



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 654**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06762655 .6**

96 Fecha de presentación : **17.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1904854**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de inhibidores del plegamiento de proteínas.**

30 Prioridad: **19.07.2005 EP 05015597**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2009

73 Titular/es: **Universita' degli Studi di Milano**
Via Festa del Perdono, 7
20122 Milano, IT

72 Inventor/es: **Broglia, Ricardo y**
Tiana, Guido

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

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

Procedimiento para la identificación de inhibidores del plegamiento de proteínas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de inhibidores del plegamiento y por lo tanto de la o las funciones biológicas de proteínas y, más en particular, de inhibidores peptídicos del plegamiento de proteínas que son altamente selectivos y que no crean resistencia.

Antecedentes

10 El hecho de que las proteínas tienen una función fisiológica principal es bien conocido en la técnica. Se han hecho muchos esfuerzos para usar proteínas como agentes terapéuticos, como catalizadores y también como materiales adecuados que tienen propiedades específicas.

15 Muchas enfermedades surgen de mutaciones en proteínas que hacen que pierdan funcionalidad. En algunos casos, por ejemplo, la actividad catalítica ejercida por proteínas puede estar dificultada, dando como resultado una ruta metabólica alterada (p. ej., fenilcetonuria). En algunos otros casos, pueden estar afectadas las propias propiedades estructurales de las proteínas de modo que conduzcan a una pérdida de funcionalidad física (p. ej., distrofia muscular). La enfermedad de Creutzfeld-Jakob y otras encefalopatías transmisibles pueden ser resultado de modificaciones
20 estructurales de las proteínas que cambian su forma y forman polímeros [1]. Igualmente, las enfermedades también pueden ser el resultado de amiloidosis en la que las proteínas se convierten gradualmente en cadenas largas de láminas beta polimerizadas y precipitan para formar fibrillas [2].

25 Se sabe que muchos cánceres ocurren debido a mutaciones de proteínas. Hasta el punto de que se sabe que aproximadamente 50% de los cánceres humanos son causados por mutaciones en el factor P53 supresor de tumor que principalmente disminuye su estabilidad [3].

30 Las enzimas y receptores son dianas habituales de los fármacos, para restablecer su función o para destruir agentes infecciosos o cánceres. El último objetivo en la ciencia de las proteínas es ser capaz de predecir tanto la estructura como la actividad de proteínas por sus secuencias de aminoácidos (el llamado “problema de plegamiento”), así como de inhibir su actividad [4, 5].

35 Con este logro se podrían diseñar y sintetizar nuevos catalizadores, materiales y agentes farmacológicamente activos, en particular fármacos adecuados para inhibir la actividad enzimática.

40 Las propiedades principales que pueden presentar estos fármacos son especificidad (es decir, no ser tóxicos) y eficacia. Convencionalmente esto se puede lograr mediante el rematado del sitio activo de la enzima (inhibición competitiva) o por la unión en algunas otras regiones/partes de la proteína, provocando así cambios estructurales que hacen que la enzima no sea adecuada para la unión al sustrato (inhibición alostérica).

45 Para lograr cualquiera de estos objetivos, debe optimizarse la unión entre el ligando y la proteína. Esto es un problema bastante grande que requiere tiempo, debido al hecho de que es necesario calcular no sólo las energías entre enzimas y sustrato u otros ligandos, si no también sus energías de interacción con el agua y el cambio de entropía durante la reacción. Las energías de unión netas son pequeñas diferencias entre dos números más grandes.

50 Surge otra complicación en el caso de que el objetivo sea una proteína vírica que presenta una tasa de mutación alta, a menudo asociada con el desarrollo de resistencia bien conocido. Por lo tanto, tiene una gran importancia idear estrategias nuevas que permitan un diseño más eficaz y económico de inhibidores de proteínas frente a los diseños conocidos centrados en el sitio activo, así como para generar estrategias dirigidas a bloquear la interacción entre enzimas y su sustrato, que no generen resistencia.

55 Una serie de estudios teóricos [9, 10] y experimentales [6-8, 38, 41] sugieren que las proteínas globulares de un solo dominio (es decir, proteínas de longitud N comprendida entre 60 y 150 aminoácidos [28]) se pliegan por un mecanismo jerárquico, en el que unidades pequeñas compuestas de pocos aminoácidos consecutivos construyen unidades mayores que, a su vez, construyen unidades todavía mayores, que finalmente implican la proteína entera.

