en "refinamiento del ensayo" hasta que se obtuvo un perfil de inhibición relativa. Se descubrió que la concentración óptima para obtener un patrón de inhibición relativa era la siguiente: el sustrato de alta Vmax debía estar a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M en el tampón de ensayo final (volumen final = 500  $\mu\text{l}$ ), y el sustrato de baja kcat necesitaba estar a una concentración de  $8 \times 10^{-6}$  M en el tampón de ensayo final.

Por lo tanto, para establecer el control de ensayo, se añadió Z-Phe-Arg-AFC primero al tampón de ensayo (Citrato 0,2 M, pH 4,9 suplementado con L-cisteína 10 mM) a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M. A continuación, cada uno de los sustratos de Vmax baja no escindidos se añadieron individualmente a un tubo de reacción respectivo a una concentración final de  $8 \times 10^{-6}$  M. La mezcla se dejó equilibrar durante un período de 30 minutos. Finalmente, se añadió enzima purificada activa a los tubos a una concentración que era siempre 50 veces menor que la concentración de los sustratos de alta y baja Vmax, respectivamente, con el fin de asegurar las condiciones de saturación. Esta concentración variaba de purificación a purificación y la cantidad añadida dependía del rendimiento y la actividad específica de la proteasa purificada.

Se establecieron controles positivos de una manera similar a la descrita para controles de ensayo, excepto que se añadió disolvente en sustitución del sustrato de baja Vmax (en un volumen igual a la adición de volumen de baja Vmax). Todos los sustratos podrían disolverse en dimetilsulfóxido (DMSO), y por lo tanto, este fue el disolvente de elección. Los controles negativos se establecieron añadiendo el sustrato de baja Vmax y de alta Vmax en un tubo sin la proteasa. Toda la liberación inducida no proteolítica potencial de AFC se controló por lo tanto en este tubo (una característica que también controló la estabilidad de los sustratos de AFC, ya que estos sustratos liberarán libremente AFC cuando son inestables). Se estableció un conjunto de tubos para este control negativo.

Todos los controles se establecieron por triplicado, y los experimentos se repitieron un mínimo de cinco veces. Los ensayos se incubaron a 37 °C, durante 18 horas durante la noche.

El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{AFC positivo para "Y"} - \text{AFC negativo para "Y"}) - (\text{ensayo de AFC} - \text{AFC negativo para "Y"})}{\text{AFC positivo para "Y"} - \text{AFC negativo para "Y"}} \times 100$$

Los sustratos de baja Vmax que eran inhibidores ahora se denominarán "vehículos" ya que, de hecho, se suministraron en el sitio activo de la proteasa diana. Las concentraciones anteriores para el cóctel de sustrato de alta Vmax y el vehículo, que produjo el perfil de inhibidor más diferenciado, se "fijaron" ahora para uso futuro.

#### C-E: Cribados de dosis adicionales de vehículos

En esta etapa, se hizo que las condiciones fueran más rigurosas para permitir una mejor diferenciación entre el potencial inhibidor de los vehículos candidatos altamente prometedores. Para hacerlo, los vehículos podrían competir con una mezcla creciente de los sustratos más altamente escindidos, con cada aumento representando la adición de un sustrato adicional.

Se realizó un cóctel al 2,9 % de los sustratos de alta Vmax. Esta se compuso de Z-FR-AFC y el segundo sustrato más escindido, Z-FAR-AFC. Los vehículos promovidos a partir de los cribados iniciales anteriores fueron nuevamente ensayados para la capacidad de inhibición competitiva con los nuevos cócteles. Sus concentraciones se establecieron de forma idéntica a las que se "fijaron" en los protocolos anteriores. En otras palabras, se añadió

$8 \times 10^{-6}$  M del vehículo al tubo de cultivo con  $1 \times 10^{-6}$  M de Z-FR-AFC y  $1 \times 10^{-6}$  M de Z-FAR-AFC. La proteasa activa se añadió por última vez a una concentración que era 50 veces menor que la concentración del sustrato con alta  $V_{max}$  (para garantizar las condiciones saturantes).

5 De forma similar experimental, un cóctel al 4,4 %, 5,9 % y 7,4 % fueron ensayados con cada uno de los vehículos prometedores. Cada aumento en el porcentaje representaba un aumento por un sustrato de alto  $V_{max}$  adicional. Cada uno de los componentes individuales en el cóctel se añadieron a  $1 \times 10^{-6}$  M cada uno, a  $8 \times 10^{-6}$  M del vehículo. La composición de los cócteles fue la siguiente: cóctel al 4,4 %: Z-FR-AFC, Z-FAR-AFC y Z-AAK-AFC (tercer sustrato más altamente escindido); cóctel al 5,9 %: Z-FR-AFC, Z-FAR-AFC, Z-AAK-AFC y AP-AFC (cuarto sustrato más altamente escindido); cóctel al 7,4 %: Z-FR-AFC, Z-FAR-AFC, Z-AAK-AFC, AP-AFC y Z-VLR-AFC. Se paró en esta cantidad de sustratos en el cóctel, ya que se obtuvo la confianza de que el potencial inhibitor de los vehículos podría "diluirse".

#### F, G: Determinación de $K_i$ y clasificación final

15 Finalmente, se determinó un conjunto manejable de vehículos candidatos. La determinación de  $K_i$  se realizó luego en cada uno de los candidatos viables (datos no mostrados). Esta determinación se realizó a través de un gráfico de Dixon y se reforzó mediante métodos convencionales de modelización cinética, que son bien conocidos por un experto en la materia. En estos estudios, el vehículo fue tratado como un "inhibidor". La concentración del vehículo se modificó experimentalmente de 0,5 a 5 veces la  $K_i$  con el fin de obtener un buen valor de  $K_i$ . Se usaron todos los diferentes sustratos en el cóctel de alta  $V_{max}$  para determinar  $K_i$ , por lo que las concentraciones de sustrato añadido se mantuvieron a un nivel de saturación (de 50 a 100 veces  $K_m$ ). Un aspecto conveniente de este cálculo fue que los valores de  $K_i$  determinados para estos vehículos también eran equivalentes al valor de  $K_m$  del vehículo cuando se usa como sustrato.

25 La etapa concluyó con una clasificación final de los vehículos inhibidores candidatos. Cuanto menor sea el valor de  $K_i$ , mayor será la clasificación que se atribuyó al vehículo. La determinación de  $K_i$  fue la única base de la clasificación final.

#### 30 Resultados y descripción

A través del diseño experimental en esta etapa, se pudieron sacar dos conclusiones principales. Primero, se determinó cuál de los sustratos de baja  $V_{max}$  causó la inhibición de la cisteína proteasa purificada. Estos sustratos de baja  $V_{max}$  se denominaron "vehículos". En segundo lugar, el experimento fue capaz de diferenciar el potencial de inhibición entre los vehículos, y esto culminó en una clasificación final basada en los valores de  $K_i$ .

40 La hipótesis de que aumentar el número de sustratos en el grupo de competidores aumentaría la rigurosidad de la competencia entre los vehículos y los sustratos de alta  $V_{max}$ , y por lo tanto "diluiría" el potencial inhibitor de vehículos menos inhibidores, fue exitosa. Para ilustrar, Z-FR-AFC se empleó como el sustrato de alta  $V_{max}$  en el cóctel al 1,4 % SUPERIOR, y se ensayó como un competidor contra todos los sustratos de baja  $V_{max}$  no escindidos. La competencia produjo el siguiente perfil inhibitor relativo de muestra de los siguientes vehículos que poseen la mayor capacidad de inhibición hasta la capacidad de inhibición más baja como se muestra en la figura 5a, respectivamente: Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC, Mu-LY-AFC, Boc-VPR -AFC, Z-RR-AFC, Z-SY-AFC, B-LGR-AFC, Z-FLF-AFC, m-PK-AFC, LW-AFC, etc. Estos sustratos ahora se consideraban "vehículos" debido a la observación de que estaban siendo "suministrados" en el sitio activo. Se valoró el éxito de un vehículo a través de tres parámetros: potencia de la inhibición, mantenimiento de la inhibición y robustez de la inhibición.

Los dos primeros de estos parámetros se emplearían para proporcionar un cociente de inhibición de vehículo (V).

50 El primer parámetro de la potencia del vehículo se definió como el porcentaje de inhibición en presencia del cóctel de % SUPERIOR. En otras palabras, cuanto mayor es el porcentaje de inhibición en presencia del cóctel al 1,4 %, más potente se consideró que es la inhibición. Para analizar estos vehículos, se descubrieron tres niveles de inhibición. Como se mencionó, se definieron por su inhibición en presencia del cóctel al 1,4 %. Estos niveles se deben dividir como una "curva de campana" que se puede subdividir en niveles. El primer nivel estaba compuesto por aquellos vehículos que producían inhibición mayor al 50 % cuando estaban en presencia del cóctel al 1,4 %. El segundo nivel estaba compuesto por aquellos vehículos que producían inhibición entre el 20-50 % de inhibición cuando estaban en presencia del cóctel al 1,4 %. El tercer nivel estaba compuesto por aquellos vehículos que producían una inhibición menor al 20 % cuando estaban en presencia del cóctel al 1,4 %. Normalmente, solamente los vehículos en el nivel superior se promocionarán a la siguiente etapa para el análisis aumentando el % de cóctel, como se describió anteriormente. Sin embargo, con el fin de estudiar los efectos de la inhibición, todos los vehículos se promocionaron al cóctel de la siguiente etapa.

65 Para estudiar el "mantenimiento" de la inhibición, los vehículos se sometieron a la competencia por un aumento en la composición del cóctel. El "mantenimiento de la inhibición" se determinó por el potencial de inhibición de los vehículos en presencia del cóctel al % final (7,4 %). Por lo tanto, las siguientes adiciones al cóctel aumentaron al 2,9 %, 4,4 %, 5,9 % y 7,4 % (2,9 %: Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC; 4,4 %: Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC + Z-AAK-AFC; 5,9 %: Z-

FR-AFC + Z-FAR-AFC + Z-AAK-AFC + AP-AFC; 7,4 %: Z-FR-AFC + Z-FAR-AFC + Z-AAK-AFC + AP-AFC + Z-VLR-AFC). Por lo tanto, el propósito de este ensayo era determinar qué vehículos mantenían una inhibición respetable y cuáles perdían la capacidad inhibidora al "diluirse". Con el fin de mantener una inhibición respetable, se definió el 50 % como el parámetro de corte para la inhibición de nivel superior. Por lo tanto, aquellos vehículos que fueron marcados por inhibición del 50 % o más en la presencia del cóctel de 7,9 % se consideraron que tenían inhibición "mantenida". Como se ve en la figura 4a, el potencial de inhibición de Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y mu-LY-AFC se mantuvo con el cóctel final (7,4 %) produciendo una inhibición del 50 % o superior. Por el contrario, el potencial inhibidor del segundo nivel de vehículos inhibidores, Boc-VPR-AFC, Z-SY-AFC, Z-RR-AFC, Z-FLF-AFC y Z-LGR-AFC se diluyó con el cóctel final (7,4 %) produciendo inhibición que era menor que el 20 %. El tercer nivel de vehículos incluía todos los vehículos restantes: producían una inhibición muy mínima y, por lo tanto, no se mantenían.

A partir de estos datos, se llegó a la conclusión de que los vehículos fuertemente unidos probablemente "mantendrían" su potencial de inhibición. Esto se esperaría para un vehículo que está realmente unido de una manera fuerte. Aunque no se observó este caso, se eliminaría un vehículo que producía una inhibición potente pero que no lo "mantenía" con el cóctel al % final. Por ejemplo, si Z-LLL-AFC producía una inhibición potente del 90 % con el cóctel al 1,4 %, pero producía un 20 % de inhibición con el cóctel final al 7,4 %, se eliminaría porque no podía mantener la inhibición. Por el contrario, si Mu-LY-AFC producía una potencia de inhibición del 80 % pero la mantenía al 60 % para el cóctel al 7,4 %, estaría clasificado por encima de Z-LLL-AFC. Por lo tanto, el mantenimiento de la inhibición se consideró un parámetro crítico. Sin embargo, el parámetro para la eliminación se basaría en el cociente de inhibición del vehículo, que se describe a continuación.

Adicionalmente, se observó "robustez" de la inhibición. Se definió la robustez de la inhibición como aquellos vehículos que perdieron solamente un pequeño porcentaje de inhibición entre el cóctel al 1,4 % y al 7,9 %. Fue notable que la caída porcentual de la inhibición para los vehículos de primer nivel fue normalmente menor que la caída porcentual de la inhibición en los vehículos de segundo y tercer nivel. Por ejemplo, Z-LLL-AFC fue un vehículo significativamente más robusto que B-VPR-AFC. Como se muestra en la figura 5, la caída porcentual de la inhibición entre el cóctel al 1,4 % y al 7,9 % para Z-LLL-AFC fue solo del 25 %, mientras que la misma caída en B-VPR-AFC fue del 38 %. Sin embargo, la "robustez" se observó en este contexto como una medida más cualitativa del ensayo, pero no proporciona el mejor modo de determinación del potencial inhibidor del vehículo.

Como alternativa, los parámetros de potencia y mantenimiento proporcionaron un cociente de inhibición directo del vehículo, donde  $V = P * M$ . P fue igual al porcentaje de inhibición en presencia del cóctel superior, y M fue igual al porcentaje de inhibición en presencia del último cóctel empleado. Cuanto mayor es el valor de V, mayor es la inhibición. Basándose en estos resultados, se calcularon los siguientes valores de V (tabla 1).

Vehículo	Nivel	Valor V
Z-LLL-AFC	1	0,585
Z-LLY-AFC		0,550
Mu-LY-AFC		0,450
B-VPR-AC	2	0,120
Z-FLF-AFC		0,100
Z-RR-AFC		0,090
SY-AFC		0,090
B-LGR-AFC	3	0,07

Tabla 1. Vehículos y clasificaciones de valor V.

Se demostró que la rigurosidad de la competencia entre el cóctel y el vehículo aumentó cuando se aumentó el porcentaje del cóctel. En otras palabras, una "dosificación" incrementada del cóctel permitió seleccionar aquellos sustratos que tenían el mayor potencial inhibidor a la vez que se "diluí" el potencial inhibidor de los sustratos menos impresionantes. Estos resultados fueron coherentes de experimento en experimento.

Finalmente, se determinó  $K_i$  para todos los vehículos inhibidores superiores promovidos, según lo determinado por sus valores de I. Los vehículos se clasificaron según el valor de  $K_i$ . Los vehículos con la clasificación más alta según este esquema fueron Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC. Se han identificado varias ventajas en este experimento para determinar el potencial inhibidor de los vehículos. En primer lugar, este método fue rápido y sirvió como un mecanismo de "filtración" eficaz para identificar una agrupación clave de sustratos *no catalíticos* inhibidores que tenían mayor actividad para el sitio activo de la cisteína proteasa que los sustratos más altamente escindidos identificados de la lista original de 67 sustratos. En segundo lugar, aumentar el porcentaje de cóctel permitió clasificar la capacidad de inhibición del vehículo sin incurrir realmente en la carga experimental de determinar el  $K_i$ . Como alternativa, se calculó un cociente V directo a partir de los datos en el diagrama de barras. Los valores de  $K_i$  se determinaron para aquellos vehículos con el valor de V más alto en el nivel superior.  $K_i$  no se calculó realmente hasta el final del procedimiento.

