



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**INHIBIDORES REVERSIBLES E IRREVERSIBLES  
DE PROTEASOMA: DISEÑO Y MECANISMO DE  
ACCIÓN**

Autor: ALBERTO ROYO VILLA

Tutor: MÓNICA SÖLLHUBER KRETZER

Convocatoria: JUNIO

## **Resumen**

El proteasoma es una proteasa altamente sofisticada diseñada para llevar a cabo la hidrólisis de ciertas proteínas que participan en procesos de gran relevancia a nivel celular. Hay algunas patologías de carácter grave que se producen por desajustes en estos procesos, como es el cáncer o enfermedades de origen inmunitario como puede ser el lupus. Es por esto, que se ha invertido mucho esfuerzo en la investigación y desarrollo de diferentes grupos de inhibidores de este complejo, con el fin de aumentar el arsenal terapéutico para hacer frente a este tipo de procesos patológicos. En la actualidad, estos esfuerzos se han visto recompensados con la aprobación de tres inhibidores del proteasoma como posible tratamiento frente al mieloma múltiple.

## **Abstract**

The proteasome is a highly sophisticated protease designed to carry out the hydrolysis of certain proteins that take part in processes of big relevancy at cellular level. There are some serious pathologies that take place by imbalance in these processes, like cancer or immunological diseases such as lupus. For this reason, a lot of efforts have been invested in the research and development of different inhibitors of this complex, in order to increase the therapeutic arsenal that faces up this type of pathological processes. At present these efforts have been rewarded with the approval of three proteasome inhibitors like possible treatment against multiple myeloma.

## **Introducción**

En eucariotas existen dos vías de degradación proteica que son la vía vacuolar y la vía citoplasmática, en la cual se encuentra el sistema ubiquitina-proteasoma. En la vía vacuolar participan los lisosomas, endoplasmas y el retículo conformando un sistema de degradación proteica que permite la degradación de macromoléculas tanto endógenas como exógenas, con diferentes fines como es el de reciclaje o protección. A diferencia del anterior sistema, el sistema ubiquitina-proteasoma va a etiquetar y degradar selectivamente proteínas de vida corta con una gran transcendencia celular y proteínas con errores en su plegamiento cuya acumulación puede inducir procesos citotóxicos, teniendo de esta forma un papel crucial en la homeostasis proteica y celular. (1)

La señalización o marcaje previo de las proteínas por el proteasoma se realiza mediante un proceso denominado ubiquitinación. Este proceso consiste en la unión de forma seriada de moléculas de ubiquitina a la proteína sustrato.

El proceso de ubiquitinación no es proceso irreversible, existen familias enzimáticas (DUB's) capaces de realizar el proceso inverso o desubiquitinación, siendo una de las principales funciones la de reciclaje de estas moléculas o bien, maduración de estas moléculas. (2)(3)

## Antecedentes

El descubrimiento del papel del proteasoma humano como regulador de procesos clave a nivel celular es reciente, tanto es así, que los investigadores Aarón Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose recibieron el premio Nobel de Química en 2004.

### Estructura y ensamblaje del proteasoma

El proteasoma es el miembro más grande y complejo de la superfamilia de las proteasas ATP dependientes que se pueden encontrar en todos los dominios de la vida.

Este complejo proteico consta de un peso atómico de 2.6 MDa, un aparente coeficiente de sedimentación de 26S (en realidad es de 30S si se tiene en cuenta el montaje de las dos unidades regulatorias simétricas), y se puede diferenciar un núcleo proteolítico 20 S (Core Particle) con forma de barril que consta de 28 subunidades codificadas por 14 genes, las cuales están cubiertas o delimitadas, generalmente, por dos unidades regulatorias 19 S (Regulatory Particles) que a su vez comprenden 19 subunidades. (4)

El núcleo proteolítico 20 S está conformado por 4 anillos heteroheptaméricos apilados unos sobre otros. Los anillos internos contienen 7 subunidades  $\beta$  diferenciadas ( $\beta$ 1-  $\beta$ 7) y los dos externos contienen 7 subunidades  $\alpha$  también diferenciados ( $\alpha$ 1-  $\alpha$ 7). Las subunidades  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5 de los anillos internos contienen los sitios activos y cada sitio se une o adhiere a residuos aminoacídicos preferenciales. En mamíferos, se han descubierto 4 anillos  $\beta$  adicionales que son:  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i,  $\beta$ 5i y  $\beta$ 5t, donde el la letra "i" y "t" se corresponde al inmunoproteasoma y el timoproteasoma. (2)(5)

De esta forma, se conoce que en nuestro organismo se diferencian tres clases de centros catalíticos 20 S gracias a estas pequeñas variaciones en las subunidades  $\beta$ , existiendo el proteasoma constitutivo (el más general o extendido en el organismo), el inmunoproteasoma (iCP) y el timoproteasoma (tCP). El tCP se expresa en las células epiteliales del timo cortical y contiene las subunidades  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i y  $\beta$ 5t, el iCP ( $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i,

$\beta 5i$ ) va a estar expresado en tejidos específicos del sistema inmune, así como en monocitos y linfocitos. Algunas citocinas como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) durante la inflamación, van a inducir la expresión y sustitución de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  por las subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$  en células cuyo origen no es hematopoyético.

Estas diferenciaciones en el núcleo catalítico 20S permiten, por ejemplo, que el iCP genere patrones de rotura o división de sus sustratos que estimulan o refuerzan a la clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que median la presentación antigénica a las células T. Otro ejemplo, es el incremento del repertorio de péptidos propios que beneficia al desarrollo de las células-t en el timo, gracias al timoproteasoma. (2)

La entrada a la “maquinaria” catalítica del CP esta normalmente ocluida por colas N-terminales de las subunidades o anillos  $\alpha$ . Estas colas terminales conforman una especie de puerta que debe ser abierta para que se produzca la entrada del sustrato al proceso proteolítico. Para que se produzca la apertura, existen activadores o moduladores del proteasoma, así como, las subunidades reguladoras 19S (RP) que interaccionan con la superficie de los anillos  $\alpha$ , motivando cambios conformacionales en los mismos para dejar accesible el poro axial del CP, a través del cual entrarán los sustratos. (2)(6)

El otro gran componente de este macrocomplejo es la partícula reguladora (RP), que es responsable de realizar los siguientes procesos: reconocer los sustratos proteicos marcados mediante cadenas de poliubiquitina, eliminar estas cadenas y atrapar la fracción proteica, desplegar tal fracción, inducir la apertura de las colas N-terminales de los anillos  $\alpha$  que ocluyen el acceso a la maquinaria catalítica del CP y por último, introducir los sustratos desplegados al interior del CP para su proteólisis.