60 Los estudios experimentales del plegamiento y asociación de segmentos de cadenas de aminoácidos, antes de la formación del estado natural, han identificado estructuras de tipo parcialmente naturales entre los sucesos de plegamiento iniciales [39]. Estos elementos estructurales se denominan normalmente dominios de plegamiento o plegados [9]. La definición operacional de estas unidades es: “la estructura tridimensional de las primeras estructuras naturales observable, en las que se pliega la proteína, empezando desde un estado desnaturalizado”. Las mutaciones dentro de estos dominios estructurales pueden limitar gravemente la formación de una proteína adecuadamente plegada [10].

65 Los cálculos de modelos [11, 12] han mostrado que el plegamiento de proteínas de un solo dominio, monoméricas y pequeñas, procede, partiendo de una conformación no plegada, siguiendo una sucesión jerárquica de sucesos: 1) formación de pocas (2-4) estructuras elementales locales (normalmente denominadas LES) que contienen en total de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% de los aminoácidos de la proteína (y por lo tanto entre 5% y 15%

de cada uno de los aminoácidos de la proteína), estabilizadas por pocos aminoácidos hidrófobos que interaccionan fuertemente (“calientes”), altamente conservados (<10% de los aminoácidos de la proteína) que caen cerca a lo largo de la cadena de polipéptido; 2) conexión de las LES en el núcleo de plegamiento (postcrítico) [13], es decir formación del conjunto mínimo de contactos naturales que llevan al sistema hacia la barrera de energía libre principal del proceso de plegamiento entero; 3) relajación del resto de los aminoácidos en la estructura natural poco después de la formación del núcleo de plegamiento. Se ha encontrado que los sitios “calientes” que estabilizan las LES son muy sensibles a mutaciones puntuales (no conservativas). Puesto que la mayor parte de la energía de estabilización de la proteína se concentra en estos sitios, la posibilidad de mutación de uno o dos de ellos tiene una alta probabilidad de desestabilizar la conformación plegada. Es natural identificar los dominios de plegamiento del párrafo previo con las LES de los cálculos de modelos.

El mismo modelo indica que se puede desestabilizar la conformación natural de una proteína usando péptidos (que se llamarán p-LES) cuya secuencia es idéntica a la de las LES de las proteínas [14].

Hay dos ventajas importantes de estos inhibidores de plegamiento con respecto a los convencionales. Primero, su estructura molecular es sugerida directamente por la proteína diana. No hay que diseñar u optimizar nada, si no solo encontrar las LES de la proteína diana. Debido a que el diseño de las LES se ha realizado por evolución a través de una mirada de generaciones de los virus (o del organismo que expresa la proteína), para reconocer e interaccionar fuertemente entre sí, para así hacer el plegado de la proteína rápido, así como para evitar la agregación de otras proteínas, se espera que los inhibidores resultantes presenten poca toxicidad. Segundo, no es probable que se puedan convertir en no operativos por mutantes de escape. De hecho, los p-LES se unen a las LES complementarias de la proteína diana, siguiendo el mismo paradigma que estabiliza el núcleo de plegamiento, estabilización que es controlada por los aminoácidos “calientes” de la proteína [15, 16].

Por consiguiente, los mutantes de escape pueden contener mutaciones en esos aminoácidos “calientes” que son esenciales para la estabilización y conexión de las LES. Dichas mutaciones conducen, como norma, a la desnaturalización de la proteína. En otras palabras, las mutaciones estructurales que no previenen que la proteína se pliegue a su estado biológicamente activo natural, no previenen tampoco la conexión de las estructuras elementales locales en el núcleo de plegamiento, ni la acción inhibidora de los p-LES. Las mutaciones que previenen la formación del núcleo de plegamiento, sea desestabilizando las LES o su conexión, en principio pueden evitar la acción de los p-LES, pero no serán expresadas debido a la incapacidad de la proteína mutada para plegarse.

Resumen de la invención

En resumen, la invención se refiere a un procedimiento sencillo, económico y (esencialmente) exento de errores para individualizar las LES de proteínas globulares de un solo dominio (siendo la longitud típica de estas proteínas de 60 a 150). Por consiguiente, se refiere a la individualización de inhibidores muy eficaces y altamente específicos del plegamiento de estas proteínas (péptidos p-LES) que no es probable que creen resistencia.