Hubo dos conclusiones principales a extraer de estos experimentos: una teórica y la otra práctica. En primer lugar,

se cree que Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC se marcaron por una unión fuerte a la hendidura del sitio activo de la proteasa, de modo que redujo  $ES_B$ . En virtud de la reducción de  $ES_B$ , se cree que este sustrato unido proporcionaría interacciones de unión que pueden conducir a la disminución de  $TS_B$ , basándose en la hipótesis de que las interacciones de unión en  $ES_B$  se conservan en  $TS_B$  (Menger, 1992). Esto fue ventajoso en aras de identificar una combinación de aminoácidos con propiedades unidas. Además, dado que el núcleo peptídico era no catalítico, TS no se redujo lo suficiente como para causar renovación (ya que  $TS_R$  no disminuyó), dado que el núcleo peptídico era no catalítico. Por lo tanto, no solo se esperaba que este núcleo peptídico ayudara a la molécula inhibidora final en virtud de sus fuertes propiedades de unión, sino que también se predijo que no contrarrestaría la molécula inhibidora final ya que teóricamente no reduciría  $TS_R$ . El experimento demostró que se identificó un vehículo unido no catalíticamente para la cisteína proteasa, de manera que la unión podía determinarse de manera eficaz, sin identificación de componentes individuales que se activaban para la catálisis.

La segunda conclusión principal de este experimento fue que se pudo formular una "hipótesis" de vehículo superior que podría usarse en la siguiente etapa de ensayo de inhibidores. Esta hipótesis formaría un modelo para una serie combinatoria posterior de adiciones de reactante inactivador (etapa VII). Normalmente, un conjunto completo de 8.420 vehículos estaría disponible y el o los inhibidores superiores con los valores de  $K_i$  más bajos se promocionarían posteriormente a la siguiente etapa. Sin embargo, dado que no se tenía el subconjunto completo de inhibidores, no se tenía la completa seguridad de que los inhibidores superiores de esta detección, Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC serían los principales vehículos entre las 8.420 posibles combinaciones de aminoácidos para tripéptidos, dipéptidos y monopéptidos, de haber estado disponibles.

Debido a esto, se desea usar esta información para hacer predicciones útiles sobre otras posibilidades para otros sitios preferidos de aminoácidos de sustrato en el motivo de Z-LLL-AFC para la inhibición. En otras palabras, se desea explorar otras hipótesis sobre aminoácidos en P1 a P3, y desarrollar una nueva hipótesis central de vehículo. Normalmente, esta información se puede emplear para diseñar nuevos vehículos a ensayar, y así sucesivamente. Nuevamente, esta situación es para el caso cuando el subconjunto completo de 8.420 aminoácidos no está disponible. El siguiente extracto demuestra cómo se puede realizar una predicción de diseño con este ejemplo.

Para comenzar la predicción, primero se decidió volver a examinar la hipótesis central de "vehículo" de la etapa II.

Se vuelve ahora y se critica el éxito de esa hipótesis central:

P1: R,Y  
P2: L,F,Q  
P3: V

Varias de las conclusiones de esa hipótesis fueron correctas. La siguiente descripción demuestra el concepto de que potencialmente mucha información sobre la inhibición del vehículo se puede recoger en la etapa II, que por lo tanto es útil para la predicción. Por ejemplo, L y V en P3 demostraron un potencial inhibidor (por ejemplo, Boc-VPR-AFC, Z-LLL-AFC y Z-LLY-AFC) como se predijo. Además, L en P2 fue ciertamente beneficioso como lo demuestra la inhibición del vehículo a través de Z-LLY-AFC, Z-LLL-AFC y Mu-LY-AFC. Finalmente, ambos R en P1 demostraron potencial inhibidor (por ejemplo, Z-VPR-AFC, Z-RR-AFC) como lo hizo Y en P1 (por ejemplo, Mu-LY-AFC, Z-EY-AFC). Sin embargo, debido a que varios de los sustratos más escindidos usados en el cóctel también poseían un R en P1 (por ejemplo, Z-FR-AFC, Z-VLR-AFC), se postula que R en P1 puede ser activador, y puede potencialmente contribuir a la disminución de  $TS_R$ . Como resultado, se concluyó que R en P1 era una situación desfavorable bajo la hipótesis de la etapa II. A pesar de esta última conclusión, estos resultados demostraron que la hipótesis del vehículo central de la etapa II era capaz de proporcionar predicciones exitosas para la inhibición, para ser ensayadas en la etapa III.

Basándose en los resultados del inhibidor de esta etapa usando el ensayo competitivo, se derivó una nueva hipótesis de vehículo. Los mejores vehículos tienen prioridad. Esos vehículos eran: Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC. Por lo tanto, el vehículo candidato superior fue Z-LLL-AFC y el segundo vehículo superior fue Z-LLY-AFC. Es importante observar que, aunque la inhibición por estos tres vehículos fue siempre más alta que en el resto del panel de vehículos, permaneció muy cerca de un experimento a otro. A continuación se muestra un experimento de muestra para fines de diagnóstico. Sin embargo, basándose en estos resultados, la nueva hipótesis del vehículo fue:

Hipótesis primaria: L en P3, L en P2 y L o Y en P1  
Hipótesis secundaria: F o V en P3 o F en P1

Esta hipótesis fue reforzada por la siguiente observación. Siempre que L o F estaban en P3 para cualquiera de los inhibidores, se observó una notable inhibición (mayor del 20 %) para todos los cócteles al 1,4 %. (Por ejemplo, Z-FLF-AFC, Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC, Z-LRR-AFC, Z-LGR-AFC). Además, L en P2 se vio reforzado por la observación de que se predijo en la hipótesis del vehículo central de la etapa II, así como por ser parte del vehículo inhibidor superior. L en P2 produjo una notable inhibición (mayor del 20 %) con el cóctel al 1,4 %, en sustratos con L en P2 que incluyen (Z-FLF-AFC, Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC). L en P1 no se reforzó, pero es parte de la hipótesis debido a su capacidad de inhibición en esta etapa a través de Z-LLL-AFC. Y en P1 fue reforzado por esta etapa (por ejemplo, Z-

EY-AFC y Mu-LY-AFC) así como por su predicción en la etapa I como un candidato potencial. Además, como hipótesis secundaria se postuló que V en P3 (por ejemplo, basándose en la inhibición por B-VPR-AFC) y F en P3 (por ejemplo, basándose en la inhibición por Z-FLF-AFC) pueden ser beneficiosos.

- 5 En cuanto a los vehículos con capacidades de inhibición bajas, es notable que haya menos predictibilidad en el efecto de "dilución". En otras palabras, a medida que se reducía la capacidad de inhibición, era más difícil obtener un efecto de dilución congruente. Es posible que a medida que la afinidad de unión del inhibidor por estos núcleos peptídicos no catalíticos disminuye, la cinética sea menos predecible.
- 10 En conclusión, el ejemplo anterior ilustra cómo se puede derivar un algoritmo de predicción cuando los recursos son limitados. Los vehículos nuevos se pueden ensayar después de la primera proyección de vehículos. El resultado final es una hipótesis de vehículo cuando el subconjunto completo de 8.420 aminoácidos no está disponible.

Se sacaron cinco conclusiones de este experimento.

- 15
1. La inhibición por parte de los vehículos superiores tendía a ser potente, mantenida y robusta.
  2. La inhibición por vehículos menores no fue potente, mantenida y robusta.
  3. La inhibición por este ensayo competitivo podría usarse para predecir vehículos que tendrían un valor bajo de  $K_i$ .
  4. La inhibición por vehículos menores fue menos predecible y congruente, mientras que la inhibición por vehículos superiores fue más predecible y más congruente.
  5. Un algoritmo de predicción podría emplearse para determinar nuevos vehículos que serían "alimentados" de nuevo a esta etapa. Este algoritmo de predicción se basaría en la hipótesis central del vehículo derivada de la etapa II, así como en las conclusiones sobre la unión y la inhibición derivadas de esta etapa.
- 20
- 25 No se compraron vehículos adicionales basándose el algoritmo de predicción. En cambio, basándose en la primera selección, inmediatamente se promovieron las hipótesis primaria y secundaria resumidas anteriormente a la siguiente etapa. La hipótesis primaria se basó en la inhibición por Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC. El bajo valor de  $K_i$  de estos vehículos (datos no mostrados) también reforzó su eficacia inhibidora.

30 *Mezcla en bruto.*

Uno de los descubrimientos más intrigantes en este sentido fue que un patrón de inhibición muy similar para el ensayo competitivo se produjo cuando se empleó la mezcla en bruto como fuente de la proteasa diana. Aunque hubo algunas variaciones en los efectos de la dilución del inhibidor, los vehículos mejor clasificados siguieron siendo inhibidores de forma congruente en comparación con el perfil con la proteasa diana. El perfil relativo y la composición del nivel superior de vehículos fueron idénticos. Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC, Mu-LY-AFC, Boc-VPR-AFC, Z-SY-AFC, Z-RR-AFC, Z-FLF-AFC y Z-LGR-AFC surgieron de forma congruente como los ocho mejores vehículos (figura 5b), respectivamente, en función de sus valores V (tabla 2). A partir de estos resultados, se determinó nuevamente que Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC proporcionaban la inhibición más potente, mantenida y robusta. Fue notable que los tres vehículos tenían valores de V muy similares. Curiosamente, en el experimento de muestra que se muestra en la figura 5b, Mu-LY-AFC produjo el mayor valor de V. Como se mencionó, este vehículo junto con Z-LLL-AFC y Z-LLY-AFC, fueron de forma congruente los vehículos más inhibidores. Los valores de V de las series de vehículos más inhibidores se muestran a continuación en la tabla 2. De nuevo, una diferencia clara entre los vehículos de primer y segundo nivel es discernible para el valor de V.

45

Vehículo	Nivel	Valor V
Z-LLL-AFC	1	0,611
Z-LLY-AFC		0,55
Mu-LY-AFC		0,45
B-VPR-AFC	2	0,12
Z-FLF-AFC		0,10
SY-AFC		0,09
Z-RR-AFC		0,09
B-LGR-AFC	3	0,02

Tabla 2. Vehículos y clasificaciones de valor V.

50 Como se mencionó, se puede esperar menos predictibilidad en vehículos con una menor capacidad de unión. De manera similar, se observó una pequeña variación en el perfil de inhibición para el tercer nivel de vehículos. De nuevo, esto no es sorprendente dado que no se esperarían una unión ideal por estos compuestos, y por lo tanto, las interacciones de unión quizás no sean tan predecibles.

55 Los resultados de los inventores demostraron que se obtuvo un perfil muy similar para los vehículos superiores tanto de la proteasa purificada como de la mezcla de parásitos en bruto de la que se purificó. Estos resultados demostraron que el comportamiento proteolítico de la cisteína proteasa purificada y la mezcla en bruto, en un tampón de ensayo de pH 4,9 complementado con L-cisteína exógena 10 mM, demostró un comportamiento de sitio

activo similar. Basándose en estos resultados, se confía en que tanto la mezcla en bruto como la proteasa purificada estaban empleando mecanismos similares de catálisis en estas condiciones ambientales de escisión. Además, se tenía más confianza en la hipótesis: L o Y en P1, L en P2 y L en P3 confieren interacciones de unión fuertes con el sitio activo de una manera que era potente, mantenida y robusta. Es importante señalar que si se hubiera notado una marcada diferencia entre los perfiles de inhibición de los vehículos superiores de la proteasa purificada y la mezcla en bruto, entonces la misma actividad proteolítica podría no estar operando en la condición ambiental dada.

#### EJEMPLO 4. Ensayos de inhibición natural ("etapa IV")

En este contexto, los vehículos candidatos principales se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la escisión de IgG humana en comparación con los inhibidores de diferentes clases mecanicistas, que se mostraron en la divulgación de la patente WO 00/63350 como un sustrato natural para la proteasa. La base para la identificación de este sustrato natural fue la postulación de que la cisteína proteinasa purificada puede degradar IgG en vacuolas lisosómicas, donde el pH y el entorno reductor son similares a los usados en los ensayos de degradación de IgG de los inventores. Threadgold y colegas han identificado vacuolas ácidas en la pared del quiste de *T. crassiceps* (Threadgold y col., 1983). En un estudio previo, se usó microscopía electrónica para localizar productos de escisión de electrones densos de Z-Phe-Arg-metoxinaftilamida en vacuolas lisosómicas de *T. crassiceps* de los somas tegumentarios y prolongaciones internunciales, que también se han relacionado con endocitosis adsorbente (Khalil y col., 1998). Dado que la hidrólisis de Z-Phe-Arg se revirtió por E-64, identificaron la enzima responsable como una cisteína proteinasa. Junto con la observación de que se ha descubierto IgG del huésped alterada en el líquido del quiste de los quistes *Taenia* (Hayunga y col., 1989), se cree que la IgG humana puede ser un sustrato natural para la cisteína proteinasa en vacuolas de la pared de quistes ácidos. Presumimos que esta interacción puede ser altamente específica y catalíticamente eficiente si la cinética de la hidrólisis de IgG fuera, de hecho, similar a la de la escisión de Z-Phe-Arg.

Para llevar a cabo esta valoración, se realizó una transferencia Western. La digestión de IgG se detectó incubando 20  $\mu$ l de enzima purificada de *T. solium* o extracto de *T. solium* con 1  $\mu$ g de IgG humana (Sigma, St. Louis) en un volumen final de 100  $\mu$ l de tampón de ensayo. La activación exógena con tiol se valoró incubando el ensayo en presencia o ausencia de cisteína. La clase catalítica de la proteasa de IgG se determinó preincubando los siguientes inhibidores de proteinasas a sus concentraciones activas, con la enzima: E 64 ( $10^{-6}$  M, cisteína proteinasas), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ( $10^{-3}$  M, serina proteinasas), pepstatina A ( $10^{-6}$  M, proteinasas aspárticas) y 1,10 fenantrolina ( $10^{-3}$  M, metaloproteinasa), y el vehículo, Mu-Leu-Tyr-AFC ( $10^{-3}$  M). Después de la adición de IgG, el ensayo se incubó durante la noche (37 °C, 18 horas). Posteriormente, se hirieron 100  $\mu$ l de la mezcla en tampón de muestra de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con 2-mercaptoetanol al 2 %, se separaron por SDS-PAGE al 12,5 %, y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se usó solución salina tamponada con Tris que contenía el 0,1 % de albúmina de suero bovino y el 0,05 % de Tween 20 (TBS-BSA) para bloquear la unión no específica. La transferencia se lavó tres veces con TBS que contenía Tween al 0,05 % (TBS-Tween) y se incubó con anticuerpo biotinilado antihumano de cadena pesada y ligera diluido a 1:1000 en TBS-BSA (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN) seguido de incubación con un complejo de estreptavidina-avidina conjugado con peroxidasa. La transferencia se sometió luego a quimioluminiscencia (kit ECL, Amersham International, Suecia) y autorradiografía.

#### Resultados y descripción

Después de que la IgG humana se incubó con la cisteína proteinasa purificada, se observó la degradación tanto de las cadenas pesadas como ligeras. Se observó inhibición con el inhibidor general de cisteína proteasa, E64. Normalmente, la degradación de IgG también se ensayaría mediante inhibición a través del vehículo superior, Z-LLL-AFC. Para este ejemplo, se probó el tercer vehículo más inhibitorio, Mu-Leu-Tyr-AFC con una derivación Suc (succinilo) en oposición a Leu. La degradación de la cadena pesada se muestra en la figura 6. Se observaron resultados idénticos dentro de la mezcla en bruto (datos no mostrados), aunque la concentración de Suc-Leu-Tyr-AFC requerida para la inhibición de la escisión de IgG fue mayor en la mezcla en bruto. Esto puede esperarse, ya que la inhibición puede no ser tan precisa con la presencia de otras proteasas en la mezcla.

#### EJEMPLO 5: Síntesis y recogida de combinaciones de vehículo/inhibidor inactivador que forman un vehículo inactivador de proteasa en estado de transición o en estado basal potencialmente "potente" ("etapa VII").