Para desempeñar tales funciones la unidad reguladora RP consta de 6 tipos distintos dentro de la familia AAA+ ATPasas denominados partículas reguladoras trifosfatasa (Rpt 1-6) y 13 partículas o subunidades reguladoras no ATPasa (Rpn), para hacer un total de 19 subunidades.

### **Importancia del proteasoma como diana farmacológica.**

El proteasoma 26S está involucrado en numerosos procesos proteolíticos ATP-dependientes de una gran variedad de oncoproteínas, factores de transcripción, ciclinas específicas del ciclo celular, quinasas dependientes de ciclinas (cdk), ornitina descarboxilasa y otras proteínas clave de la regulación celular. Es por esto, que se ha

convertido en una diana en la terapia anticancerígena, por su involucración en el ciclo celular y en el proceso de apoptosis.

Debido a lo anterior, este complejo va a tener una incidencia tanto directa como indirecta en procesos como: Mitosis, crecimiento y desarrollo celular, quimiotaxis, presentación antigénica, angiogénesis, apoptosis y la incidencia en la expresión de numerosos genes que regulan otros procesos.

En el cáncer muchos de estos procesos están descompensados o alterados y de ahí la importancia del proteasoma como diana frente al mismo. Concretamente en este aspecto, el proteasoma va a participar intensamente en la formación de un factor de transcripción nuclear denominado NF- $\kappa$ B, que es un heterodímero formado por las proteínas p50 y p65 procediendo la primera de la degradación proteasómica de la proteína p105. Este factor participa en la activación de muchos genes de relevancia celular y en este contexto, va a estimular la expresión de genes que participan en angiogénesis (en caso de carcinogénesis, mejora la vascularización del tumor), proliferación celular y la migración celular. Es por ello, que juega un papel muy importante en la generación y mantenimiento de tumores. En algunos cánceres como es el de mama, próstata o mieloma pueden presentar una sobreactividad en la función del NF- $\kappa$ B motivada por mutaciones en genes que codifican para los factores de transcripción de NF- $\kappa$ B o en los genes que controlan la actividad. Esto se traduce en un aumento en el estímulo del crecimiento y desarrollo tumoral, un favorecimiento de la metástasis o lo que es lo mismo, un aumento en la agresividad del tumor y en un aumento de la resistencia a la quimioterapia, por lo que complica el pronóstico al paciente. Aunque el cáncer sea la principal indicación de los inhibidores del proteasoma, no hay que olvidar el papel del inmunoproteasoma como inmunomodulador y en la actualidad están bajo investigación los inhibidores selectivos al proteasoma de *Mycobacterium tuberculosis*, con el fin de eliminar formas no replicativas de esta bacteria en el hospedador o paciente. (7)(8)

## Objetivo

La relevancia celular que tiene el proteasoma y el conocimiento detallado de su estructura y mecanismo de acción, hace que sea una buena diana para el diseño y desarrollo de fármacos que actúen inhibiendo el mismo, no solo en procesos cancerosos,

sino también en procesos patológicos de origen inmunitario e inclusive en enfermedades infecciosas como es la tuberculosis.

Este trabajo se centrará en el diseño y estudio de los principales mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma empleados en terapéutica, así como de fármacos en fases de estudio avanzados.

## **Metodología**

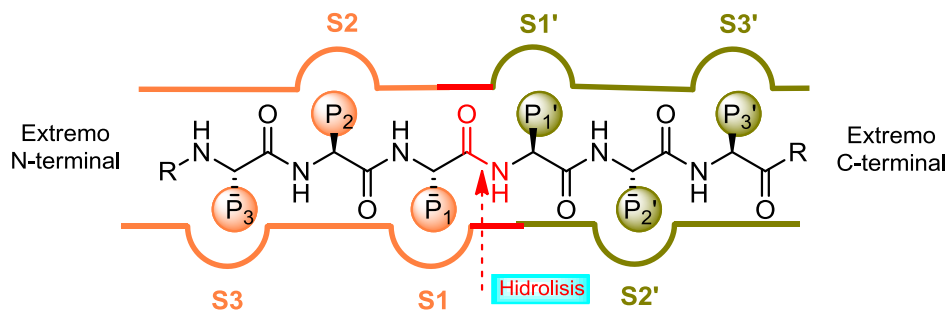
Para este trabajo bibliográfico se han empleado principalmente las bases de datos científicas Science Direct, perteneciente al grupo Elsevier, y NCBI de la biblioteca nacional de medicina estadounidense. El primero se ha empleado principalmente para la búsqueda filtrada de mecanismos de acción y diseño de inhibidores y el segundo para la información referente a la estructura y bioquímica que rodea al proteasoma.

## **Resultados y discusión**

En función de lo descrito anteriormente, el proceso de degradación proteolítica se realiza gracias a las subunidades catalíticas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  situadas en los dos anillos beta internos. Estas 6 subunidades catalíticas  $\beta$  estarán constituidas por:

- Dos centros tipo caspasa situados en las subunidades  $\beta 1$ , que hidrolizan o “cortan” después de aa ácidos.
- Dos centros tipo tripsina que se encuentran en las subunidades  $\beta 2$ , y la hidrólisis es después de aa básicos.
- Dos centros tipo quimiotripsina en las subunidades  $\beta 5$ , que hidrolizan después de aa hidrófobos.

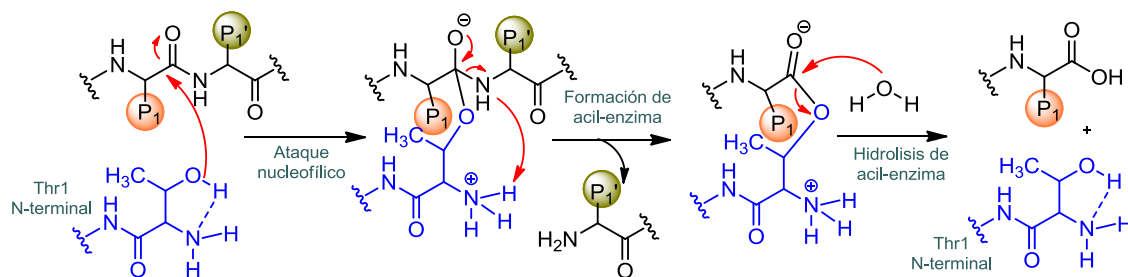
Las preferencias de hidrólisis de las subunidades catalíticamente activas vienen determinadas por la configuración química de los bolsillos (S) específicos de sustrato que poseen los proteasomas. Estos bolsillos van a acomodar las cadenas laterales (P) de los ligandos (sustrato endógenos, inhibidores...). En función de la afinidad química existente entre estas cadenas o partes de los ligandos con los bolsillos, van a variar diversos parámetros como el tiempo de permanencia del ligando en el sitio activo, tipo de inhibición, etc.