Debido a que las proteínas globulares de un solo dominio, como norma, están construidas como una combinación de unidades de secuencias (dominios, bloques [17-24], o módulos [25, 26] de longitud característica de aproximadamente 125 aminoácidos para eucariotas y aproximadamente 150 aminoácidos para procariotas [27, 28]), unidades de secuencia que se pliegan como proteínas de un solo dominio, la invención se refiere también al procedimiento de identificación de inhibidores peptídicos del plegamiento de proteínas independientemente de su tamaño o modularidad, así como a cada uno de los monómeros de los multímeros de tres estados [29, 30].

A continuación, los autores de la invención explican la invención dentro del marco de las unidades de secuencia de una proteína globular o de un monómero que pertenece a un multímero de tres estados.

Objeto de la invención

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de inhibidores peptídicos del plegamiento, y por lo tanto de la actividad biológica específica [4], de proteínas sin inducir mutantes de escape.

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención es un procedimiento para la identificación de inhibidores peptídicos del plegamiento de una proteína que contiene N aminoácidos, cuyo procedimiento comprende:

a) diseñar M péptidos de longitud L, presentando cada uno una secuencia idéntica a un segmento de la proteína diana, de modo que cubran la proteína entera, permitiendo una determinada cantidad de solapamiento entre los diferentes péptidos. Normalmente L contiene aproximadamente 10 aminoácidos, y preferiblemente, varía 1 de aproximadamente 4 a aproximadamente 20. Por consiguiente, M está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, siendo normalmente aproximadamente 20.

b) preparar los M péptidos diseñados de forma individual o en grupos;

c) preparar M disoluciones que contiene cada una la proteína que se está considerando y uno de los péptidos en una relación molar adecuada e incubar cada una de las disoluciones a 37°C.

d) evaluar la eficacia inhibidora del péptido en las disoluciones anteriores o el grado de desplegamiento o ambos, mediante técnicas estándar, de modo que se identifique el péptido dotado de actividad inhibidora frente a la proteína.

El procedimiento de la presente invención es particularmente ventajoso ya que permite identificar de una forma fiable y bastante sencilla el péptido, entre los M péptidos diseñados y preparados a propósito, que tiene una actividad inhibidora, o incluso la mayor actividad inhibidora, frente a la proteína que se está considerando.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, salvo que se proporcione otra cosa, el término “péptido(s)” significa cadena(s) peptídica(s) corta(s) que comprende(n), normalmente, del orden de diez aminoácidos. Preferiblemente, el péptido comprende L aminoácidos con L que varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 20. La secuencia de los “péptido(s)”, salvo que se define otra cosa, coincide con un segmento de igual longitud que la proteína.

Además, por “inhibidor peptídico” los autores de la invención se refieren a un péptido que bloquea el plegamiento de la proteína diana y, de esta forma, su función biológica específica. Es decir, el inhibidor tiene una secuencia esencialmente idéntica a la de una LES de la proteína, y de esta forma también se puede llamar un p-LES [14].

Por “LES” (estructura elemental local, por sus siglas en inglés *Local Elementary Structure*) se hace referencia a las primeras estructuras naturales formadas muy temprano en el proceso de plegamiento [11, 12] (también llamadas plegados o dominios de plegamiento en la bibliografía [9, 10, 38]). Estas estructuras están estabilizadas por aminoácidos que interactúan fuertemente, en general hidrófobos, altamente conservados (“calientes”). Se puede distinguir entre las bien estructuradas llamadas LES cerradas y las menos estructuradas llamadas LES abiertas [15]. Este último tipo de LES no presenta, cuando se aíslan en el disolvente, ningún contacto natural (importante). Por el contrario, las LES cerradas, cuando se aíslan presentan contactos naturales que tienen una función importante también en el núcleo de plegamiento (postcrítico) [13].

Por núcleo de plegamiento “FN” (por sus siglas en inglés, *folding nucleus*) (postcrítico) se hace referencia al conjunto mínimo de contactos naturales necesarios para superar la barrera de energía libre más alta que encuentra la proteína en el proceso entero de plegamiento [13]. Una gran parte de estos contactos surge de la conexión de las LES. Este suceso está esencialmente controlado por las LES cerradas. Por aminoácidos “calientes” se hace referencia a aminoácidos que tienen una función central en el plegamiento de una proteína. La mutación no conservativa de estos aminoácidos, conduce, en general, a la desnaturalización de la proteína [16].