Hasta este punto, la hipótesis del vehículo superior (es decir, residuo de péptido preferido) de la etapa III se identificó como L o Y. Se promovió una "hipótesis" en lugar de un vehículo superior a esta etapa, ya que no se tenía acceso al subconjunto completo de 8.420 aminoácidos. Basándose en la hipótesis de los inventores, se creía que este núcleo de vehículo representaba interacciones de unión elevadas que se conservaron tanto en ES<sub>B</sub> como en TS<sub>B</sub>, sin una reducción concomitante e inhibitoria "no favorable" de TS<sub>R</sub>. Por lo tanto, el objetivo en esta fase era desviar la atención de la unión del núcleo peptídico (ya característica del vehículo) a una búsqueda de reactante inactivador que ahora aumentaría la energía reactiva en TS<sub>R</sub> y no en el estado basal. Por lo tanto, la proporción de unión del vehículo se mantendría constante, presumiblemente tanto en la estructura en estado basal como en estado de transición, mientras que el reactante inactivador fue modificado. Esencialmente, las pocas siguientes etapas cribaron un reactante inactivador que inhibió la proteasa diana en el estado de transición.

#### A. Enlace covalente de reactante inactivador al vehículo

Reactantes inactivadores se enlazaron orgánicamente al extremo C del residuo P1 de la hipótesis del vehículo superior con el fin de construir un inactivador de proteasa. La hipótesis favoreció tanto Z-LLL como Z-LLY. Los reactantes inactivadores elegidos para este fin fueron la fluorometilcetona (FMK), la vinilsulfona (VS) y el epóxido. El enlace de fluorometilcetona a Z-LLL se realizó en Enzyme Systems Products (Livermore, CA) y las Z-LLL-vinilsulfonas y Z-LLL-epóxidos fueron generosamente suministrados por el Dr. James Powers (GA Tech). Para la segunda hipótesis del vehículo superior, los enlaces de Z-LLY, fluorometilcetona y diazometilcetona fueron sintetizados por Enzyme Systems Products. El enlace del reactante inactivador con el vehículo sigue los procedimientos comúnmente implementados de enlace de aminoácidos que son bien conocidos en la técnica de la síntesis orgánica. Otras variaciones en el motivo Z-LLL así como las hipótesis secundarias (F en P3 y F en P1, V en P3 no estaba disponible) fueron generosamente suministradas por el Dr. James Powers (GA Tech) y se incluyen en la figura 7a.

Los productos sintetizados se proporcionaron con muy alta pureza. Las funcionalidades del reactante inactivador se eligieron en función de su potencial para formar un aducto tetraédrico con el sitio activo de la cisteína proteasa. Por ejemplo, en casos donde los aductos tetraédricos son importantes en la etapa limitante de la velocidad (por ejemplo, cisteína y serina proteasas), se prefirieron reactantes inactivadores que tendrían el potencial mediante un ataque nucleófilo o electrófilo (dependiendo de la molécula) para imitar la geometría tetraédrica de la etapa limitante de la velocidad.

Por supuesto, no había un límite teórico en cuanto al número de reactantes inactivadores que podrían estar enlazados al vehículo superior, y habría sido completamente dependiente de los recursos disponibles para el investigador. Sin embargo, cuanto mayor sea el número de enlaces de reactantes inactivadores al vehículo superior para la formación de varios inactivadores de proteasas, mayores fueron las posibilidades para el desarrollo exitoso del inactivador de proteasa en estado de transición (TSPI). Dado que los recursos eran limitados, se dio una preferencia importante al desarrollo de una biblioteca más grande de reactantes inactivadores para el vehículo superior en vez de una biblioteca de varios vehículos con menos reactantes inactivadores.

#### B. Ensayos de inhibición para determinación de inactivadores de proteasa candidatos en estado de transición

Una vez que los inactivadores de proteasa se sintetizaron en el laboratorio orgánico, se analizaron las concentraciones más bajas eficaces a las que indujeron el 100 % de inhibición de la proteasa diana ( $CE_{100}$ ). El cóctel de porcentaje superior que se empleó en la etapa de selección de vehículo final de la etapa III se empleó como fuente de competencia para los inhibidores. En este caso, este fue el cóctel al 7,9 % que estaba compuesto por Z-FR-AFC, Z-FAR-AFC, Z-AP-AFC, Z-AAK-AFC y Z-VLR-AFC. El resultado final sería una clasificación de los inactivadores de proteasa en estado de transición candidatos con una clasificación alta que se correlaciona directamente con un valor de  $CE_{100}$  bajo. Las siguientes etapas describen el ensayo:

*Etapas A: cribado inicial.* Para configurar el control de ensayo, cada inactivador de proteasa se incubó primero con el cóctel al 5 % (que proporcionó la diferenciación final de los vehículos en la etapa III). Para empezar, el inactivador de proteasa se incubó a una concentración de  $3 \times 10^{-9}$  M en 500  $\mu$ l de tampón de ensayo (citrato 0,2 M, pH 4,9, suplementado con L-cisteína 10 mM). Esta concentración se determinó mediante una serie de diluciones de inhibidor a la mejor concentración de inhibidor a la que se podía observar una diferenciación en el potencial inhibidor. A continuación, se añadió a la mezcla una concentración igual a  $4 \times 10^{-5}$  M para cada uno de los componentes de cóctel individuales. Los componentes se dejaron equilibrar durante un período de 30 minutos. Finalmente, se añadió enzima purificada activa a los tubos a una concentración que era siempre al menos 50 veces menor que la concentración de la concentración más baja en la mezcla (para proporcionar condiciones de saturación). Esta concentración varió de purificación a purificación, y la cantidad que se añadió dependía del rendimiento y la actividad específica de la proteasa purificada.

Se establecieron controles similares de forma similar a los descritos para los controles de ensayo, excepto que se añadió disolvente en sustitución del inactivador de proteasa (en un volumen igual a la adición de volumen de baja Kcat). Todos los inactivadores de proteasa se pudieron disolver en dimetilsulfóxido (DMSO), y por lo tanto, este fue el disolvente de elección. Se establecieron controles negativos añadiendo el inactivador de proteasa y los sustratos de cóctel en un tubo, sin la proteasa. Por lo tanto, toda la liberación potencial no proteolítica inducida de AFC se controló en este tubo.

Todos los controles se establecieron por triplicado, y los experimentos se repitieron un mínimo de cinco veces. Los ensayos se incubaron a 37 °C, durante la noche. El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{AFC positivo para "Y"} - \text{AFC negativo para "SI"}) - (\text{ensayo de AFC} - \text{AFC negativo para "SI"})}{\text{AFC positivo para "SI"} - \text{AFC negativo para "SI"}} \times 100$$

*Etapas B: estudios de dilución de inhibidores y formación de una lista ordenada de inactivadores de proteasa basándose en valores de  $CE_{100}$ .* Aunque fue posible que se haya establecido una clasificación de inhibidores justo a través del cribado inicial, se descubrió que un número significativo de inactivadores de proteasa inhibía la proteasa diana en un 100 % (figura 7a).

5 Debido a esto, se requirió un estudio de dilución con el fin de determinar una clasificación viable. Por lo tanto, la concentración de cada uno de los inactivadores de proteasa se redujo con una configuración de respuesta a la dosis hasta que se pudo determinar la concentración más eficaz para el 100 % de inhibición ( $CE_{100}$ ). Los inhibidores tuvieron que diluirse a niveles nanomolares con el fin de establecer un patrón de  $CE_{100}$  diferenciable. El resultado  
10 final del ensayo fue una lista de candidatos clasificados de inactivadores de proteasa. Una  $CE_{100}$  menor se atribuyó a una clasificación más alta y viceversa.

*Etapas C: determinación de  $K_i$  del inhibidor y modo de inhibición, y reclasificación de la lista de  $CE_{100}$  con  $K_i$  del inhibidor.* A continuación se valoró la  $K_i$  de cada uno de los inactivadores de proteasas de clasificación superior, basándose en valores de  $CE_{100}$  bajos, para los 5 inhibidores  $CE_{100}$  superiores.

15 Con el fin de determinar  $K_i$ , todos los sustratos de cóctel de alta  $V_{max}$  se emplearon para la determinación de  $K_i$  (ya que la  $K_i$  del inhibidor de la enzima es la misma, independientemente del sustrato). Para garantizar la mayor precisión, la  $K_i$  debía determinarse en un mínimo de al menos tres de los sustratos de alta  $k_{cat}$ . El ajuste no lineal y el gráfico de Dixon se emplearon para determinar la  $K_i$  de los inactivadores de proteasas de mejor clasificación. Se construyó un gráfico adicional usando Eadie Hofstee y/o Hanes para determinar el modo de inhibición.

20 En este experimento, se identificaron varios inactivadores de proteasas que inhibían la cisteína proteasa diana. Se determinó que los inhibidores superiores eran Z-LLL-FMK, Z-LLY-FMK, Z-LLL-epóxido y Z-LLL-VS. A continuación, se valoraron y determinaron los valores de  $K_i$  para los cinco inhibidores superiores (datos no mostrados).  
25

Basándose en estos resultados, Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK tuvieron los valores de  $K_i$  más bajos, respectivamente. El valor notablemente bajo de  $K_i$  de estos inhibidores fue sugestivo de un modo de inhibición que se produce en el estado de transición, ya que los valores de  $K_i$  en este intervalo serían típicos de inhibidores del estado de transición, como se demuestra en la técnica. Ciertamente, la pregunta entonces seguía siendo si el modo de inhibición era o no como se había postulado. Se creyó que el resto Z-LLL para el inhibidor superior proporcionaba interacciones de unión significativas, lo que reducía  $ES_B$  y  $TS_B$  pero no aumentaba  $TS_R$ . Además, se planteó la hipótesis de que el resto de fluorometilcetona puede estar interactuando específicamente para elevar  $TS_R$ . Para estudiar esta hipótesis, se realizaron esfuerzos a continuación para cribar el resto de fluorometilcetona (junto con Z-LLL) por su capacidad para inhibir la cisteína proteasa en el estado de transición.  
30  
35

#### *Resultados a partir de la mezcla en bruto*

40 Cuando se usó una mezcla en bruto de extracto de parásito en lugar de la cisteína proteasa purificada, se observó una serie de inhibición muy similar. Esta notable similitud demostró que la actividad proteolítica determinada para la mezcla en bruto, a pH 4,9, en realidad fue causada por la cisteína proteasa operativa. Además, se cree que también es indicativa de que otras isoformas (con diferentes propiedades proteolíticas) no predominaron a pH 4,9.

#### *EJEMPLO 6: Ensayo de escisión diferencial para identificar TSPI o GSPI que son selectivos para la proteasa diana ("etapa VI" y "etapa IX")*

45 Este ejemplo explora la selectividad de vehículos y de inhibidores hacia proteasas humanas. Como ya se ha descrito, la selectividad es una característica importante y preferida de un fármaco inhibidor de proteasa, dado que la selectividad le hace capaz de inhibir la proteasa diana del patógeno, sin afectar a las proteasas generales del huésped humano o no humano. Para evaluar la selectividad, los controles apropiados y las configuraciones del ensayo se configuraron de manera similar tanto en la etapa VI como en la etapa IX. Por esta razón, ambas etapas se detallarán en este único ejemplo.  
50

55 Con el fin de realizar el ensayo, el vehículo (para la etapa VI) o el inhibidor (para la etapa IX) se incubaron con el sustrato apropiado en el tampón de ensayo correcto y se dejaron equilibrar. Posteriormente, se añadió la proteasa, y el ensayo se dejó incubar durante un tiempo apropiado. Las concentraciones usadas en este caso fueron las siguientes: el vehículo se configuró a  $4 \times 10^{-5}$  M en el tampón de ensayo final; el inhibidor se configuró a  $3 \times 10^{-10}$  M en el tampón de ensayo final. Preferentemente las dosis empleadas deben ser la cantidad mínima de vehículo o inhibidor necesaria para inducir la inhibición. Las dosis indicadas en este contexto fueron suficientes para la inhibición. Los sustratos se establecieron basándose en el sustrato preferido para la escisión de la enzima particular.  
60

65 Se establecieron controles positivos de forma similar a los descritos para controles de ensayo, excepto que se añadió un blanco de disolvente en sustitución del inhibidor o vehículo (en un volumen igual al volumen de adición de inhibidor o de vehículo). Todos los inhibidores y vehículos podrían disolverse en dimetilsulfóxido (DMSO), y por lo tanto, este fue el disolvente de elección. Los controles negativos se establecieron añadiendo el inhibidor o vehículo y los sustratos preferidos en un tubo sin la proteasa. Por lo tanto, toda la liberación potencial no proteolítica de AFC se



controló en este tubo.

Todos los controles se establecieron por triplicado, y los experimentos se repitieron un mínimo de cinco veces.

5 El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\frac{\% \text{ de inhibición} = (\text{AFC positivo para "SI"} - \text{AFC negativo para "SI"}) - (\text{ensayo de AFC} - \text{AFC negativo para "SI"})}{\text{AFC positivo para "SI"} - \text{AFC negativo para "SI"}} \times 100$$

10 En este ensayo preliminar, se emplearon las siguientes enzimas derivadas de ser humano (con la clase mecanicista indicada entre paréntesis): catepsina B (cisteína), catepsina L (cisteína), catepsina H (cisteína), catepsina D (aspártico), tripsina (serina), la cisteína proteasa de *Taenia solium* purificada y la mezcla en bruto de *Taenia solium*. La catepsina B se preparó en un tampón de ensayo de L-cisteína 10 mM en tampón de citrato 0,4 M, pH 6,1, usando Z-ARR-AFC como sustrato de escisión. La catepsina L se preparó en un tampón de ensayo de L-cisteína 10 mM en tampón de citrato 0,4 M, pH 5,5, usando Z-FR-AFC como sustrato de escisión. La catepsina H se preparó en un  
15 tampón de ensayo de L-cisteína 10 mM en tampón PBS 0,15 M, pH 6,8, usando L-R-AFC como sustrato de escisión. La catepsina D se preparó en un tampón de ensayo de PBS 0,15 M, pH 7,1, usando Z-RGFFP-AFC como sustrato de escisión. La tripsina se preparó en un tampón de ensayo de PBS 0,15 M, pH 8,0, complementado con CaCl<sub>2</sub> 100 mM y con Z-R-AFC como sustrato de escisión. La enzima se incubó de modo que fue al menos 50 veces menor que la concentración de sustrato con el fin de garantizar las condiciones de saturación.

20 Los resultados de los inventores (tabla 3) demostraron que los vehículos, Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC, Mu-LY-AFC y los inhibidores, Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK, fueron selectivos para la inhibición de la cisteína proteasa de *Taenia solium*. La inhibición de otras proteasas fue completamente despreciable. Notablemente, sin embargo, la inhibición de la catepsina L por Z-LLL-FMK fue evidente, aunque fue casi la mitad de la inhibición de la cisteína proteasa de *Taenia solium*. Esta inhibición puede indicar una sutil similitud de los mecanismos compartidos entre la catepsina L y la cisteína proteasa de *Taenia solium*, con respecto a la unión de un inhibidor, aunque ciertamente hubo una preferencia de Z-LLL-FMK por la última proteasa. Además, aunque Z-LLY-FMK (62 %) no inhibió la proteasa de *Taenia solium* tan eficazmente como Z-LLL-FMK (98 %), no inhibió la catepsina L en absoluto. Este descubrimiento puede indicar que Y en P1 sería una sustitución de aminoácidos preferible para un resultado selectivo. Como se describió en lo anterior, corresponderá al investigador determinar si se pueden emplear o no estos resultados para una posterior selección del vehículo. Basándose en el hecho de que hubo una inhibición de catepsina L pequeña, pero notable, por Z-LLL-FMK, y que esta inhibición estaba ausente cuando se empleó Z-LLY-FMK como sustrato, se decidió explorar más a fondo la eficacia de Z-LLY-FMK (además de Z-LLL-FMK) como un compuesto de partida candidato. En la actualidad, se están llevando a cabo valoraciones del estado de transición tanto de Z-LLL-FMK como de Z-LLY-FMK, mientras que los resultados preliminares sugieren que ambas tienen carácter del estado de transición.