Terminología de Schechter y Berger utilizada para la hidrólisis enzimática de una proteína

Los bolsillos S se sitúan antes del enlace peptídico a hidrolizar por el proteasoma y los bolsillos S' (prima) después. Los números indican la cercanía al centro activo, siendo el S1 y S1' los más cercanos. (9)

El mecanismo de proteólisis es común en los tres tipos de sitios activos, es un proceso hidrolítico dependiente del grupo hidroxilo (OH) de un residuo de Thr 1 N-terminal. El mecanismo se representa en el siguiente esquema:

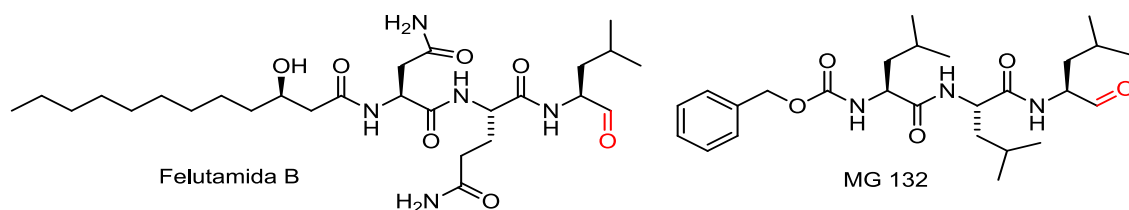


Está en discusión si en el primer paso de la hidrólisis, el grupo amino N-terminal de la Thr-1 es el que activa el hidroxilo de este mismo aminoácido o bien si es un residuo de lisina (Lys33) la que se encargue de esta labor. (10)

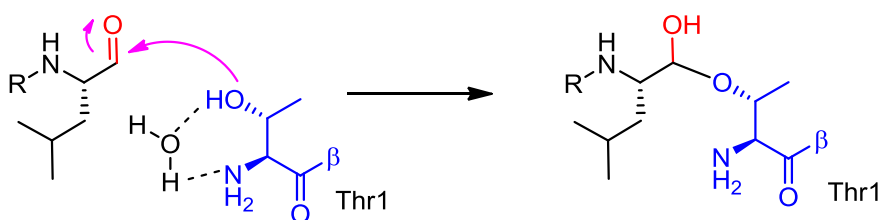
### Diseño y mecanismo de acción de los inhibidores del proteasoma.

Los inhibidores del proteasoma pueden ser portadores de diferentes grupos farmacóforos, y de forma general, pueden ser divididos en función de que establezcan o no enlaces covalentes con el sitio activo del proteasoma. Según su grupo farmacóforo se pueden distinguir como: aldehídos, boronatos,  $\beta$ .lactonas, sirbactinas, etc.

#### Aldehídos



Los denominados aldehídos peptídicos fueron los primeros que se descubrieron. Son inhibidores reversibles y forman un grupo hemiacetal reversible con el hidroxilo del residuo de Thr1 del sitio activo. (11)



Dentro de este grupo distinguiremos compuestos sintéticos y naturales, siendo los sintéticos más conocidos MG-132, ALLN y PSI. Entre los naturales destacan la tiropeptina A y la felutamida B, que son péptidos de origen bacteriano. Estos aldehídos peptídicos no solo tiene actividad inhibitoria frente al proteasoma, sino que también inhiben las proteasas de serina y cisteína.

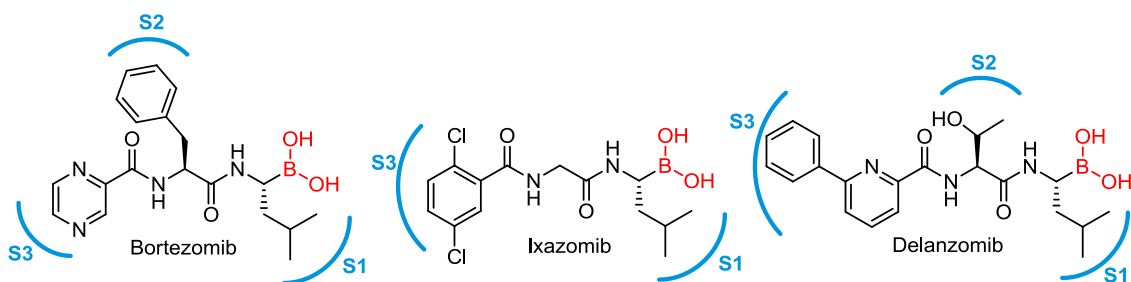
El primer aldehído peptídico descrito como inhibidor del proteasoma fue el ALLN, que se caracteriza sobre todo por ser un inhibidor de Calpaina-1(proteasa de cisteína). El complejo ALLN-proteasoma de levadura permitió, por primera vez, el estudio de los sitios activos del proteasoma. El compuesto MG-132 no tiene una mayor potencia que el ALLN frente al proteasoma, pero sí que tiene una mayor selectividad. Otro compuesto característico de este grupo, es el PSI que es similar en cuanto a selectividad al MG-132, pero es menos potente que el anterior mencionado. (10)

En cuanto a los inhibidores de origen natural tienen interés las tiropeptinas (A y B) y la felutamida B. Las primeras son metabolitos de bacterias del género actinomices, más concretamente *Kitasatospora sp*, van a inhibir los sitios tipo quimiotripsina y tripsina pero no inhiben el sitio tipo caspasa. La felutamida B procedente de *Penicillium fellutanum*, tiene afinidad por los tres tipos de sitios activos del proteasoma humano y por él único sitio activo de *Mycobacterium tuberculosis*. Su potencia inhibitoria del sitio activo tipo quimiotripsina ( $\beta 5$ ) es superior en comparación con el MG-132. (12)

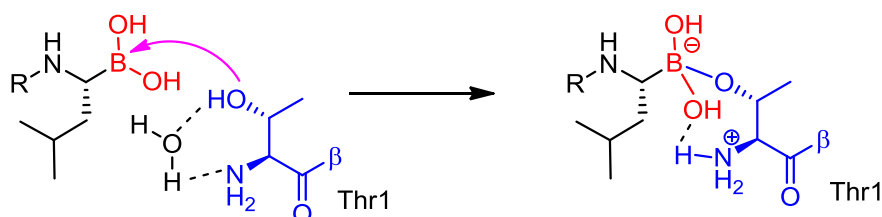
El gran problema de este grupo de inhibidores radica en su bajo efecto <<in vivo>> motivado por sus rápidos niveles de disociación enzimática, su rápida oxidación a ácidos y son sustratos del transportador MDR (multi-drug resistance) de la célula tumoral. Es por ello, que han sido apartados en como futuribles inhibidores del proteasoma, en beneficio de otros grupos de compuestos como son los boronatos, epoxicetonas o beta-lactonas que son más selectivos y sobre todo, tienen una mayor actividad frente al proteasoma. (11)

## Boronatos

Los boronatos peptídicos se caracterizan por ser bastante más potentes y selectivos que los aldehídos peptídicos formando parte ya del arsenal terapéutico frente al cáncer, más concretamente frente al mieloma múltiple.