De acuerdo con la etapa (a) del presente procedimiento, junto con cualquier variante de la misma, los M péptidos de longitud L se pueden diseñar para que presenten una secuencia idéntica a un segmento de la proteína que se está considerando. Los valores de M y L se eligen de modo que cubran la secuencia entera de aminoácidos de la proteína, permitiendo también cierta cantidad de solapamiento. Normalmente L tiene 10 aminoácidos (que para las proteínas de un solo dominio de longitud N corresponde a aproximadamente una décima parte del número total de aminoácidos N, es decir $L \approx N/10$) y, preferiblemente, varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 20. Por consiguiente, M está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, siendo normalmente aproximadamente 20.

Solo como ejemplo explicativo no limitante, el procedimiento presente puede proporcionar la identificación de péptidos que tienen actividad inhibidora frente a una proteína, p. ej., que comprende 120 aminoácidos, mediante el diseño de 19 péptidos (es decir, M es igual a 19) cada uno con una longitud de cadena de aminoácidos de 12 aminoácidos.

A partir de lo anterior, puesto que los 19 péptidos, que tiene cada uno una longitud de 12 aminoácidos, presentan una secuencia idéntica a los segmentos dados de la proteína y que debe cubrirse la secuencia entera de la proteína, está claro para el experto en la materia que habrá péptidos con segmentos que se solapan (siendo el solapamiento entre cada péptido consecutivo en este ejemplo particular aproximadamente 50%).

Normalmente, la etapa (a) del presente procedimiento puede proporcionar el diseño sistemático de los M péptidos dados empezando por el aminoácido número 1 y siguiendo, de modo que se cubra de forma progresiva la proteína entera (permitiendo de esta forma de aproximadamente 50% a aproximadamente 70% de solapamiento entre los diferentes péptidos; véase el siguiente Ejemplo 4).

Alternativamente, dichos péptidos M se pueden diseñar empezando por aquellas regiones que corresponden a segmentos de proteína cercanos al nitrógeno y carbono terminales así como al centro de la proteína, permitiendo otra vez el solapamiento entre los diferentes péptidos.

La etapa (b) comprende preparar los M péptidos de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos pueden incluir, como ejemplo, cualquier procedimiento sintético conocido para la síntesis de péptidos o, alternativamente, la posibilidad de tomarlos directamente de la proteína, cortándola en los sitios adecuados, por procedimientos conocidos.

La etapa (c) se lleva a cabo disolviendo cualquiera de los péptidos preparados en la etapa (b) junto con la proteína diana en cualquier disolvente adecuado. La relación molar entre el péptido y la proteína puede variar de forma ade-

cuada en el intervalo de 1:1 a 10:1 (péptido/proteína); preferiblemente, la concentración relativa de péptido/proteína es 3 a 1.

Las disoluciones así obtenidas se incuban a aproximadamente 37°C durante unos minutos, por ejemplo, hasta 10 minutos.

Alternativamente, las etapas b) y c) se pueden sustituir por simulaciones por ordenador en las que se usan modelos simplificados de proteínas (p. ej., el modelo de Gō de todos los átomos, modelo de Gō de C_α etc. [33]) acopladas con muestreo termodinámico o dinámica simulada (p. ej., algoritmo de Monte Carlo, dinámica de Newton, etc.) para simular la evolución de la proteína en presencia de cada tipo de péptido (partiendo de las conformaciones de la proteína desplegada o plegada) y así determinar el grado de desplegamiento de la propia proteína en presencia de estos péptidos.

Estas simulaciones pueden proporcionar información no solo de la secuencia de los inhibidores, que es igual a un segmento de la proteína, si no también de su conformación natural en el disolvente. Se van a preferir los que presentan un grado alto de estructura y estabilidad comparado con los inhibidores que presentan poca estructura y/o grandes fluctuaciones. Esto está de acuerdo con el hecho de que se espera que los inhibidores muy estructurados (que corresponden a las llamadas estructuras elementales locales (LES) “cerradas”, es decir, segmentos de motivos que presentan contactos naturales importantes en la estabilidad de la proteína) sean más específicos y por lo tanto menos tóxicos que otros menos estructurados, llamados LES “abiertas” [11, 12, 15]. Respecto a esto merece la pena indicar que los cálculos de modelos que sólo consideran los átomos Ca de los restos, enfatizan las diferencias que existen entre estos dos tipos de LES.

Cuando existe información experimental sistemática relativa a los valores φ [4] asociados con un gran número de sitios de la proteína, para permitir una determinación de los sitios “templados” y “calientes” de la proteína (es decir, aquellos sitios que tienen una función central en el plegamiento de la proteína [16], siendo los aminoácidos correspondientes que los ocupan altamente conservados), finalmente se puede ajustar ligeramente la longitud y el número de aminoácidos inicial y final a lo largo de la proteína de modo que se garantice que los inhibidores peptídicos incluyen todos los aminoácidos calientes y la mayoría, si no todos, los aminoácidos templados.