40 Entre los vehículos, se observó que Mu-LY-AFC causaba una inhibición sutil de la proteasa de catepsina L, aunque esta era solo una pequeña fracción de la inhibición de la cisteína proteasa de *Taenia solium*. Fue notable que Z-LLL-AFC produjo una inhibición ligeramente menor que Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC, cuando todos se usaron a la misma concentración. Este no fue un descubrimiento sorprendente. Como se ha descrito anteriormente, Z-LLL-AFC, Z-LLY-AFC y Mu-LY-AFC tendieron a producir perfiles de inhibición similares que permanecieron bastante cercanos y, a veces, indistinguibles de un experimento a otro.

45 Basándose en estos resultados, se concluyó que era evidente una inhibición diferencial de la cisteína proteasa de *Taenia solium* por todos los vehículos e inhibidores elegidos. Fue notable que (con la ligera excepción de la catepsina L), ningún inhibidor o vehículo inhibió ninguna de las otras enzimas de cisteína proteasa ensayadas en ningún grado sustancial.

Proteasa (clase mecanicista)	Z-LLL-FMK	Z-LLY-FMK	Z-LLL-AFC	Z-LLY-AFC	Mu-LY-AFC
T. solium (cisteína)	98 %	62 %	68 %	70 %	75 %
Catepsina B (cisteína)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Catepsina H (cisteína)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Catepsina L (cisteína)	50 %	0 %	0 %	0 %	25 %
Catepsina D (aspártico)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Tripsina (serina)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

50 Tabla 3. Perfil de selectividad de los inhibidores y vehículos superiores frente a un panel de proteasas de diferentes clases mecanicistas.

55 EJEMPLO 7: valoración del inactivador de proteasa en la reducción de la escisión de cisteína proteasa de *T. crassiceps* en ratones BALB/c ("etapa VIII")

El objetivo de los siguientes experimentos fue valorar la prueba de concepto para Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK más allá de sus datos de estado de transición y en modelos animales. Para este propósito, se empleó el modelo animal para neurocisticercosis humana (NCC). NCC se cita como la enfermedad parasitaria más común del sistema nervioso central humano (Del Brutto y col., 1993), así como la principal causa de ataques epilépticos en muchas partes del Tercer Mundo (Tsang y col. 1994). La hipótesis de los inventores es que la cisteína proteasa diana ayuda al parásito causante, *Taenia solium*, a sobrevivir en el huésped. Afortunadamente, un parásito relacionado, *Taenia crassiceps*, se puede propagar de manera efectiva en un modelo animal que emplea ratones BALB/c. Este fue el enfoque de los estudios de prueba de concepto para Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK. Se desea emplear K-Pyr (Leu-Phe-cetoamida-Piridilo) como control, ya que también representa un tercer inhibidor, aunque menos eficaz, para la cisteína proteasa diana.

Se produjeron datos significativos en el pasado como se describe en la patente WO 00/63350, lo que indica que hubo una proteasa similar en *Taenia crassiceps* y que su sitio activo es similar al sitio activo de la cisteína proteasa de *Taenia solium*. Parte de estos datos incluyó el descubrimiento de que los inhibidores superiores descubiertos en este contexto inhibían de manera similar la cisteína proteasa de *Taenia crassiceps* purificada, demostrando además la similitud bioquímica de los sitios activos de las dos enzimas (datos no mostrados). Basándose en esta homología, la predicción de los inventores fue que un inhibidor anti-cisteína proteasa de *T. solium* tendría un efecto inhibitorio contra la cisteína proteasa de *T. crassiceps*, y causaría un problema biológico para el quiste si la cisteína proteasa fuera realmente importante para el parásito. Según el conocimiento de los inventores, esta cisteína proteasa confirió la función de evasión inmune e inmunización al parásito (documento WO 00/63350, White y col., 1997). La predicción de los inventores fue que inhibirla provocaría el reconocimiento del quiste en el animal por la respuesta inmunitaria, lo que inhibiría su proceso de gemación y crecimiento. Esta fue una hipótesis comprobable. Ratones BALB/c tratados con los inhibidores específicos Leucina-Leucina-Tirosina-Fluorometil-cetona y Leucina-Leucina-Leucina-Fluorometil-cetona fueron protegidos al 85-97 % y 100 %, respectivamente, de la infección por cisticercosis en un experimento representativo.

#### *Estudios a corto plazo*

Basándose en la premisa de que la cisteína proteasa de la pared del quiste puede cumplir una función crítica para el ciclo de vida del quiste de *Taenia*, se ensayaron los inhibidores más eficaces, LLL-FMK y LLY-FMK (se usó K-Pyr como control), para sus habilidades para proteger a los ratones de la infección por cisticercosis. LLY-FMK y LLL-FMK se ensayaron individualmente como profilácticos en un ensayo preliminar con ratones BALB/c. Los ratones en los grupos tratados se pre-inyectaron durante dos días con el inhibidor [ $-1,4 \times 10^{-2}$  M, disuelto en un volumen de inyección de 150  $\mu$ l de PBS 0,15 M] seguido de infección con 10 quistes de *T. crassiceps*/ratón. Los ratones fueron posteriormente dosificados diariamente con la misma concentración durante cuatro semanas. Después de un mes, los ratones fueron sacrificados y se contaron los quistes. Se descubrió que los ratones en grupos que habían sido tratados con LLL-FMK estaban protegidos al 100 % de la infección por cisticercosis (tabla 4). Los ratones en grupos que habían sido tratados con LLY-FMK estaban protegidos en un 85 %-97 % de la infección por cisticercosis, en comparación con los controles no tratados (figura 8) se muestra un estudio representativo completo). Un estudio posterior repitió el experimento profiláctico idéntico con LLY-FMK y demostró datos de protección similares (75 %-90 %) Curiosamente, un alto porcentaje de quistes que sobrevivieron al tratamiento demostraron una morfología anormal. Muchos de estos quistes exhibieron multilocularidad apolar (aspectos multilobulados), un patrón de gemación anormal. Bajo examen histológico, los quistes multilobulados mostraron paredes agrandadas en comparación con los quistes lobulados normales. Los ratones en grupos tratados con K-Pyr (Leu-Phe-cetoamida-piridilo) se protegieron en un 40 %.

También se realizó un estudio terapéutico con LLL-FMK y reveló un 60 % de protección cuando el tratamiento con inhibidor comenzó dos semanas después de que los ratones hubieran sido infectados con quistes de *T. crassiceps*. Los ratones en todos los grupos sobrevivieron sin efectos secundarios notables (por ejemplo, sin afección del pelaje, arrastre de la cola o paresia, etc.).

#### *Estudios a largo plazo*

También se llevaron a cabo estudios a largo plazo para valorar el período durante el cual estos inhibidores podrían mantener un efecto protector. En un experimento representativo que se muestra en este contexto, los ratones se dividieron en grupos tratados y no tratados (5 ratones/grupo). Un cada ratón en el grupo tratado se preinyectó por vía intraperitoneal con inhibidor durante dos días. Posteriormente, todos los grupos fueron provocados con 10 quistes de *T. crassiceps* en 200  $\mu$ l de PBS 0,15 M. El tratamiento con inhibidor o placebo (PBS 0,15 M) se llevó a cabo cada día durante 30 días después de la provocación. Los quistes se dejaron solos (sin tratar) durante aproximadamente 5 meses, y luego se sacrificaron. Los quistes se contaron a través de la inspección visual en la autopsia. El porcentaje de protección se basó en la reducción del número total de quistes en comparación con los controles (que no recibieron tratamiento). Como se puede ver, los dos inhibidores superiores, Z-LLY-FMK y LLL-FMK continuaron protegiendo a los ratones al 95 % y 80 %, respectivamente. La conclusión de este estudio es que la protección de los animales contra la cisticercosis fue persistente, incluso durante un largo período de tiempo, lo que es un testimonio más de la eficacia de los inhibidores en los modelos. También es notable que no se observaron efectos secundarios para los tratamientos con Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK, posiblemente debido al hecho de que se

usaron dosis muy bajas del inhibidor. Por el contrario, se observaron efectos secundarios que incluyen bocio y problemas neurológicos en ratones dentro de los grupos de B-FA-CH2F y Z-LF-VSPH, donde VSPH es vinilsulfonafenilo.

5 **EJEMPLO 8. Demostración de que la cisteína proteasa era la diana de la inhibición específica por Z-LLY-FMK.**

Finalmente, es notable que una respuesta a la dosis de inhibición *in vitro* de la cisteína proteasa de *T. solium* se correlaciona con la protección *in vivo* en ratones BALB/c. Además, los quistes extirpados de los ratones tratados con el inhibidor menos eficaz, K-Pyr, no tenían células inmunitarias adherentes ni tegumento dañado. Estas observaciones sugieren que la inhibición de la cisteína proteasa de *Taenia* es el modo de acción para estos resultados de protección.

Inhibidor	% de inhibición de CP de <i>T. solium</i>	% de protección profiláctica de ratones BALB/c	% de protección terapéutica de ratones BALB/c	Células inmunitarias observadas mediante MEB en la superficies de quistes
LLL-FMK	100 %	100 %	60 %	N/d
LLY-FMK	97 %	85-97 %	n/d	Intensa
K-Pyr	80 %	40 %	n/d	No se observó ninguna

15 Tabla 4. Correlación entre inhibición *in vitro* de cisteína proteasa de *T. solium* y protección *in vivo*. "n/d" se refiere a datos no disponibles.

**EJEMPLO 9. Microscopía electrónica de barrido de superficies en quistes extirpados de ratones tratados con LLY-FMK que demuestran restos inmunológicos en la superficie tegumentaria.**

20 El examen por MEB de los pocos quistes supervivientes que se extrajeron de ratones tratados con LLY-FMK en el experimento de la figura 9, reveló coherencia con la teoría de los inventores sobre el papel de la cisteína proteasa en la interacción huésped/parásito. Por ejemplo, se había formulado la hipótesis de que la cisteína proteasa era una molécula parasitaria clave que permitía al quiste evadir la respuesta inmunitaria del huésped escindiendo los anticuerpos del huésped. Al inhibir la cisteína proteasa de *Taenia* con Z-LLY-FMK, se planteó la hipótesis de que la inmunoglobulina del huésped podría unirse a los parásitos e iniciar respuestas inmunológicas (por ejemplo, complemento a través de IgG2a), causando de este modo daños a la pared del quiste. Los resultados de MEB de los inventores confirmaron la presencia de células inmunitarias adherentes, que estaban presentes de manera concomitante cuando la pared del quiste parecía estar en proceso de destrucción (figura 9). Se identificaron macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y depósitos de colágeno en las superficies del quiste de ratones tratados, en comparación con su ausencia en quistes de ratones no tratados. La atrofia superficial general también fue evidente. Las microtriquias (microvellosidades) se desprendieron en regiones enteras o se acortaron significativamente en general, en comparación con quistes que se extirparon de ratones no tratados. Las rupturas en la integridad de la superficie del quiste también se observaron para los quistes extirpados de los ratones tratados. Mayor aumento reveló erosión tegumentaria cerca de las células inmunológicas. Los quistes extirpados de los ratones no tratados se caracterizaron por la ausencia de células inmunitarias, microtriquias intactas y más largas, y por la homogeneidad de la superficie del quiste. Estos resultados son coherentes con otros estudios, que han demostrado que los cisticercos viables en el músculo del cerdo y los extirpados de seres humanos en la autopsia muestran poca inflamación circundante en el huésped.

40 Como se ha mencionado anteriormente, el otro modo de acción del inhibidor podría ser la prevención de la inmunidad, por ejemplo, el inhibidor puede haber debilitado los quistes al bloquear la degradación de IgG de la cisteína proteasa, lo que podría ser una fuente importante de nutrientes para el parásito (Damian, 1987). Los quistes "debilitados" pueden, en consecuencia, haberse vuelto más susceptibles al ataque inmunitario, aunque parece que el huésped montó una respuesta inmunitaria contenida ya que no hubo efectos secundarios en los ratones tratados. La hipótesis de los inventores es que la consecuencia de estos procesos es la detención del crecimiento y la proliferación de quistes adicionales y, por lo tanto, una capacidad protectora de este inhibidor *in vivo*. Con el tratamiento del NCC humana como uno de los objetivos de los inventores (el otro es un profiláctico para la cisticercosis porcina), la perspectiva de una respuesta inmunológica *in situ* en el SNC después del tratamiento con inhibidores puede ser motivo de preocupación. Sin embargo, el uso de dicho medicamento junto con esteroides antiinflamatorios y posiblemente con el presente tratamiento de Albendazol, debería dar como resultado una mejora de dicha respuesta si realmente ocurriera.

**EJEMPLO 10. No toxicidad de la inactivación de proteasa**

55 Los resultados preliminares de los inventores han demostrado que LLL-FMK y LLY-FMK no son tóxicos para los esplenocitos de ratón BALB/c normal *in vitro*. En estos experimentos, se extrajeron esplenocitos de ratón y se trataron con inhibidor solo o inhibidor y Con-A (figura 10). Como puede verse, los inhibidores no inducen una

respuesta proliferativa (medida por incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina). Además, los inhibidores no afectan la capacidad de respuesta de los esplenocitos a Con-A.

Además, la tinción con azul de tripano de todas las células demuestra que todas las células de ratón son viables, incluso si el inhibidor está presente (figura 11). Estos estudios respaldan la observación de los inventores de que no se observaron efectos secundarios del huésped en ratones cuando fueron tratados con los inhibidores específicos *in vivo* (figura 8a y 8b).

Estos datos sugieren la viabilidad con la cual los inactivadores de proteasa a nivel del estado de transición, Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK, desarrollados *in vitro*, pueden funcionar *in vivo*. Su especificidad para la cisteína proteasa diana está atestiguada por el éxito de estudios de protección animal. Esto se demuestra por las observaciones de que en la inhibición *in vitro* de la cisteína proteasa se correlaciona con la protección *in vivo*. Además, como el inhibidor más potente *in vitro* demostró la respuesta inmunitaria más rigurosa y destructiva en quistes *in vivo*, estos resultados sugieren que los inhibidores fueron específicos para la cisteína proteasa diana y que la cisteína proteasa fue la diana. Además, los inhibidores mostraron selectividad *in vitro* como se demostró mediante la etapa VIII. La selectividad *in vivo* frente a la proteasa diana se demostró por el hecho de que solo se observaron efectos secundarios insignificantes en animales tratados con Z-LLL-FMK y Z-LLY-FMK durante un período a largo o a corto plazo.

#### 20 EJEMPLO 11: Fosfatasas

Las proteína fosfatasas ilustran la utilidad del método de la invención para desarrollar inhibidores e inactivadores para categorías de enzimas de corte distintas de las proteasas. Para cada enzima de corte, el núcleo peptídico se usa de la misma manera en cada etapa a como lo sería para el desarrollo de inhibidores de proteasa, excepto que los medios de detección se adaptan al grupo escindido por la enzima. De este modo, mientras que se emplearon cromóforos enlazados a un extremo peptídico para evaluar el grado de escisión para las fosfatasas, para las proteína fosfatasas, los restos de fosfato radiomarcados pueden servir como el grupo de detección, que pueden someterse a ensayo mediante un contador de centelleo. De manera similar, se puede usar un sistema de ensayo fluorescente para la detección de fosfatasa como se conoce en la técnica. Del mismo modo, para las glucoproteínas, pueden emplearse ensayos de glucosa en lugar de cromóforos para medir la escisión, aunque el núcleo peptídico en sí mismo permanece constante.