El mecanismo de acción de los boronatos consiste en la formación de un complejo tetraédrico reversible con la Thr1 del sitio activo, siendo inhibidores reversibles análogos al estado de transición. (11)



Como se observa en la figura, para que se dé el aducto tetraédrico, el par electrónico del oxígeno hidroxílico de la thr1 reacciona nucleofílicamente con el boro.

Los compuestos líderes son el Bortezomib y el Ixazomib y son unos de los pocos inhibidores del proteasoma que actualmente están aprobados, aunque este último aún no está comercializado en España debido a que su aprobación es muy reciente.

En la estructura del Bortezomib se pueden distinguir tres partes: P1, P2 Y P3, que ocupan los correspondientes bolsillos del sitio activo (S1, S2 y S3).

El aminoácido leu-boronico (P1) incluye el grupo farmacóforo que interacciona con la treonina N-terminal del sitio activo del proteasoma y la cadena de la leucina que interacciona con los residuos hidrofóbicos del bolsillo S1.

En los boronatos de nueva generación como el Ixazomib (MLN-2238) o Delanzomib (CEP-18770) no se ha modificado P1 ya que es esencial para la interacción con el sitio activo  $\beta 5$ . En P2, grupos hidrofóbicos grandes como el bencilo (como es el caso del Bortezomib) incrementan algo la potencia, pero también son activos en ausencia de radicales en P2 como ocurre en el Ixazomib. P3 puede formar enlaces de hidrógeno con el Asp<sup>114</sup> y es crítico para mantener una alta afinidad por las subunidad  $\beta 5$  (sitio activo quimi tripsina).

El Bortezomib presenta preferencia por la inhibición de la subunidad  $\beta 5$ , tanto del proteasoma constitutivo como inmunoproteasoma e inhibe con menor potencia el sitio tipo caspasa de la subunidad  $\beta 1$  y el sitio tipo tripsina ( $\beta 2$ ). **(13)**

El Bortezomib está indicado solo o en combinación, para el tratamiento del mieloma múltiple o linfoma de células del manto y en la actualidad, está en investigación para ampliar sus indicaciones como en cáncer microcítico de pulmón e incluso, como alternativa terapéutica a la tuberculosis. **(14)**

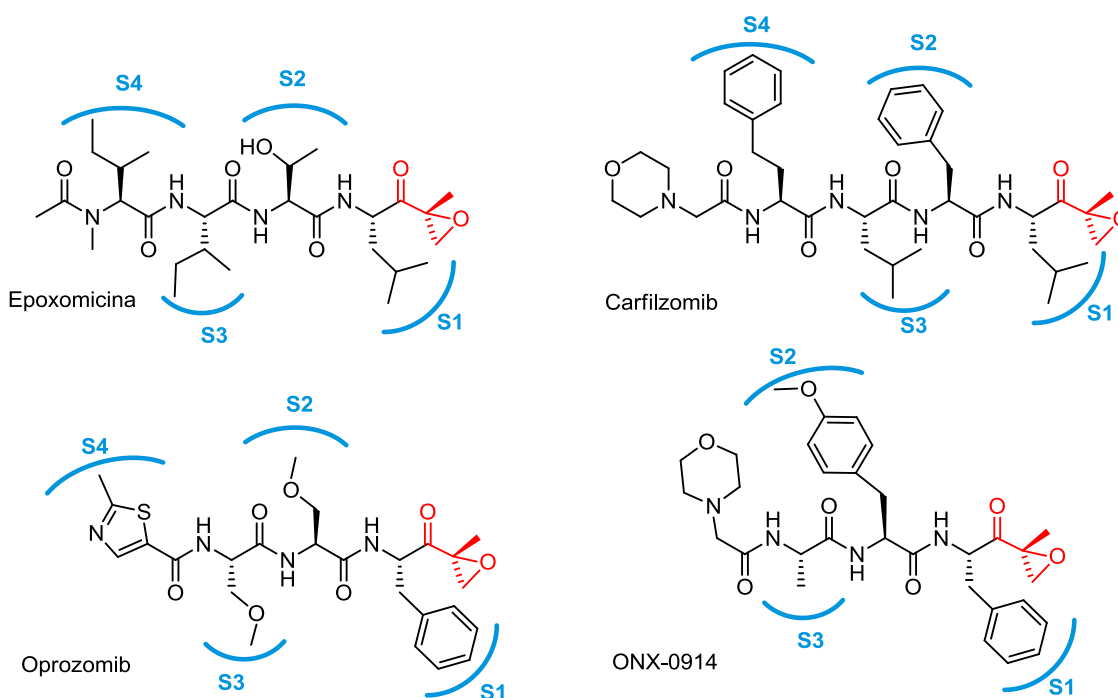
A pesar del éxito de este fármaco en el tratamiento del mieloma múltiple, cabe decir, que aparecen con frecuencia efectos adversos tales como neutropenia y trombocitopenia y casos (30% de los pacientes) de efectos neurodegenerativos pero reversibles con la supresión del fármaco. Además, se han desarrollado numerosos casos de resistencias a este compuesto mermando mucho su efectividad en la práctica clínica.

A raíz de esto surgen los boronatos de segunda generación como son el Ixazomib y el Delanzomib (en investigación). De estos se espera que mejoren la farmacocinética y efectividad del Bortezomib, además de sortear las resistencias desarrolladas. Van a ser fármacos que se pueden administrar por vía oral, a diferencia del Bortezomib, y están formulados como profármacos.

El Ixazomib está formulado como Ixazomib citrato, que se hidroliza rápidamente en condiciones fisiológicas. Su biodisponibilidad oral es del 58% y el pico máximo de concentración plasmática se alcanza en una hora. Su diseño es muy similar al del Bortezomib, siendo lo más reseñable la carencia de radical en P2 y también va a ser selectivo por el sitio activo de la subunidad  $\beta 5$  tanto del inmunoproteasoma como el proteasoma constitutivo. **(15)**

El profármaco del Delanzomib es un éster borónico cíclico, que al igual que el Ixazomib se bioactiva por hidrólisis en el medio fisiológico. Los ensayos clínicos han demostrado que es un compuesto con una farmacocinética aceptable y más seguro que el Bortezomib, en cuanto a potencia de inhibición de los sitios activos es equiparable a este último. De su diseño cabe destacar que en P3 presenta un sistema cíclico nitrogenado que incluye un radical fenilo con el fin de mejorar la adaptación con el bolsillo S3. Por último, este compuesto va a inhibir también específicamente la subunidad  $\beta 5$  y tiene algo de afinidad por los otros dos tipos de sitios activos. **(16)**