El procedimiento de iteración también se puede llevar a cabo calculando los valores φ asociados con los diferentes aminoácidos de la proteína diana, usando un software adecuado (véase el siguiente ejemplo 1). Una vez que se han diseñado los nuevos inhibidores, también se puede ensayar su eficacia mediante los ensayos de la etapa (d) anterior.

De acuerdo con la etapa (d) del presente procedimiento de la invención, la eficacia inhibidora del péptido o el grado de desplegamiento o ambos, en las disoluciones anteriores, se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos convencionales. Como un ejemplo no limitante, los ensayos espectrofotométricos, ensayos de equilibrio de sedimentación, dicroísmo circular o técnicas de resonancia magnética nuclear, pueden usarse y llevarse todos a cabo para determinar el efecto inhibidor anterior.

Igualmente, se conocen experimentos de absorción en la técnica [4] para determinar la eficacia inhibidora cuando la proteína es una enzima [4, 31].

Como se ha descrito anteriormente, una vez que se ha encontrado un péptido que bloquea eficazmente el plegamiento de la proteína, *a priori* no es necesario continuar con el procedimiento de comprobar las propiedades inhibidoras del resto de los péptidos, y la búsqueda e identificación se pueden terminar en este punto.

En otras palabras, el procedimiento de la invención se puede aplicar para identificar el péptido óptimo dotado con la actividad inhibidora más alta entre todos aquellos M péptidos que se han preparado y ensayado.

Alternativamente, como se ha descrito antes, las diferentes disoluciones de la etapa (c) se pueden ensayar en cualquier orden y se puede parar el procedimiento entero una vez que se ha encontrado un péptido que tiene la actividad inhibidora deseada, sin necesidad de ensayar y por lo tanto de preparar todas las disoluciones.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización alternativa de la presente invención, la etapa (a) puede comprender diseñar un solo péptido con una longitud que varía de 4 a 20; la etapa (b) puede comprender preparar dicho péptido; la etapa (c) puede comprender preparar una disolución de la proteína con este mismo péptido; la etapa (d) puede comprender evaluar la actividad inhibidora del péptido. Si se encuentra que la eficacia inhibidora de dicho péptido es satisfactoria, el procedimiento se puede terminar ya que ha permitido identificar fácilmente el inhibidor peptídico adecuado. Al contrario, si no es satisfactorio o el péptido carece en cualquier caso de alguna eficacia inhibidora significativa, las etapas (a) a (d) pueden repetirse con otro péptido hasta la identificación del que sea óptimo.

Los pocos péptidos (1-4) que inhiben el plegamiento de la proteína, y que los autores de la invención llaman p-LES, identifican los segmentos de aminoácidos de la proteína que, en el proceso de plegamiento, dan lugar a las LES.

Puesto que para cumplir su actividad biológica una proteína debe estar en su conformación (plegado) natural, se espera que los p-LES también sean inhibidores eficaces, específicos y eficaces de forma perdurable, de las funciones de proteína.

Debe ensayarse la solubilidad de los p-LES en el medio de cultivo, y se pueden modificar para reducir su hidrofobicidad, si es necesario.

La modificación puede ocurrir, por ejemplo, por: 1) adición de aminoácidos polares y/o cargados; 2) acortamiento de la cadena, es decir pérdida de uno o dos aminoácidos hidrófobos en los extremos C o N o en ambos; 3) mutaciones conservativas, es decir, sustituyendo un aminoácido hidrófobo por otro aminoácido algo menos hidrófobo.

Además, puesto que los p-LES son péptidos, también pueden ser digeridos por las células y/o crear alergias.

En este caso, los p-LES se pueden usar como pistas de los inhibidores de plegamiento correspondientes a sus moléculas miméticas o finalmente péptidos de la misma secuencia de aminoácidos sintetizados usando D-aminoácidos, por procedimientos conocidos.

Ahora se describirán diferentes aspectos y realizaciones de la presente invención con más detalle a modo de ejemplos, con referencia también a miméticos de péptidos y solubilidad de p-LES.

Dichos ejemplos no deben considerarse limitantes de la presente invención, ya que se observará que se pueden aplicar modificaciones de detalles del procedimiento sin desviarse del alcance de la invención.