De este modo, en un ejemplo ilustrativo del uso del método con proteína fosfatasas, se ensaya una serie de monofosfotripeptidos contra la proteína fosfatasa diana en la etapa II. En otras partes del método, en cada punto donde se emplea el cromóforo en el sistema de proteasa, el grupo fósforo se usa para el sistema de proteína fosfatasa. Sin embargo, si se desea, pueden ser los mismos reactantes inactivadores para inhibidores de proteína fosfatasa que para inhibidores de proteasa.

Debe destacarse que, en muchos casos, el método completo que se ha ilustrado usando proteasas es aplicable sin modificación a otros tipos de enzimas de corte, y que la invención no está limitada por la elección del grupo escindible o por la manera de detectar la escisión.

#### REFERENCIAS

- Albery y Knowles, "Efficiency and evolution of enzyme catalysis," Angew Chem Int Ed Engl. Mayo de 1977; 16(5): 285-93.
- Appelt y col. "Design of enzyme inhibitors using iterative protein crystallographic analysis," J Med Chem. Julio de 1991; 34(7): 1925-34.
- Baldwin y Rose. "Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states," Trends Biochem Sci. Febrero de 1999; 24(2): 77-83.
- Berger y Schechter. "Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors," Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 12 de febrero de 1970; 257(813): 249-64.
- Bergmann y col., J. Biol. Chem. 1950; 196: 693.
- Cannon y col., "A perspective on biological catalysis," Nat Struct Biol. Octubre de 1996; 3(10): 821-33.
- Cleland, "Isotope effects: determination of enzyme transition state structure," Methods Enzymol. 1995; 249: 341-73.
- Damian, "The exploitation of host immune responses by parasites," J Parasitol. Febrero de 1987; 73(1): 3-13.
- Del Brutto y col., "Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal," Clin Infect Dis. Octubre de 1993; 17(4): 730-5.
- Erickson y col. "Design, activity, and 2.8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease," Science. 3 de agosto de 1990; 249(4968): 527-33
- Fersht. 1985. Enzyme Structure and Mechanism. Ch. 12. W.H. Freeman and Company. Nueva York
- Fersht y col., "Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism," Biochemistry. 8 de marzo de 1988; 27(5): 1581-7.
- Hayunga y col., "Evidence for selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of Taenia taeniaeformis," J Parasitol. Agosto de 1989; 75(4): 638-42.
- Jencks, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. LII: 65-73 (1987).

- Johnson, y col., "Changes in absorption spectrum and crystal structure of triose phosphate isomerase brought about by 2-phosphoglycollate, a potential transition state analogue," J Mol Biol. 14 de enero de 1970; 47(1): 93-100.
- Kamphuis y col., "Structure of papain refined at 1.65 Å resolution," J Mol Biol. 25 de octubre de 1984; 179(2): 233-56.
- Kraut, J., "How do enzymes work?" Science. 28 de octubre de 1988; 242(4878): 533-40.
- 5 Kreevoy y Truhlar. Techniques of Chemistry. (C.f. Bernasconi, Ed).6:14-97. Wiley, Nueva York, Nueva York.
- Kubinyi, "Chance favors the prepared mind--from serendipity to rational drug design," J Recept Signal Transduct Res. Enero-julio de 1999; 19(1-4): 15-39
- Ladbury, J y col., "Turning up the heat on rational drug design," Biotechnology (N Y). Noviembre de 1994; 12(11): 1083-5.
- 10 Lahana, "How many leads from HTS?" Drug Discov Today. Octubre de 1999; 4(10): 447-448.
- Ma y col., "Transition-state ensemble in enzyme catalysis: possibility, reality, or necessity?" J Theor Biol. 21 de abril de 2000; 203(4): 383-97.
- McKerrow y col., "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections," Bioorg Med Chem. Abril de 1999; 7(4): 639-44.
- 15 Menger, "Analysis of ground-state and transition-state effects in enzyme catalysis," Biochemistry. 16 de junio de 1992; 31(23): 5368-73.
- Murphy, "Revisiting ground-state and transition-state effects, the split-site model, and the "fundamentalist position" of enzyme catalysis," Biochemistry. 11 de abril de 1995; 34(14): 4507-10.
- 20 Parril, A. y Reddy, R. 1999. Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications. ACS Symposium Series 719. Oxford University Press.
- Pauling, 1946. Chem. Eng. News. 24: 1375.
- Pauling, 1948. Nature. 161: 707.
- Polgar, "The different mechanisms of protease action have a basic feature in common: proton transfer from the attacking nucleophile to the substrate leaving group," Acta Biochim Biophys Hung. 1988; 23(3-4): 207-13.
- 25 Radzicka y Wolfenden. 1996. Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism. 2ª ed. (Purich, Ed). San Diego CA Págs. 273-298.
- Roberts y col., "Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors," Science. 20 de abril de 1990; 248(4953): 358-61.
- Schowen. 1978. Transition States of Biochemical Processes (Gandour, R.D., and Schowen, R.L., Eds.) Capítulo 2, Plenum, Nueva York.
- 30 Service, "Structural genomics offers high-speed look at proteins," Science. 17 de marzo de 2000; 287(5460): 1954-6.
- Szedlacsek y col., "Kinetics of slow and tight-binding inhibitors," Methods Enzymol. 1995; 249: 144-80.
- Tsai y Jordan, 1993. J. Phys. Chem. 97(11): 11227-11237.
- 35 Threadgold y col., "Taenia crassiceps: regional variations in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus' tegument," J Exp Parasitol. Febrero de 1983; 55(1): 121-31.
- Tsang y col., Parasitol. Today, 11, 124-126 (1995).
- Vacca y col., "L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor," Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de abril de 1994; 91(9): 4096-100.
- 40 Wang y col., "The double catalytic triad, Cys25-His159-Asp158 and Cys25-His159-Asn175, in papain catalysis: role of Asp158 and Asn175," Protein Eng. Enero de 1994; 7(1): 75-82.
- Wolfenden, "Conformational aspects of inhibitor design: enzyme-substrate interactions in the transition state," Bioorg Med Chem. Mayo de 1999; 7(5): 647-52.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un inhibidor de enzima de corte peptídico que comprende:
  - 5 a. realizar un ensayo de sustrato de baja kcat poniendo en contacto cada uno de una pluralidad de sustratos con una enzima de corte peptídico diana para identificar al menos un sustrato peptídico de alta kcat y al menos un sustrato peptídico de baja kcat que es poco escindible por la enzima de corte peptídico diana, en el que el sustrato peptídico de baja kcat tiene una tasa de escindibilidad de menos del 35 % de la tasa de escindibilidad del sustrato más altamente escindido en el ensayo; y
  - 10 b. realizar un ensayo de unión competitiva al sitio activo de la enzima usando la enzima de corte peptídico diana, al menos un sustrato de alta kcat identificado en la etapa a. y al menos un sustrato de baja kcat identificado en la etapa a. e identificar de este modo al menos un sustrato de baja kcat que es un inhibidor de la unión al sitio activo, que inhibe la escisión de al menos un sustrato de alta kcat por la enzima de corte peptídico diana mediante unión al sitio activo de la enzima de corte peptídico diana, identificando de este modo un inhibidor de
    - 15 enzima de unión al sitio activo de baja kcat que comprende un núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el sustrato de baja kcat tiene una tasa de escindibilidad de menos del 20 % de la tasa de escindibilidad del sustrato más altamente escindido en el ensayo.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que el sustrato de baja kcat tiene una tasa de escindibilidad de menos del 10 % de la tasa de escindibilidad del sustrato más altamente escindido en el ensayo.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el ensayo de unión competitiva al sitio activo de la enzima comprende la valoración de la unión del sustrato a la enzima empleando un método espectroscópico seleccionado entre el grupo
  - 25 que consiste en espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta-visual, espectroscopía fluorométrica, espectroscopía fosforométrica, espectroscopía de masas y espectroscopía de microondas.
5. El método de la reivindicación 1, en el que realizar el ensayo de sustrato de baja kcat comprende valorar la kcat del sustrato por la enzima empleando un método espectroscópico seleccionado entre el grupo que consiste en
  - 30 espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta-visual, espectroscopía fluorométrica, espectroscopía fosforométrica, espectroscopía de masas y espectroscopía de microondas.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas adicionales de seleccionar un análogo funcional y estructural del inhibidor de baja kcat y realizar un ensayo de inhibición usando la enzima de corte peptídico diana y al menos un análogo estructural del inhibidor de baja kcat para identificar al menos un inhibidor de baja kcat.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, que comprende además valorar la selectividad del inhibidor de baja kcat con respecto a enzimas de la misma clase que la enzima de corte peptídico diana con el fin de determinar si el inhibidor es selectivo para la enzima de corte peptídico diana.
- 45 8. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar condiciones óptimas de escisión del sustrato por la enzima de corte peptídico diana antes de poner en contacto la enzima de corte peptídico diana con la pluralidad de sustratos.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de enzima de corte peptídico comprende un núcleo de aminoácidos o un núcleo peptídico que contiene entre 1 y 9 residuos de aminoácidos.
  - 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico contiene entre 1 y 6 residuos de aminoácidos.
  11. El método de la reivindicación 9, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico consiste en 1, 2 o 3
    - 55 residuos de aminoácidos.
  12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende uno o más residuos del grupo que consiste en L-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos derivatizados y aminoácidos modificados.
    - 60 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico está compuesto enteramente o en parte por análogos peptídicos seleccionados entre el grupo que consiste en: beta-aminoácidos, peptoides y aminoácidos en los que uno o más átomos han sido sustituidos por diferentes elementos atómicos o por grupos funcionales.
      - 65 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo

peptídico comprende dos o más aminoácidos enlazados mediante un enlace diferente de un enlace peptídico.

- 5 15. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima de corte peptídico diana se proporciona como una enzima purificada o en una mezcla en bruto.
16. El método de la reivindicación 1, que comprende además, antes de realizar el ensayo de unión al sitio activo de la enzima, determinar un intervalo de pH óptimo de aproximadamente 2 unidades de pH para la reacción de escisión.
- 10 17. El método de la reivindicación 1, que comprende realizar un ensayo de unión competitiva en un número seleccionado de sustratos de baja kcat, en el que realizar el ensayo de unión competitiva comprende, para cada sustrato de baja kcat seleccionado:
- 15 realizar un primer ensayo de unión competitiva usando la enzima de corte peptídico diana, una primera población de sustratos de alta kcat, y el sustrato de baja kcat seleccionado para identificar una pluralidad de inhibidores de baja kcat;
- 20 para cada inhibidor de baja kcat, realizar un segundo ensayo de unión competitiva usando la enzima de corte peptídico diana, una segunda población de sustratos de alta kcat y el inhibidor de baja kcat, en el que la segunda población de sustratos de alta kcat incluye un mayor número de sustratos que la primera población de sustratos de alta kcat; y
- 25 cuantificar el efecto inhibitor de los inhibidores de baja kcat para dar una lista ordenada de inhibidores de baja kcat.
18. El método de la reivindicación 1, en el que un grupo de bloqueo está ubicado en un sitio seleccionado entre la siguiente combinación: el extremo C del núcleo peptídico; el extremo N del núcleo peptídico.
- 30 19. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima se selecciona entre el grupo que consiste en: proteasas, proteína fosfatasa, esterasas, enzimas que escinden cadenas laterales basadas en sacáridos de proteínas, enzimas que escinden lipoproteínas o proteínas funcionalizadas con lípidos y enzimas que escinden cofactores de proteínas.
20. El método de la reivindicación 1, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende uno o más residuos del grupo que consiste en L-aminoácidos, D-aminoácidos, aminoácidos derivatizados y aminoácidos modificados.
- 35 21. El método de la reivindicación 1, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico está compuesto enteramente o en parte por análogos peptídicos seleccionados entre el grupo que consiste en: beta-aminoácidos, peptoides y aminoácidos en los que uno o más átomos han sido sustituidos por diferentes elementos atómicos o por grupos funcionales.
- 40 22. El método de la reivindicación 1, en el que el núcleo de aminoácidos o núcleo peptídico comprende dos o más aminoácidos enlazados mediante un enlace diferente de un enlace peptídico.