## Epoxicetonas



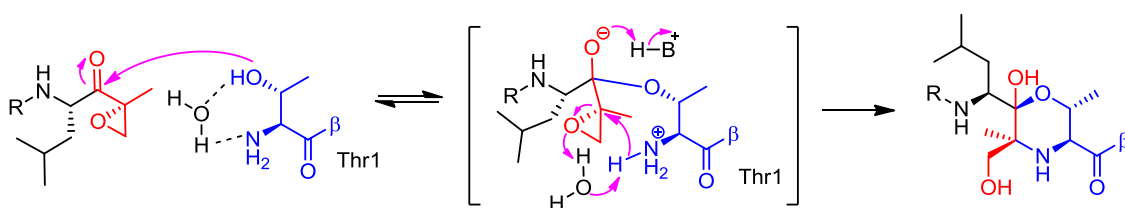
Las  $\alpha'$ ,  $\beta'$ -epoxicetonas peptídicas son los más específicos y potentes inhibidores del proteasoma conocidos hasta la fecha. La primera epoxicetona que se descubrió fue la Epoxomicina, producto natural procedente de *Actinomyces*, la cual ha sido utilizada como “molde” para la síntesis de otras epoxicetonas como el Carfilzomib y el Oprozomib (ONX-0912). El Carfilzomib es el único fármaco aprobado y comercializado dentro de este grupo y se espera que en los próximos años lo sea el Oprozomib. (11)(12)

La estructura general de las epoxicetonas se puede resumir de la siguiente manera: un cuerpo principal formado por 4 aminoácidos en el caso del Carfilzomib o bien 3 aminoácidos en las epoxicetonas de nueva generación como el Oprozomib, que como todos los inhibidores peptídicos tratan de mimetizarse con los sustratos naturales del proteasoma ocupando los bolsillos S1-S3 del sitio activo. Los aminoácidos se encuentran en disposición  $\beta$  para formar en el canal del sitio activo una lámina  $\beta$  antiparalela.

Son inhibidores irreversibles por la alta estabilidad del complejo o aducto final formado, y van a inhibir de forma muy selectiva el sitio tipo quimiotripsina ( $\beta_5$ ), más selectivamente que el Bortezomib pero con igual potencia.

Mediante análisis con rayos X del complejo inhibidor-proteasoma se sabe que la parte peptídica adopta una disposición antiparalela en el canal del sitio de unión en  $\beta_5$ . El aducto morfolina formado por la interacción del inhibidor con su diana tiene

interacciones de Van der Waals con los residuos Ala22 ( $\beta$ 5), Trp25 ( $\beta$ 5) y His98 ( $\beta$ 6). La parte correspondiente al fenetilo del Carfilzomib ocupa el bolsillo S4 de  $\beta$ 5 adyacente a la subunidad  $\beta$ 6, siendo estabilizado mediante interacciones hidrofóbicas por los residuos Pro94 and Val116 de esta última subunidad. Estos residuos también estabilizan a esta parte fenilalanina del Carfilzomib en el inmunoproteasoma lo que explica en parte, que este fármaco tiene también como diana al inmunoproteasoma. (17) El mecanismo de acción de las epoxicetonas que explica la alta especificidad de este grupo por el proteasoma consiste en la formación final de un anillo morfolina, en el que participan la treonina N-terminal del proteasoma y el grupo epoxicetona del inhibidor, según se explica en el siguiente esquema:(11)



A diferencia de la mayoría de grupos de inhibidores del proteasoma, las epoxicetonas no interaccionan con las proteasas de serina y cisteína ya que no tienen sus residuos catalíticos grupos amino para poder formar el anillo de morfolina.

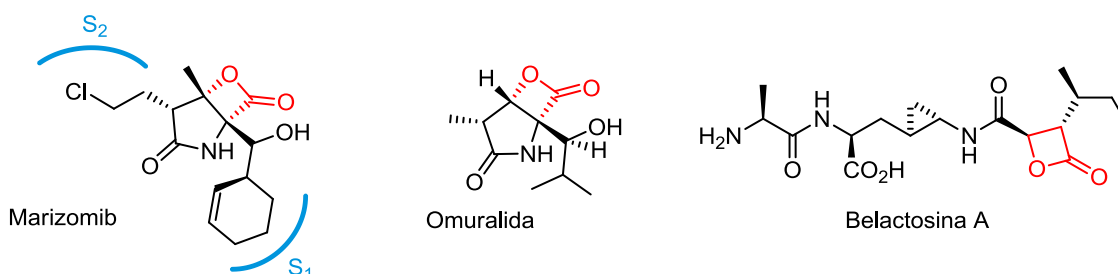
El cabeza de serie de este grupo es el Carfilzomib, que actualmente es un fármaco de segunda línea para el mieloma múltiple y al igual que sucede con los boronatos peptídicos se emplea en combinación con la Lenalidomida y la Dexametasona. Desgraciadamente este fármaco presenta toxicidad hematológica, pero gracias a su mayor especificidad por el proteasoma estos efectos adversos son algo menos frecuentes que en el Bortezomib.

Actualmente está en camino una segunda generación de epoxicetonas, liderada por el compuesto ONX-0912 bajo el nombre de Oprozomib también dirigido a combatir el mieloma múltiple. Su diana es la misma que la de su análogo Carfilzomib, el sitio activo en  $\beta$ 5 del proteasoma constitutivo e inmunoproteasoma. Se ha observado con el Oprozomib un incremento del volumen del hueso esponjoso o trabecular, que es tejido óseo donde se encuentra en la mayoría de ocasiones la médula ósea roja, encargada del proceso de producción de glóbulos rojos o hematopoyesis. Además, se ha observado que disminuye la resorción ósea y se favorece la formación de hueso, en ratones sin este tipo de cáncer. Por otro lado, estudios en ratones en los que se les han inducido mieloma, se ha observado una disminución de la carga tumoral y una prevención de la pérdida ósea. (18)

Otro compuesto de nueva generación que está aún bajo investigación es el ONX-0914 que está diseñado para ser un inhibidor selectivo de  $\beta 5$  del inmunoproteasoma, con el fin de ser un inmunomodulador en procesos patológicos de carácter inmunitario como es la artritis reumatoide o el lupus eritematoso, reduciendo la producción de citocinas e interleucinas proinflamatorias.