Figuras

la fig. 1 es un dibujo de la estructura cristalográfica de src SH3. Las (5) láminas beta antiparalelas están representadas mediante cintas con flecha (gris claro), mientras que la hélice alfa se muestra en gris oscuro;

la fig. 2 es la probabilidad de distribución en el equilibrio del parámetro de orden q definido como el número relativo de contactos naturales, calculado a tres temperaturas diferentes para la proteína SH3 sola. La proteína está en la conformación natural para los valores $q > 0,7$ y en el estado desnaturalizado para $q < 0,5$. La temperatura $T = 0,843$ a la que los picos de los estados natural y desnaturalizado tienen la misma área es la temperatura de plegamiento;

la fig. 3 es la probabilidad de distribución en el equilibrio a $T = 0,825$ del parámetro de orden q para el sistema compuesto por el dominio de proteína Src-SH3 y tres péptidos con la misma secuencia que uno de los segmentos de proteína caracterizados por el primer y último aminoácidos presentados en el inserto;

la fig. 4 es la probabilidad de distribución en el equilibrio del parámetro de orden q calculada a $T = 0,825$ para el sistema compuesto por el dominio de proteína Src-SH3 y tres péptidos con la misma secuencia que uno de los fragmentos de proteína caracterizados por el primer y último aminoácidos presentados en el inserto;

la fig. 5 es la población del estado natural a $T = 0,825$ para un sistema compuesto por el dominio de proteína Src-SH3 y tres péptidos cuya secuencia es idéntica a la del fragmento de la proteína de longitud 6 que empieza en el sitio indicado en el eje de abscisas, normalizado con respecto a la población del estado natural de la propia proteína ($p_N^{\text{sin-p-LES}}$). Los péptidos empiezan con el segmento 1-6 y terminan con el segmento 55-60, siendo el solapamiento entre los diferentes péptidos 67%. La línea es para guiar. Los puntos blancos dan información de las propiedades inhibitoras de los péptidos p-S'₂ (=18-28) y p-S'₃ (=36-42) obtenidos por ligera modificación de los dos péptidos originales, en concreto los péptidos p-S₂ (=21-27) y p-S₃ (=35-40) (véase el texto).

la fig. 6 es la población del estado natural del dominio de proteína Src SH3 (puntos blancos) a $T = 0,825$. Los resultados presentados para el valor 0 del eje de abscisas corresponden a la secuencia natural. Los otros resultados corresponden a la proteína que lleva una mutación en los sitios 9, 30 (frío, F), 5, 49 y 55 (templado, T), y 18, 26 (caliente, C). La población relativa del estado natural del dominio de proteína Src SH3 a $T = 0,825$ en presencia de tres P-S3 (35-40) se muestra en términos de triángulos negros. Las líneas son para guiar. Los valores en los diferentes sitios de mutación corresponden a la secuencia natural de la proteína que lleva la mutación indicada en el eje de abscisas.

la fig. 7 es el cambio $\Delta\Delta G$ de energía libre tras mutación de Src-SH3 calculado usando un modelo de Gō modificado. También se muestra el valor de $[\Delta\Delta G]$ y $[\Delta\Delta G] + 2\sigma$. Los sitios con $\Delta\Delta G > [\Delta\Delta G] + 2\sigma$ (nº 18, 26, 27 y 40) se llaman aminoácidos calientes, mientras que aquellos con $[\Delta\Delta G] < \Delta\Delta G < [\Delta\Delta G] + 2\sigma$ (nº 4, 5, 6, 28, 39, 41, 48, 49, 50 y 55) se califican como aminoácidos templados. Los cálculos sistemáticos y la información experimental indican que los sitios "templados" y "calientes" de proteínas monoglobulares de un solo dominio, están presentes en las relaciones mencionadas antes (véase [40] y referencias en la misma).

la fig. 8 es igual que la figura 7 pero para los valores de $\Delta\Delta G_{U-N}$ determinados experimentalmente por ingeniería de proteínas [32]. En este caso, los sitios 10, 20, 24 y 26 son sitios calientes, mientras que los sitios 5, 7, 18, 23, 38, 41, 44, 48, 49 y 50 se califican como sitios templados.

la fig. 9 es un dibujo de la conformación natural del homodímero de HIV-1-PR. Cada monómero contiene 99 aminoácidos. Se muestran con diferentes niveles de grises los dos monómeros. En el monómero presentado a la derecha se destacan en gris oscuro los posibles candidatos de LES asociadas con este monómero [37].