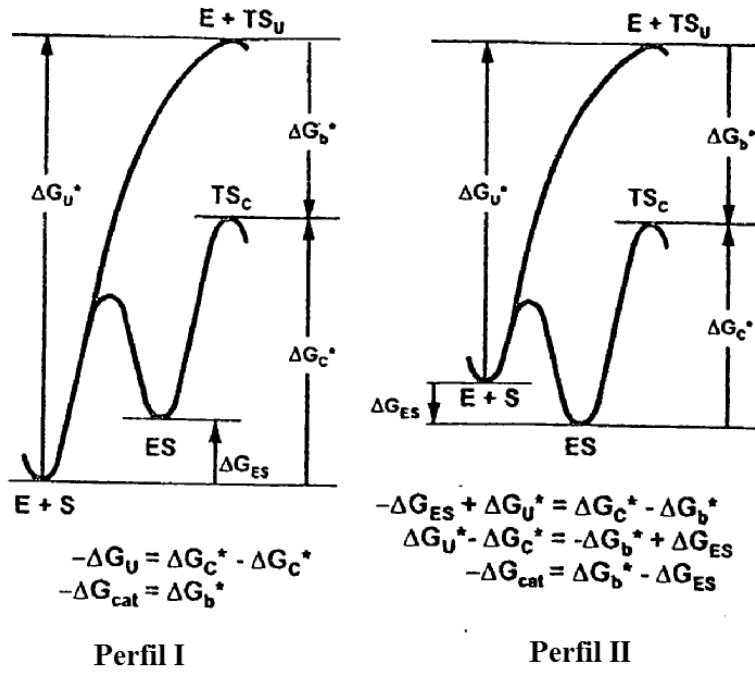


Figura 1a

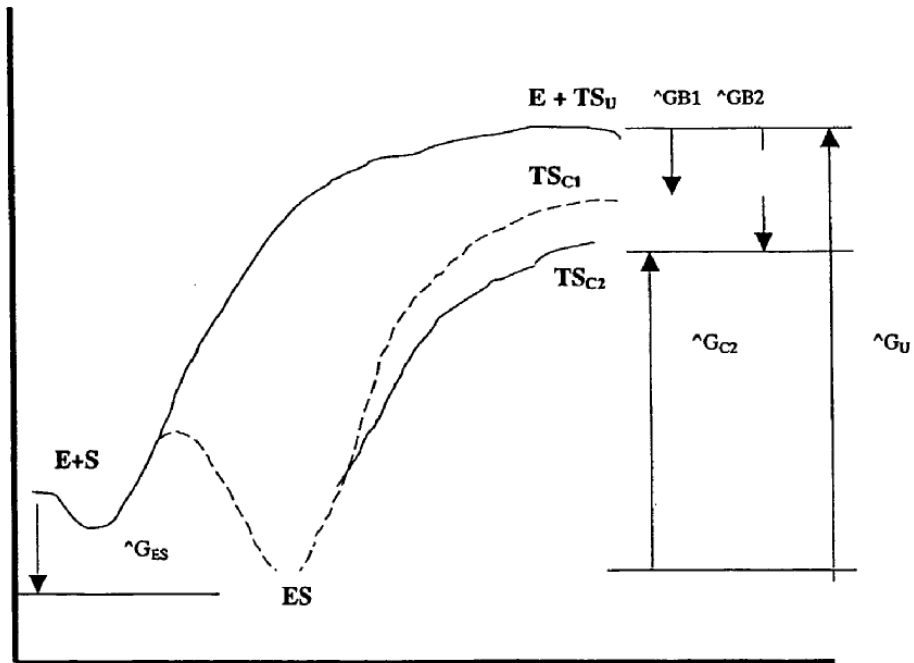


Figura 1b



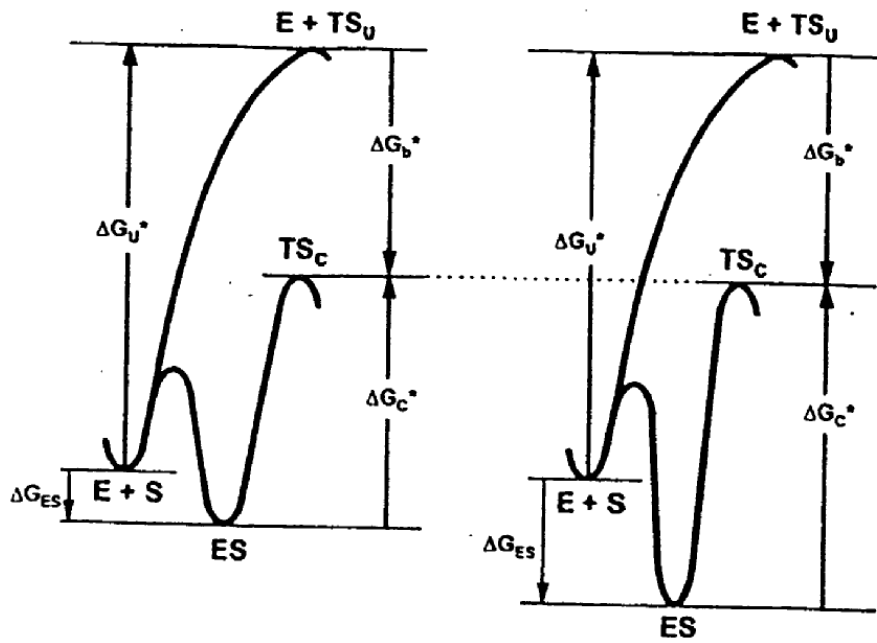


Figura 1c

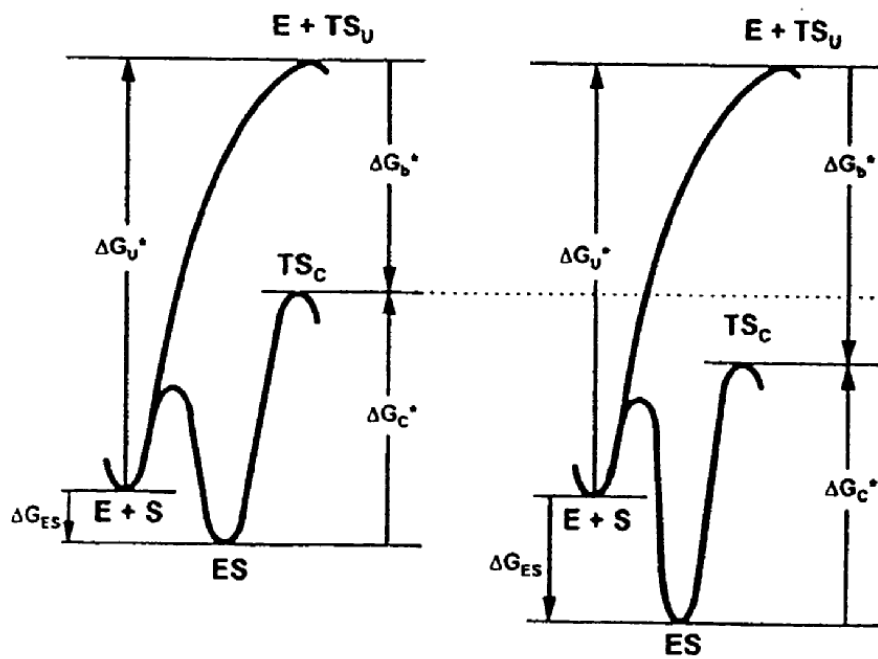


Figura 1d

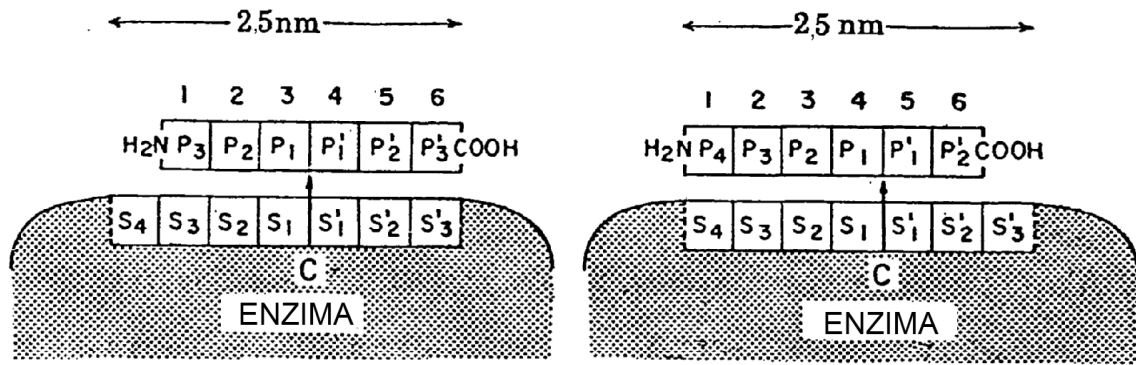
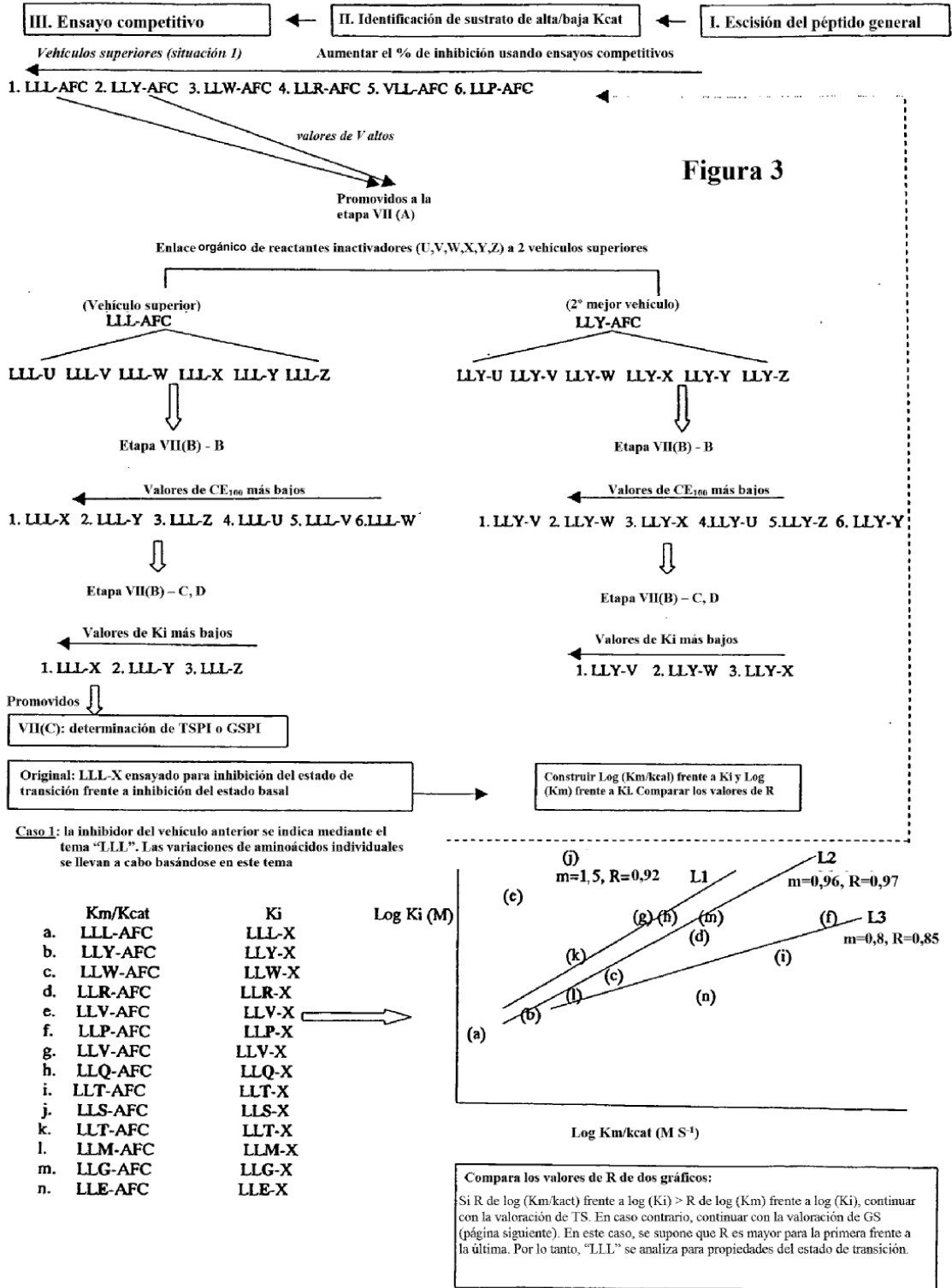


Figura 2



**Figura 3**

Valoraciones de TSS o GSS. (En este experimento se supone que se busca una valoración del estado de transición)

- (1) Determinación de TSS (o GSS) para (X) series =  $R/(ABS(1-M)*1/P)$   
 La línea 1 utiliza puntos a,k,g,h puntuación (L1) =  $0,92/[ABS(1-1,5)*(1/4)] = 7,36$   
 La línea 2 utiliza puntos a,b,l,c,d,m puntuación (L2) =  $0,96/[ABS(1-0,96)*(1/6)] = 14,4$   
 La línea 3 utiliza puntos a,b,l,c,d,n,l,f puntuación (L3) =  $0,88/[ABS(1-0,91)*(1/8)] = 7,82$

Se proporcionan 3 ejemplos de línea (son posibles más). Es virtualmente imposible alcanzar una pendiente de 1. Si se alcanza una pendiente de 1, puede usarse un valor equivalente a 0,99 para prevenir la división por 0.

Como se observa, la TSS (o GSS) es una combinación de tres variables, pendiente, regresión y el número de puntos. La mejor línea es la Línea 2 y se empleará para la TSS (o GSS). Por lo tanto, a,k,l,c,d,m son los inhibidores más cercanos que permiten inhibición análoga del estado de transición.

**Caso 2:** se usan indicios para realizar sustituciones. Por ejemplo, si se observa que L es predominante en vehículos inhibidores en P2, L en P2 puede ser un candidato viable. Análogamente, si V en P1 se observó en el 50 % de los vehículos que inhibían al 50 % o más, entonces V en P1 puede ser una buena sustitución. Por lo tanto, estos indicios se basan completamente en los aminoácidos en diferentes motivos.

**Caso 3:** aleatorio. En caso de que no haya indicios disponibles, las mutaciones se realizan en sitios aleatorios.

**Caso 4:** truncamiento o alargamiento. Puede ser deseable reducir el número de aminoácidos o aumentar el número de aminoácidos. Por ejemplo, se puede intentar Z-LL o Z-LLL puede ser otra posibilidad.

Original: LLL-Y y LLL-Z ensayados para TSS

LLL-Y: par de muestra		I
LLL-AFC; LLL-Y		11,21
LLY-AFC; LLY-Y		8,42
LLT-AFC; LLT-Y		8,27
LLR-AFC; LLR-Y		7,31
LLW-AFC; LLW-Y		6,21
LLL-Z: par de muestra		I
LLL-AFC; LLL-Z		10,12
LLS-AFC; LLS-Z		6,11
LLW-AFC; LLW-Z		4,32
LLY-AFC; LLY-Z		3,12
LLR-AFC; LLR-Z		2,33

(2) Determinación de la puntuación de inhibidor para compuestos:

- $I = \text{Log}(TSS/(Ki))$   
 a (LLL-X):  $\text{Log}(14,4/10^{-12}) = 13,16$   
 b (LLY-X):  $\text{Log}(14,4/10^{-10}) = 11,15$   
 l (LLM-X):  $\text{Log}(14,4/10^{-9}) = 9,15$   
 c (LLW-X):  $\text{Log}(14,4/10^{-8}) = 7,15$   
 d (LLR-X):  $\text{Log}(14,4/10^{-7}) = 5,15$   
 m (LLG-X):  $\text{Log}(14,4/10^{-6}) = 2,16$

Clasificación de TSPI original usando I:

Clasific. TSPI	I	
1. LLL-X	13,16	Clasificaciones originales (LLY-X es accidental)
2. LLL-Y	11,21	
3. LLY-X	11,15	
4. LLL-Z	10,12	
5. LLM-X	9,15	Clasificaciones adicionales
6. LLY-Y	8,42	
7. LLW-X	8,31	
8. LLT-Y	8,27	

Reordenación molecular de reactante inactivador. LLL-X. X se reordena atómicamente. Los átomos son sustituidos, o algo similar. Por ejemplo, si X=fluorometilcetona, el flúor podría sustituirse con un cloro.

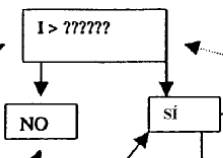
O  
 Reordenación molecular de vehículo, mantener el reactante inactivador constante.

X. refinamiento adicional  
 1. Extensión del vehículo en subsitios enzimáticos adicionales.  
 2. Modificación estereoquímica en el vehículo o el reactante inactivador.