La consecución de compuestos selectivos por el iCP nace del descubrimiento de la diferente orientación de un residuo Met45 localizado en el bolsillo S1. La orientación de la Met45 en  $\beta 5i$  hace que el bolsillo S1 sea más espacioso que el de  $\beta 5c$ , ya que en este último la Met 45 se proyecta al interior del bolsillo S1 obstaculizando estéricamente el acoplamiento del resto fenilo correspondiente a la fenilalanina que forma parte de la estructura de ONX-0914. (19)

### Beta-Lactonas



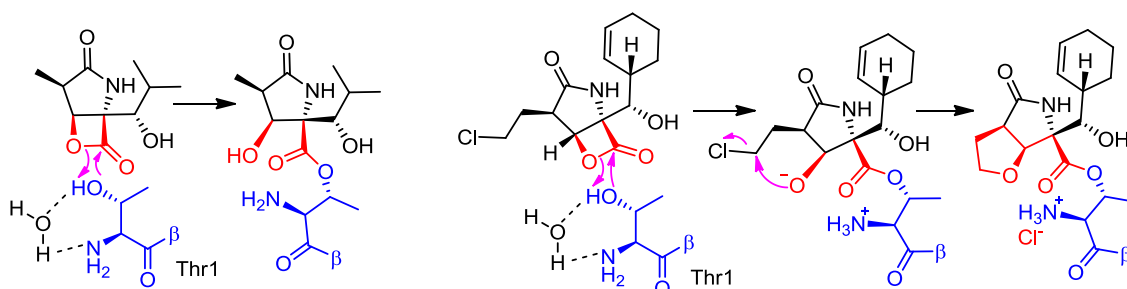
Las  $\beta$ -Lactonas son compuestos naturales no peptídicos originariamente representadas por la Omuralida (Clasto-lactocistin- $\beta$ -lactona) y su análogo sintético el PS-519. A pesar de que estos compuestos son mucho más selectivos y potentes que los aldehídos peptídicos, no llegan al nivel de las epoxicetonas al inhibir determinadas proteasas de serina (ej catepsina A). Durante la primera década de este siglo se han investigado y descubierto numerosas  $\beta$ -lactonas, siendo el descubrimiento más importante el Marizomib (Salinoesporamida A) compuesto derivado de un microorganismo marino *Salinispora tropica*. Actualmente, este compuesto está en ensayos clínicos para el tratamiento del mieloma múltiple, leucemia y tumores sólidos, con la esperanza de ser una alternativa más al Bortezomib en caso de resistencia a este fármaco. El Marizomib va a inhibir el sitio activo tipo quimiotripsina ( $\beta 5$ ) y tripsina ( $\beta 2$ ) a concentraciones más bajas que el Bortezomib e induce apoptosis en células tumorales resistentes a Bortezomib en pacientes con mieloma múltiple. El gran problema del Marizomib es su bajísima vida plasmática ( $t_{1/2}$  de 5 minutos) y que atraviesa en gran proporción la barrera hematoencefálica, por lo que limita sus posibilidades para formar parte del

arsenal terapéutico frente a este tipo de cáncer. Se desconoce si este compuesto tiene selectividad por el inmunoproteasoma. (11)(12)

Otra  $\beta$ -lactona que merece la pena su mención es la belactosina A, que presenta como curiosidad que solo se une a los bolsillos S' a diferencia del resto de inhibidores descubiertos que interaccionan con los bolsillos S1-S4. (11)

Son inhibidores reversibles, ya que todos los complejos formados inhibidor-proteasoma son disociados por acción hidrolítica del agua, reactivándose el proteasoma. Van a inhibir las tres subunidades  $\beta$ , pero tienen algo más de preferencia por la subunidad  $\beta 5$ .

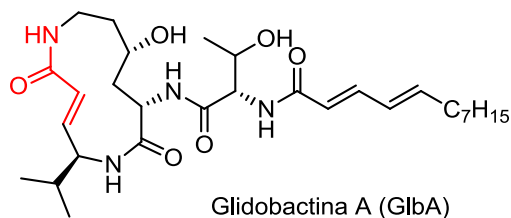
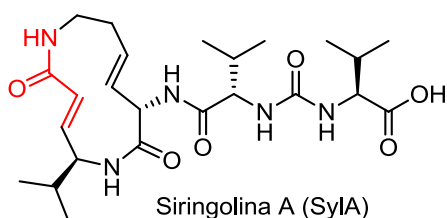
Del mecanismo de acción cabe destacar la inactivación del sitio activo de proteasoma por una esterificación del hidroxilo de la treonina, como bien se puede observar en el siguiente esquema:



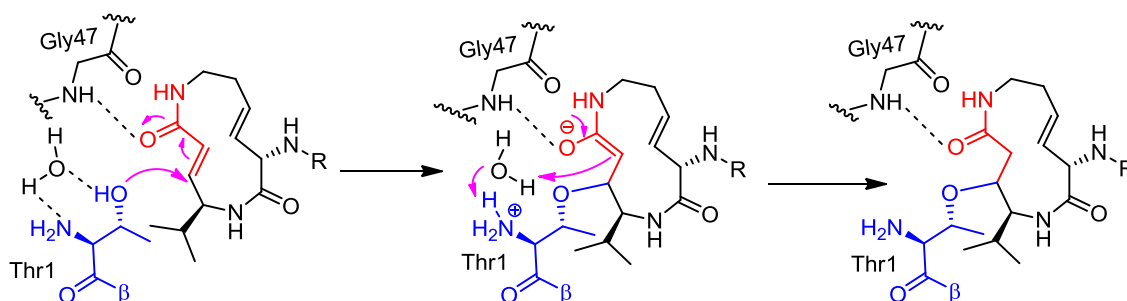
En el caso del Marizomib, la apertura del anillo  $\beta$ -Lactona va seguida de la formación de un anillo tetrahidrofurano como resultado del desplazamiento del átomo de cloro del inhibidor. (11)

En el diseño de estos compuestos como la Omuralida y el Marizomib cabe destacar la importancia obvia del anillo de  $\beta$ -lactona para interaccionar covalentemente con la treonina del sitio activo y del radical en posición 1 del anillo condensado para que interaccione con el bolsillo S1. Estas  $\beta$ -lactonas, excepto belactosina A, solo van a interaccionar con los bolsillos S1 y S2. Actualmente se está intentando diseñar nuevos compuestos que permitan interaccionar con más bolsillos y así aumentar la selectividad de este grupo por el proteasoma. (20)

### Sirbactinas



Las sirbactinas son compuestos naturales derivados de cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae*, que es un patógeno vegetal. El descubrimiento de estos compuestos como inhibidores potenciales del proteasoma es muy reciente. Se caracterizan por presentar un sistema carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado dentro de un macrociclo, que reacciona irreversiblemente con la Thr1 del sitio activo, por una reacción de adición 1,4 de Michael.



Dentro de las sirbactinas se diferencian 2 grupos principales: Las siringolinas y las glidobactinas. Las siringolinas se caracterizan por tener un macrociclo lactámico de 12 miembros adjunto a un dipéptido exocíclico de urea. Los miembros más representativos de las siringolinas son la siringolina A (SylA) y B (SylB), siendo el primero un metabolito producido en mayor cantidad que el segundo. El otro grupo corresponde a las glidobactinas, que tienen mayores diferencias estructurales con el primer grupo. Su macrociclo lactámico es similar al de las siringolinas pero incorporan 3-hidroxi lisina en la posición de la lisina de SylB, y la principal diferencia se encuentra en que estas presentan una cadena alquílica exocíclica. La principal glidobactina es la GlbA.