la fig. 10 es el efecto de las mutaciones en una serie de sitios del monómero de HIV-I-PR (eje x) en la estabilidad P_N del estado natural de la proteína (eje y), calculado usando un modelo generalizado de $G\ddot{o}$ de C_α [37]. Las cruces negras corresponden a la estabilidad de la conformación natural del monómero solo (a la temperatura biológica $T=2,5$ kJ/mol), mientras que los puntos negros dan el valor de P_N del monómero en presencia de tres p-LES de tipo p- S_8 (=83-93). El punto negro y la cruz dibujados en el sitio de mutación=0 indican los resultados asociados con la secuencia natural. Las líneas son para guiar.

la fig. 11 es la absorbancia de la actividad de referencia de HIV-I-PR en función del tiempo en presencia del péptido 83-93 (1), de péptidos no inhibidores (2), de los péptidos 61-70 (3) y de los péptidos 9-19 (4) (de la referencia [36]).

Ejemplos

Ejemplo 1

Src-SH3

Este dominio presenta 5 láminas beta antiparalelas y una hélice alfa y está compuesto de 60 restos (véase la figura 1).

Es una referencia interesante para el procedimiento de la invención, ya que se ha caracterizado ampliamente por experimentos termodinámicos así como cinéticos [32].

Usando un molde generalizado de $G\ddot{o}$ [33], se llevaron a cabo simulaciones del plegamiento del dominio SH3 y se calculó la probabilidad de que el dominio esté en su conformación natural (véase la figura 2). Los autores de la invención han repetido los cálculos que desarrollan en cada caso el dominio SH3 en presencia de un péptido que presenta una secuencia igual a una de los 28 segmentos de la proteína de longitud $N/10$ (=6), en concreto 1-6, 3-8, 5-10,..., 55-60, en la relación de péptido-dominio 3:1. Los resultados se muestran en las figuras 3, 4 y 5.

A partir de estos resultados se puede señalar claramente que el plegamiento es inhibido por los péptidos p- S_1 =3-8, p- S_2 =21-27, p- S_3 =35-40 y p- S_4 =45-50, siendo el péptido p- S_3 el más eficaz.

Por consiguiente, los segmentos S_i ($i=1, 2, 3$ y 4) se califican como LES del dominio SH3.

El hecho de que los péptidos p- S_i ($i=1, 2, 3$ y 4) no sean solo inhibidores eficaces si no también permanentemente eficaces está documentado por los resultados presentados en la figura 6.

En la figura 6 se describe el efecto que tienen las mutaciones puntuales en la estabilidad de la propia proteína y en la presencia de tres péptidos p- S_3 . Las mutaciones que no afectan a la estabilidad ni a la capacidad de plegamiento de la proteína (p. ej., mutación en los sitios nº 9 y nº 30) dejan sin cambio la capacidad inhibidora del péptido p- S_3 . Por otra parte, los mutantes de escape (por ejemplo, mutaciones en los sitios nº (5, 18, 26, 49 y 55)) no son capaces de plegado. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que los sitios nº (9, 30), nº (5, 49, 55) y nº (18, 26) se califican como sitios fríos, templados y calientes, respectivamente.

Combinando los resultados presentados en las figuras 5 y 7, se puede ajustar ligeramente la longitud y el número de aminoácidos inicial y final de los cuatro inhibidores p- S_i ($i=1, 2, 3$ y 4), con el fin de asegurar que incluyen todos los sitios calientes (sitios nº 18, 26, 27 y 40) y la mayoría de los sitios templados (4, 5, 6, 28, 39, 41, 48, 49, 50, 55). Un posible resultado de una primera iteración llevada a cabo a lo largo de estas líneas da: p- S_1 =p- S_1' =3-8 (que contiene los aminoácidos templados 4, 5 y 6), p- S_2 =18-28 (aminoácidos calientes 18,26,27; aminoácido templado 28), p- S_3 =36-42 (aminoácido caliente 40; aminoácidos templados 39, 41), p- S_4 = p- S_4' =45-50 (aminoácidos templados 48, 49, 50). Se observa que un solo aminoácido (templado) (nº 55) no está englobado/incluido en este conjunto de péptidos inhibidores. Esto está de acuerdo con el hecho de que no todos los sitios templados, que participan en el FN (postcrítico) pertenecen necesariamente a las LES (p. ej., el aminoácido templado nº 16 de la proteína modelo S_{36} es parte del FN postcrítico, pero no pertenece a ninguna LES [16]). La eficacia mejorada de los péptidos iterados se ilustra por los resultados presentados en la figura 5 para p- S_2' y p- S_3' (puntos blancos).