Ensayar un amplio espectro de más reactantes inactivadores, por ejemplo, U y V en LLL para inhibición del estado de transición (o inhibición del estado basal si este es el caso)

Descubrir puntuaciones de inhibidor para el núcleo del 2º mejor vehículo.  
 Comparar LLY-V, LLY-W, LLY-X

Valoración del estado basal  
 Ensayar la inhibición del estado basal (GS) de LLL-X, LLL-Y, LLL-Z. Repetir experimentos idénticos a los ensayos para TSS de LLL-X, LLL-Y, LLL-Z, excepto gráfico de log Km frente a log Ki.  
 Calcular puntuación  $I = \text{log}(GSS/Ki)$   
 Si I es baja, la siguiente opción es continuar el ensayo de la inhibición del estado basal de más reactantes inactivadores. Si I sigue siendo baja, se puede ensayar el núcleo del 2º mejor vehículo (LLY-V, LLY-W, LLY-X)



Reintroducir determinación de TSPI o GSPI

- VIII. Sustrato natural
- IX. Ensayo de escisión diferencial
- X. Refinamiento
- XI. Biblioteca combinatoria
- XII. Cristalización
- XIII. Adición de moléculas de suministro

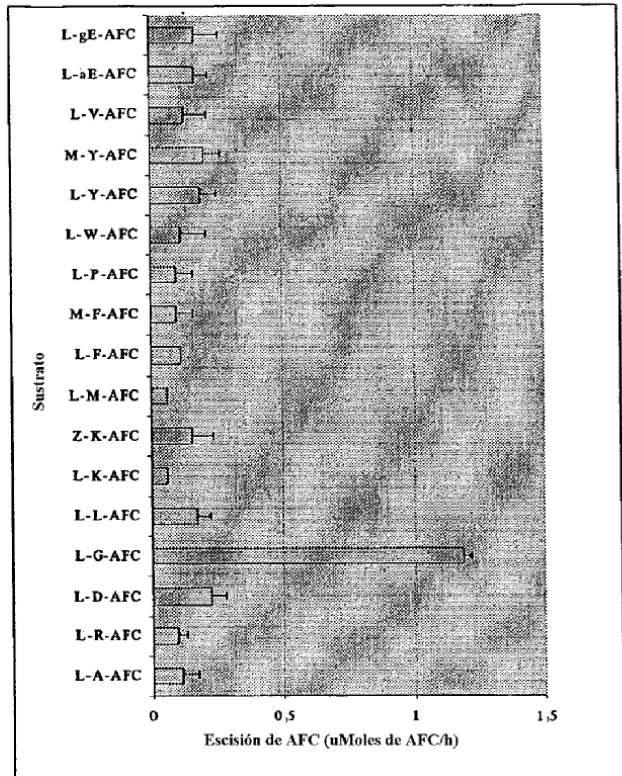
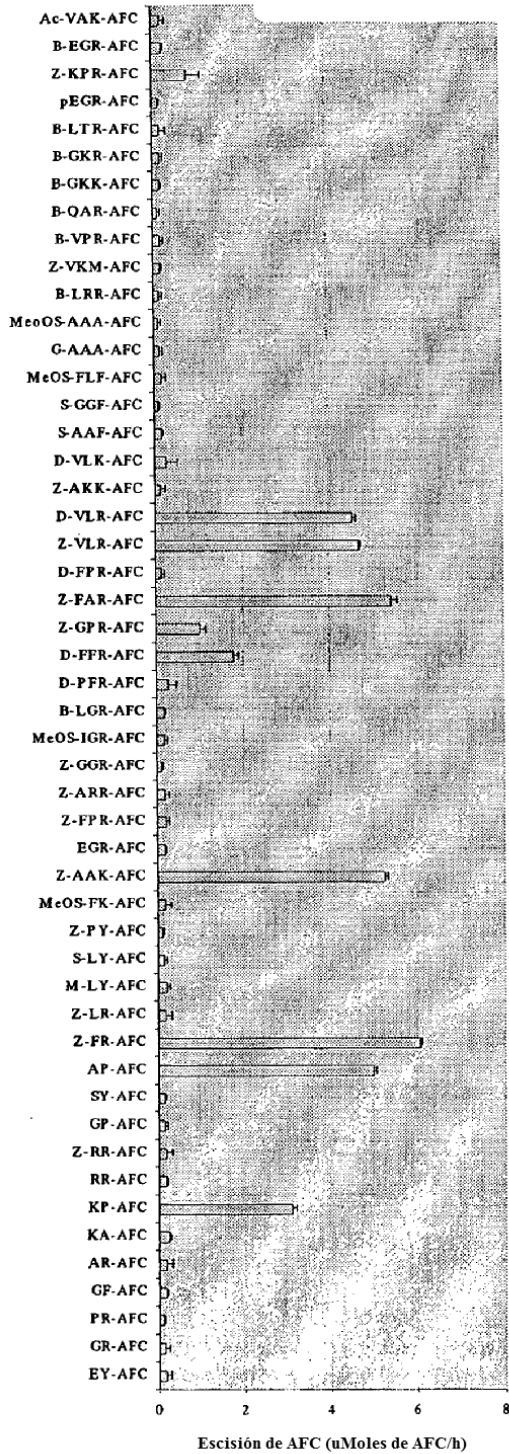


Figura 4a

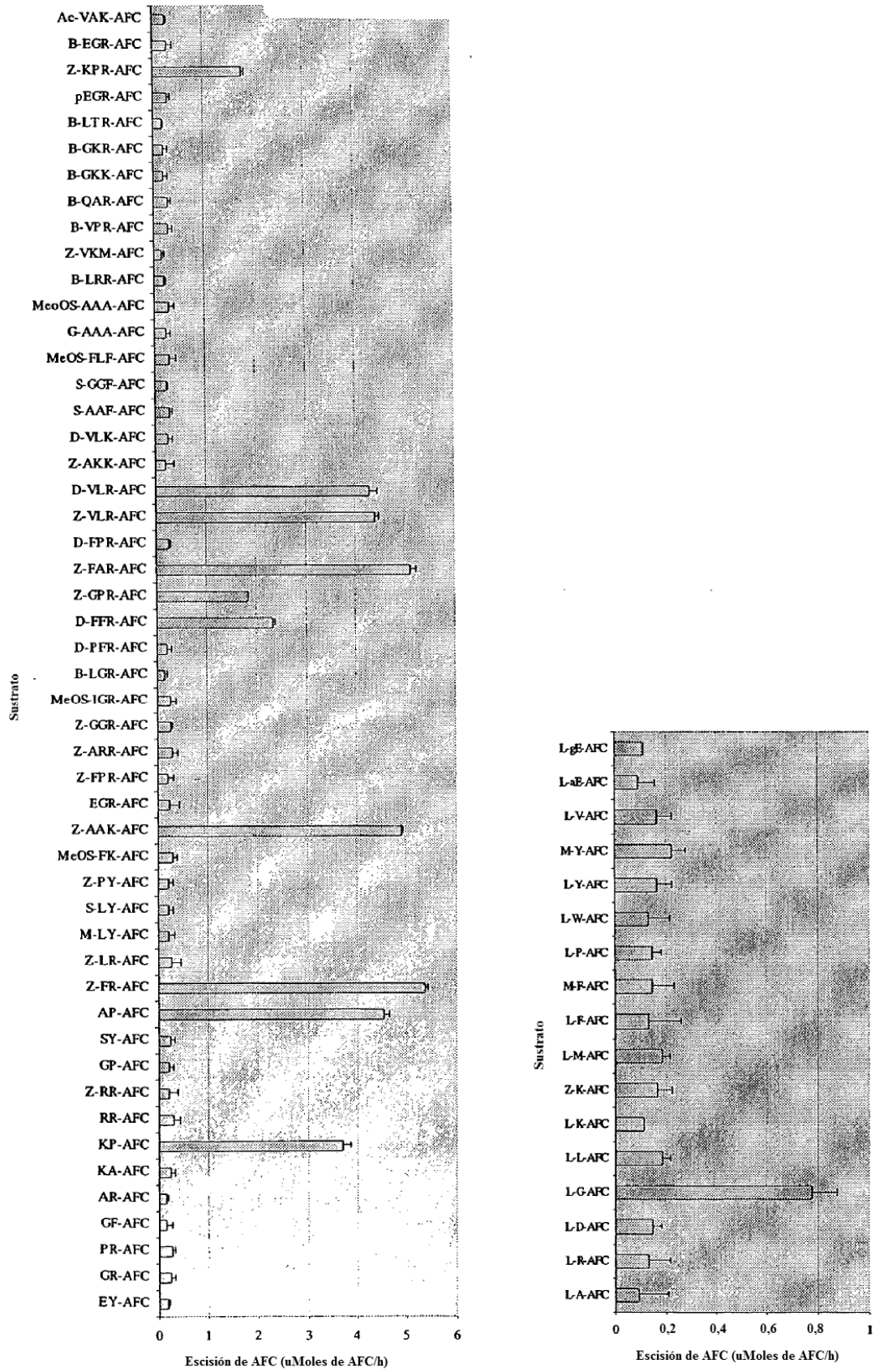


Figura 4b

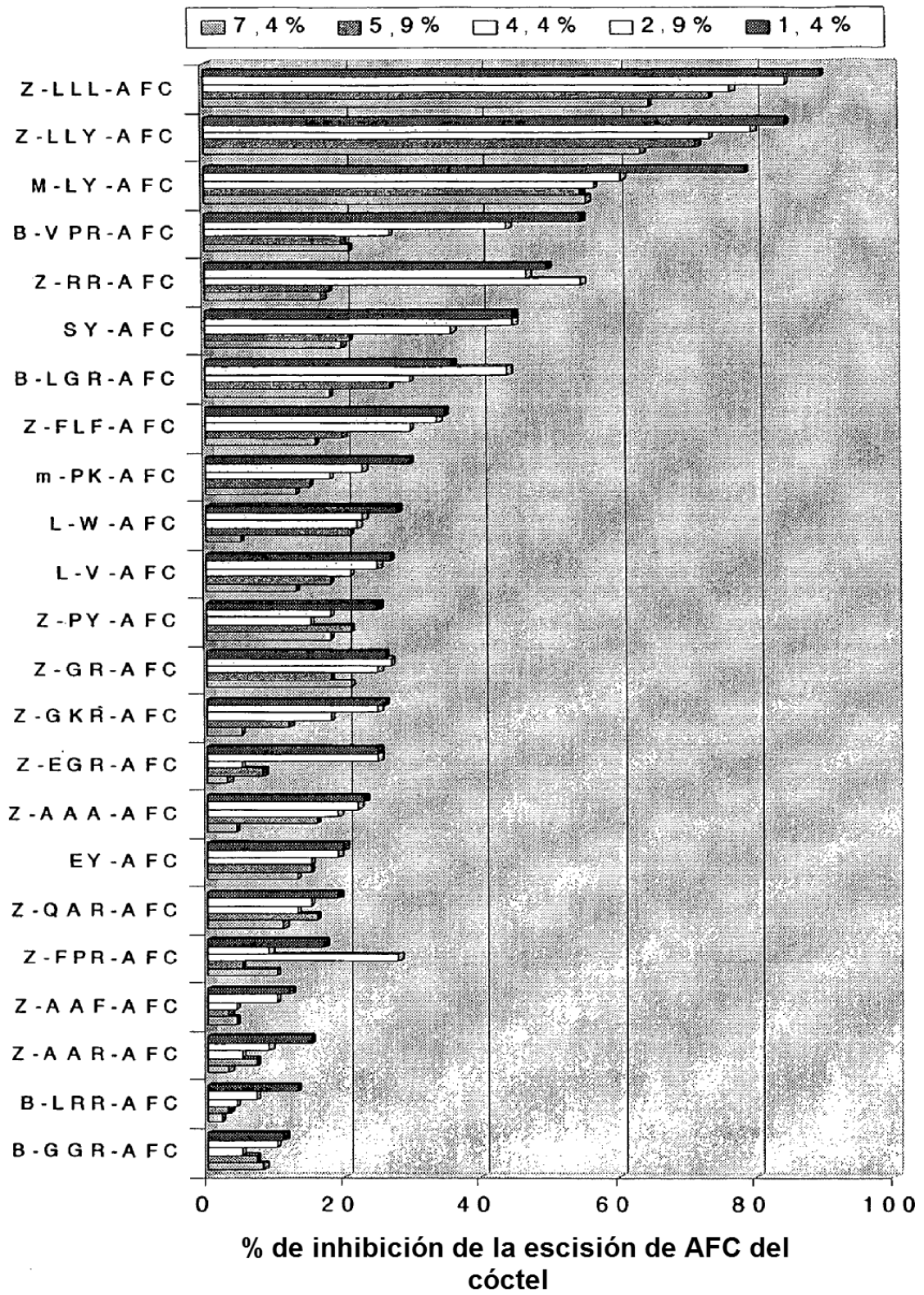


Figura 5a

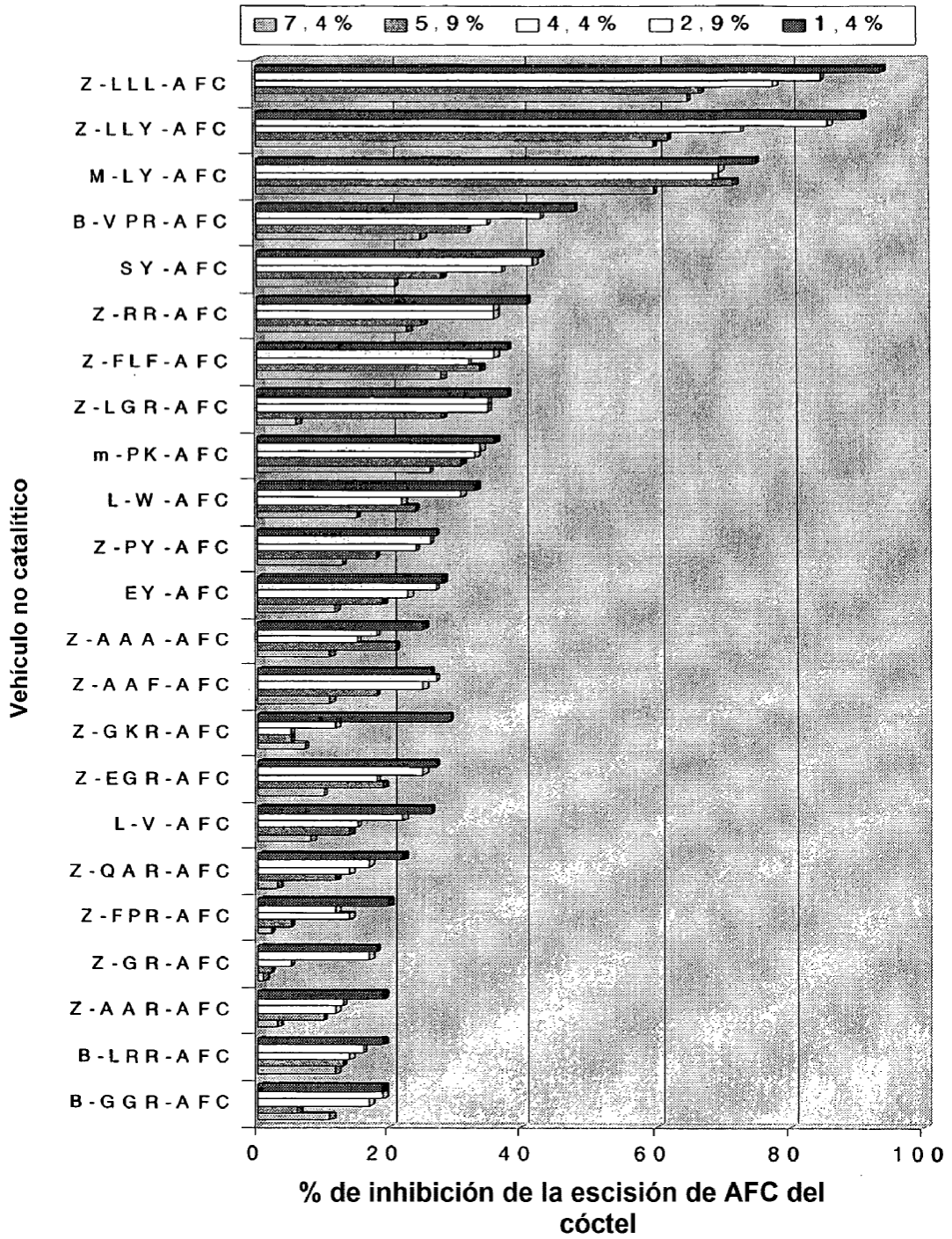
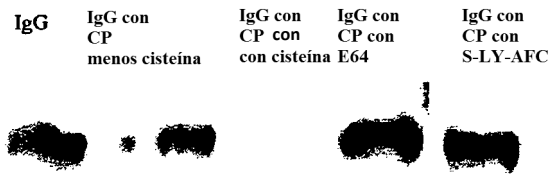
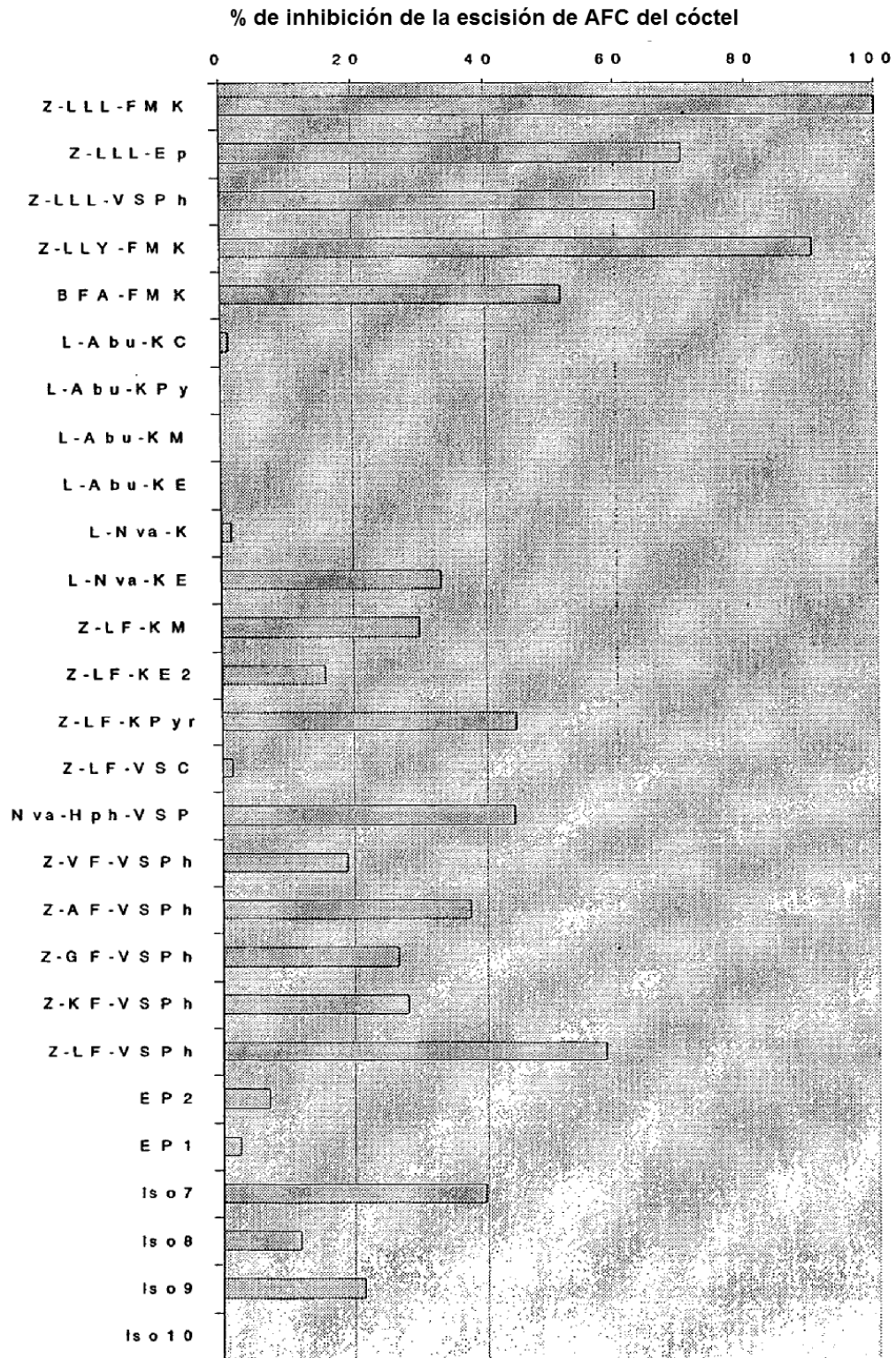