La siringolina A se dispone espacialmente en el sitio activo de tal forma, que su estructura forma una lámina  $\beta$  antiparalela (como los Boronatos y epoxicetonas), a diferencia de SylB y GlbA, que es estabilizada por diferentes residuos como Gly47, Thr21 entre otros, y esto se traduce en una unión inhibidor-proteasoma más fuerte y productiva. El motivo de esta diferencia de orientaciones es por la parte 3,4 dehidrolisina de SylA.

También como fruto del análisis del complejo SylA-proteasoma se vio que la función ácida final de la molécula no influía en la potencia inhibitoria, pero la adición de una cadena alquílica análoga a las de glidobactinas dio lugar a un aumento de la potencia, del orden de 100 veces respecto a la SylA original. Lo que hace indicar a los investigadores que el futuro de este grupo de inhibidores pasa por estas modificaciones.

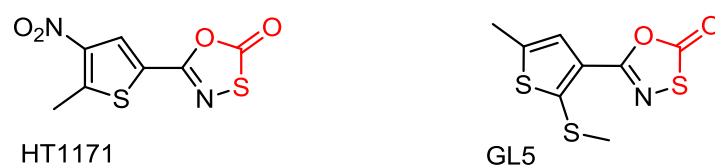
(21)

## Oxatiazol-2-onas

Las oxatiazol-2-onas son inhibidores que se caracterizan por tener una alta selectividad por el proteasoma bacteriano de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bacteria patógena carente de pared celular es la única de todas las bacterias patógenas estudiadas que expresa proteasoma. Es responsable de causar tuberculosis, una enfermedad infecciosa que se encuentra entre las 10 primeras causas de mortalidad en el mundo con una incidencia en torno a 10 millones de nuevos casos anuales a nivel mundial. (22)

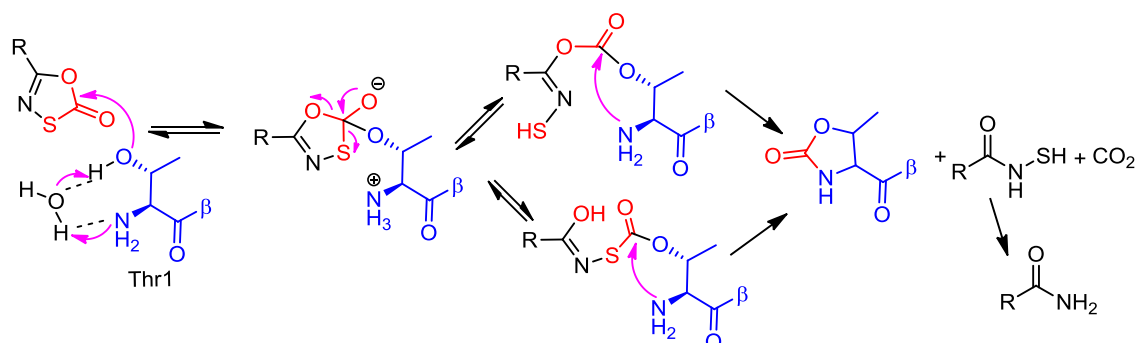
Existe terapia anti infecciosa eficaz frente a formas replicativas de esta bacteria, en cambio, hay pocos antibióticos capaces de combatir estados no replicativos de la misma. Estos hechos obligan a los investigadores estudiar nuevos compuestos para resolver este problema de carácter mundial.

Mediante la realización de screening en el que se barajaron en torno 20.000 compuestos solo 2 tuvieron actividad selectiva clara por el proteasoma bacteriano de *M. tuberculosis*, estos dos son las Oxatiazol-2-onas GL5 y HT-1171.



Diversos estudios revelan que estos compuestos inhiben irreversiblemente al proteasoma bacteriano, mientras que el proteasoma humano apenas es inhibido, siendo 1000 veces más efectivos contra el primero.

El mecanismo de inhibición propuesto de estos compuestos se representa en el siguiente esquema:



Se produce un ataque nucleofílico del hidroxilo de la Thr1 N-terminal sobre el carbonilo de la oxatiazolona, dando un producto de ciclocarbonilación por dos mecanismos posibles según se representa en el esquema anterior.

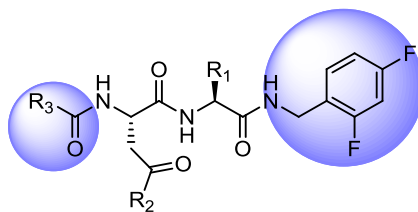
Cuando se produce la ciclocarbonilación de la treonina por estos inhibidores, el sitio activo del proteasoma de *M. tuberculosis* sufre un gran cambio conformacional. Se



interesante oportunidad de estudio e investigación para hacer frente a estados no replicativos de esta bacteria, como pasaba con las Oxatiazol-2-onas.

Mediante análisis por cristalografía de rayos X del complejo dipéptido sustituido-proteasoma de levadura, se vio que la ocupación espacial de estos compuestos en el sitio activo es de la siguiente manera: P1(C-terminal tapado) ocupa el bolsillo S1 y los dipéptidos que conforman P2 y P3 ocupan S2 y S3 y por último P4(N-terminal tapado) ocupa S4, mimetizando al sustrato natural.

Realizando screening con esta librería de cerca de 1600 compuestos frente al proteasoma de micobacteria, se vio que 6 compuestos tenían una selectividad 100 veces mayor por Mtb que por la humana, 2 compuestos 500 veces mayor y un compuesto logró tener una selectividad 1000 veces mayor y 13 de estos compuestos tienen una potencia del orden de <100 nM. Las moléculas más selectivas tienen en común, un átomo de nitrógeno completamente sustituido en la P3, que corresponde a la amida de una asparagina.



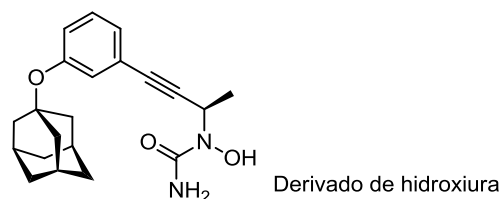
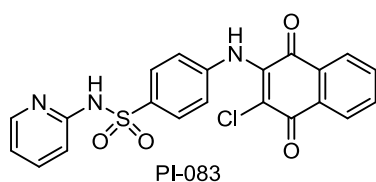
Esta figura corresponde a la estructura base de estos dipéptidos, sobre la cual se realizaron cientos y cientos de combinaciones para cuantificar su potencia y selectividad. (24)

### **Inhibidores no peptídicos**

Los inhibidores no peptídicos presentan la peculiaridad que son capaces de inhibir no covalentemente, como en el caso de los péptidos cíclicos, a los tres tipos de sitios activos del proteasoma en células transformadas y no de células no transformadas o sanas. Un compuesto importante de este grupo es el PI-083, que es una sulfonamida con un derivado quinolínico, el cual presenta la característica recién nombrada de tener esa preferencia por el proteasoma de células tumorales frente a sanas inhibiendo los sitios activos en  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, pero es incapaz de inhibir  $\beta$ 5.