Figura 5b

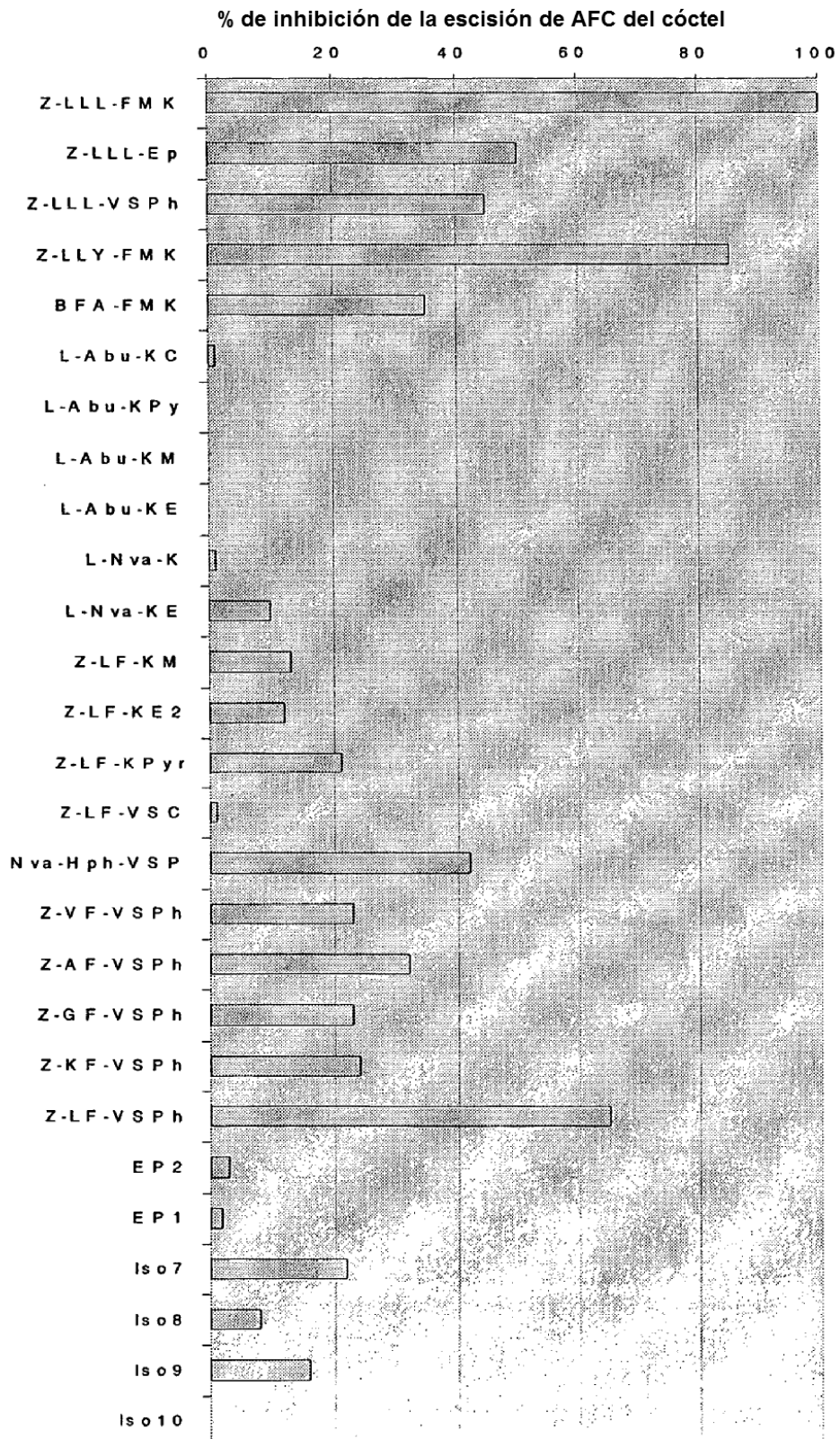




**Figura 6**



**Figura 7a**



**Figura 7b**

Controles no tratados	n.º de quiste	Promedio	SD	% de prot.	n.º de ML	% de ML	Promedio
Ratón 1	240	197,7	34,3		30	12,5%	14,4%
Ratón 2	156				16	10,3%	
Ratón 3	197				40	20,3%	
Controles tratados							
Ratón 4	7	21,3	10,2	96,5%	4	57%	51%
Ratón 5	30			84,8%	13	43%	
Ratón 6	27			86,4%	14	52%	

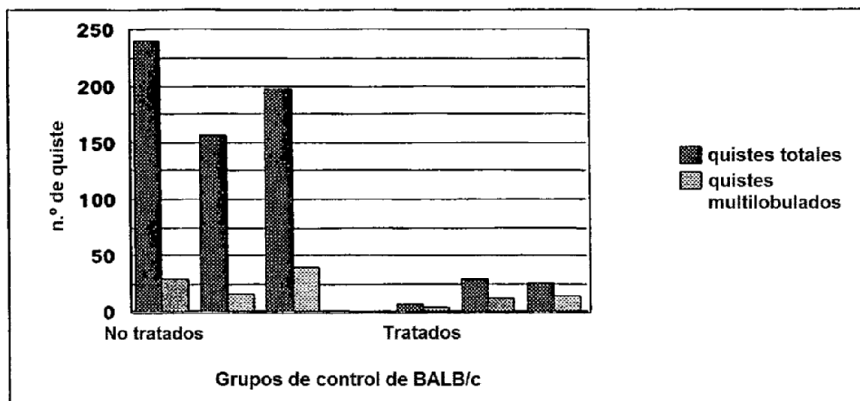


Figura 8a

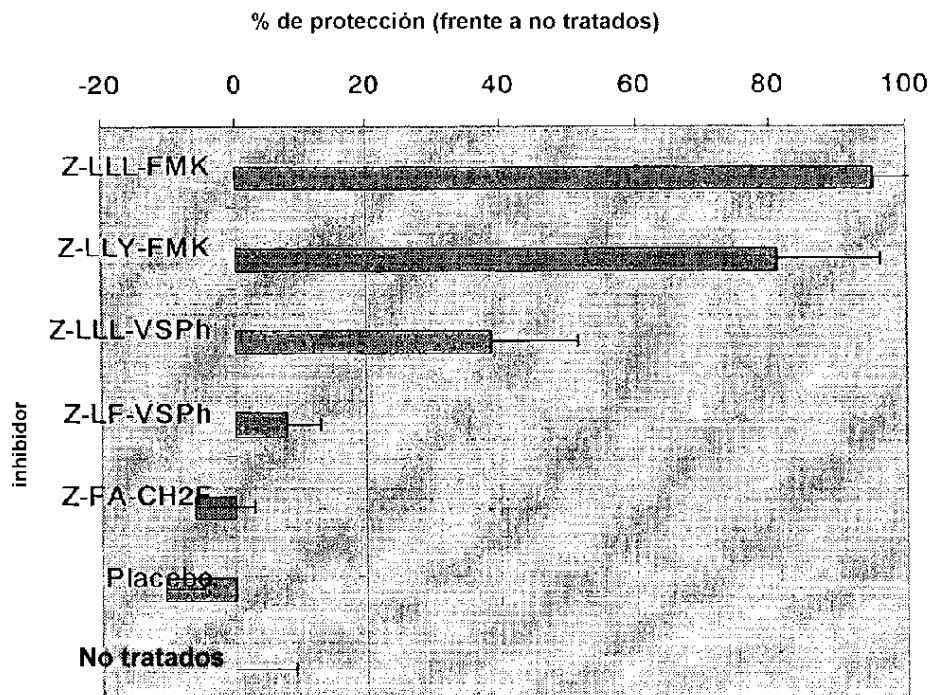


Figura 8b

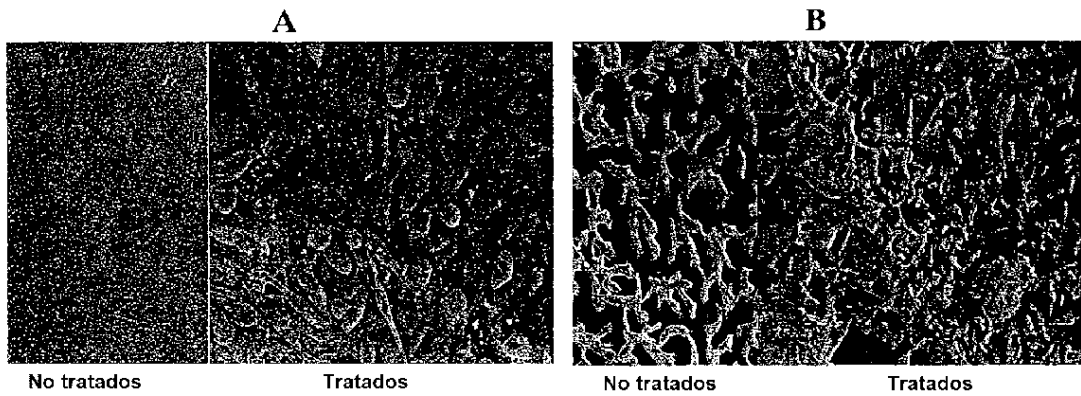


Figura 9

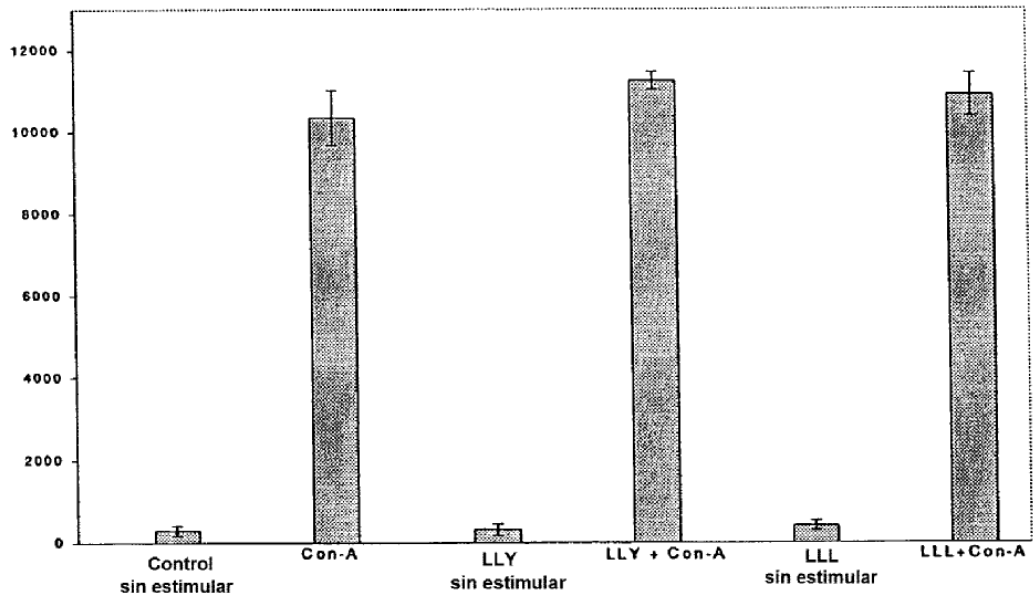


Figura 10

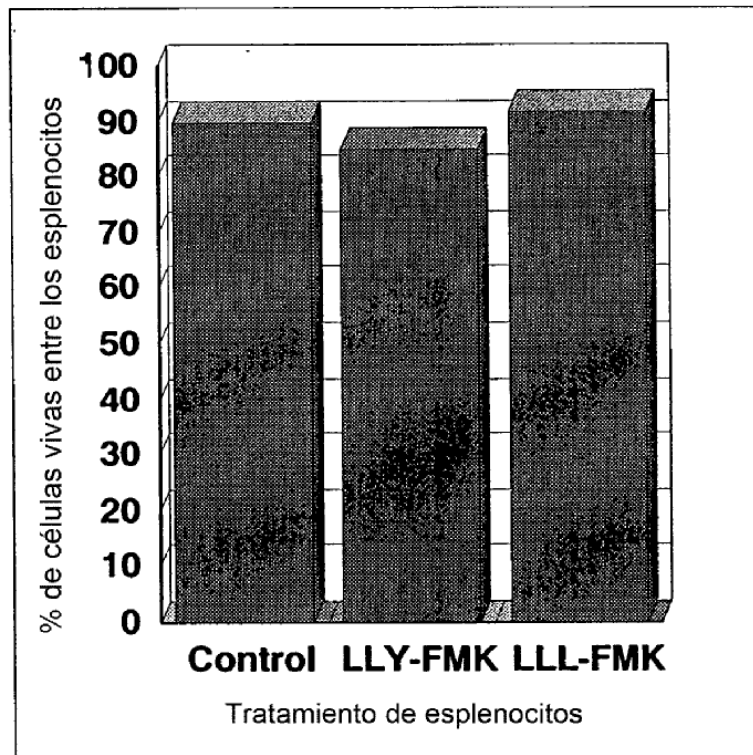


Figura 11