Otros compuestos no peptídicos con capacidad de inhibir el proteasoma humano son las ya conocidas hidroxureas, creándose un derivado que en estudios ha relevado una

potencia del rango de 30 nM, el grueso hidrofóbico de este compuesto ocupa los bolsillos S1 y S3 pero no hay contacto directo con la thr-1 del sitio activo. (11)(25)



## Conclusión

El estudio del proteasoma es un campo muy amplio para la investigación debido a la multitud de procesos celulares en los que interviene esta proteasa, siendo una diana muy interesante para tratar de combatir patologías que a día de hoy no se encuentra una solución terapéutica efectiva. Los esfuerzos de investigación van encaminados a conseguir diseños cada vez más selectivos, frente a las diferentes formas o tipos en las que se presenta este complejo en el organismo. Para ello hay que seguir estudiando las diferencias estructurales que presentan los diferentes sitios activos del proteasoma constitutivo y el inmunoproteasoma, para poder limitar los efectos adversos que generan estos compuestos. Poco a poco, van apareciendo compuesto que tratan de cumplir estas premisas como es ONX-0914 que es capaz de inhibir selectivamente a la subunidad  $\beta 5$  del inmunoproteasoma y otras epoxicetonas selectivas al cCP (PR-825) para tratar de disminuir eventos como la neutropenia o trombocitopenia.

## Bibliografía

1. Portal MedMol de FIBAO (Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental). <http://medmol.es/temas/79/>.
2. Tanak, K. **2009**. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **85**(1), 12–36.
3. Portal MedMol de FIBAO (Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental). <http://medmol.es/glosario/88/>.
4. Robert, J., Tomko, J.R., Hochstrasser, M. **2013**. Molecular Architecture and Assembly of the Eukaryotic Proteasome. *Annu Rev Biochem.* **82**, 415-445.
5. Robert, J., Tomko, J.R., Hochstrasser, M. **2011**. Order of the Proteasomal ATPases and Eukaryotic Proteasome Assembly. *Cell Biochem Biophys.* **60**(1-2), 13-20.
6. Fonseca, D.P., Jun, H., Morris, E.P. **2012**. Molecular Model of the Human 26S Proteasome. *Mol Cell.* **46**(1), 54-66.
7. Frankland-Searby, S., Bhaumik, S.R. **2012**. The 26S Proteasome Complex: An Attractive Target for Cancer Therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1825(1), 64-76.

8. Adams, J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*. **29**(1), 3-9.
9. Tesis Doctoral de Amaia Larumbe Gárate, **2015**. Utilización de Reacciones de Cicloadición (3+2) en la Síntesis de Nuevas Entidades Químicas con Actividad Inhibitoria del Proteasoma. Universidad del País Vasco.
10. Kisselev, A.F., Goldberg, A.L. **2001**. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Cell Chem Biol*. **8**(8), 739-758.
11. Kisselev, A.F., Van der Linden, W.A., OverKleeft, H.S. **2012**. Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chem Biol*. **19**(1), 99-115.
12. Momose, I., Kawada, M. **2016**. The therapeutic potential of microbial proteasome inhibitors. *Int Immunopharmacol*. **37**, 23-30.
13. Ying, G., Aibo, L., Juanwei, W., Haiwei, F., Letian, W., Hongwu, L., Yungen, X., Qingxiang, X., Li, Z., Yuyuan, L. **2017**. Design, synthesis and biological evaluation of novel non-peptide boronic acid derivatives as proteasome inhibitors. *Eur J Med Chem*. **128**, 180-191.
14. Ficha técnica Bortezomib. Agencia Europea del Medicamento (EMA). [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000539/WC500048471.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000539/WC500048471.pdf)
15. Ninlaro (ixazomib) For Healthcare Professionals. Takeda Pharmaceutical Company Limited. Retrieved 21 November 2015. "Ninlaro (ixazomib) Capsules, for Oral Use. Full Prescribing Information" (PDF).
16. Enciclopedia farmacéutica online Drugs.com. Módulo New Drugs Approvals. <https://newdrugapprovals.org/2015/11/08/cep-18770-de-lanzomib/>
17. Huber, E.M., Heinemeyer, W., Groll, M. **2015**. Bortezomib-Resistant Mutant Proteasomes: Structural and Biochemical Evaluation with Carfilzomib and ONX 0914. *Structure*. **23**(2), 407-417.
18. Teicher, B.A., Tomaszewski, J.E. **2015**. Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol*. **96**(1), 1-9.
19. Huber, E.M., Groll, M. **2012**. Inhibitors for the Immuno- and Constitutive Proteasome: Current and Future Trends in Drug Development. *Angew Chem*. **51**(35), 8708-8720.
20. Groll, M., Balskus, E.P., Jacobsen, EN. **2009**. Structural Analysis of Spiro  $\beta$ -Lactone Proteasome Inhibitors. *J Am Chem Soc*. **130**(45), 14981-14983
21. Clerc, J., Groll, M., Illich, D.J., Bachmann, A.S., Huber, R., Schellenberg, B., Dudler, R., Kaiser, M. **2009**. Synthetic and structural studies on syringolin A and B reveal critical determinants of selectivity and potency of proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**(16), 6507-6512.
22. Datos de la OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
23. Gang, L., Dongyang, L., Sorio de Carvalho, L.P., Haiteng, D., Hui, T., Vogt, G., Kangyun, W., Schneider, J., Chidawanyika, T., Warren, J.D., Huilin, L., Nathan, C. **2011**. Inhibitors Selective for Mycobacterial versus Human Proteasomes. *Nature*. **461**(7264), 621-626.

24. Gang, L., Chidawanyika, T., Tsu, C., Warriar, T., Vaubourgeix, J., Blackburn, C., Gigstad, K., Sintchak, M., Dick, L., Nathan, C. **2013**. N,C-capped dipeptides with selectivity for mycobacterial proteasome over human proteasomes: Role of S3 and S1 binding pockets. *J Am Chem Soc.* **135**(27), 9968-9971.
25. McDaniel, T.J., Lansdell, T.A., Dissanayake, A.A., Azevedo, L.M., Claes, J., Odom, A.L., Tepe, J.J. **2016**. Substituted quinolines as noncovalent proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem.* **24**(11) 2441-2450.