Merece la pena destacar que todos los resultados descritos hasta ahora surgen de cálculos de modelos. Debido a que en el caso presente (dominio de proteína Src-SH3) existe información experimental detallada relativa a los aminoácidos que presentan una función importante en el proceso de plegamiento (es decir, se conocen los valores de $\Delta\Delta G$ de la ingeniería de proteínas [32], véase la figura 8), se puede aprovechar esta información para llevar a cabo el procedimiento de iteración.

A partir de los resultados presentados en la figura 8, hay que señalar que los sitios "calientes" y "templados" corresponden a los aminoácidos nº 10, 20, 24, 26 y a los aminoácidos nº 5, 7, 18, 23, 38, 41, 48, 50, respectivamente.

Usando estos resultados y los presentados en las figuras 5 y 6, se encuentra que una posible primera iteración da p- S_1' =5-10 (que contiene el aminoácido caliente 10, y los aminoácidos templados nº 5, 7), p- S_2' =20-26 (aminoácidos

ES 2 323 654 T3

calientes nº 20, 24, 26; aminoácido templado nº 23), p-S₃'=38-44 (aminoácidos templados nº 38, 41, 44) y p-S₄'=p-S₄=45-50 (aminoácidos templados nº 48, 50).

5 Las propiedades inhibitoras de estos péptidos determinadas por el enfoque anterior deben ensayarse por los ensayos citados en la etapa (d) del procedimiento de la invención.

Ejemplo 2

10 HIV-PR, computacional

La HIV-1-PR es un homodímero formado por cadenas que contienen 99 aminoácidos cada una (figura 9). Las propiedades de estabilidad de esta enzima se han estudiado mediante simulaciones extensas de todos los átomos a lo largo de cientos de nanosegundos (ns). Usando los correspondientes resultados se desarrolló un modelo de Gō de C_α. Después se usó para simular la evolución dinámica completa del plegamiento de la enzima, y los resultados se compararon con los de las simulaciones de molde de Gō estándar de todos los átomos disponibles en la bibliografía. Combinando el entendimiento obtenido de estas simulaciones y la información proveniente de las mutaciones (Tabla 1), se determinaron los sitios “calientes” y “templados” de la proteína y se seleccionaron los posibles candidatos de las LES. En particular, la región S₈=(83-93) (para detalles véase [37] y las referencias en la misma).

20 Las simulaciones del plegamiento del monómero de HIV-1-PR se llevaron a cabo en presencia de tres péptidos p-S₈. Definiendo la población p_N del estado natural como la probabilidad normalizada de que la cadena presente una RMSD inferior a 10 Å y más de 70% de los contactos naturales formados, se encuentra que $p_N = 0,28$. Este número debe compararse con $p_N = 0,87$ para la proteína sola en las mismas condiciones biológicas, y con los números $p_N = 0,72$ y $0,66$ para la proteína en presencia de péptidos de control que tienen la misma secuencia que el fragmento 61-71 y 4-14) [37].

30 En la figura 10 se muestra la prueba del hecho de que este inhibidor no crea resistencia. Las mutaciones que no afectan a la estabilidad ni a la capacidad de plegamiento de la proteína dejan esencialmente sin cambios a las propiedades inhibitoras del péptido p-S₈ (p. ej., mutación en el sitio nº 19). Las mutaciones de escape (p. ej., mutación en el sitio nº 33) esencialmente no pueden plegarse.

Ejemplo 3

35 HIV-PR, experimental

Se obtuvieron péptidos que presentaban una secuencia idéntica a los segmentos 83-93 (S₈) y a los segmentos 9-19 y 61-70 del monómero de HIV-1-PR natural por síntesis en fase sólida. Cada disolución se preparó por adición de 40 NaCl 0,8 mM, EDTA 1 mM y ditiotreitól 1 mM a un tampón de fosfato 20 mM (pH 6), añadiendo además 2,78 µg de proteasa de HIV-1 y péptido 5,4 µM (es decir, la concentración de cada uno de los diferentes péptidos es 3 veces la de la proteasa).

45 Los ensayos espectroscópicos se llevaron a cabo usando un sustrato cromógeno [34], midiendo su cambio de absorbancia con respecto al tiempo a 310 nm [36]. Algunos de los resultados correspondientes se dan en la figura 11. Se ve que el péptido 83-93 disminuye de modo regular la actividad de la proteasa y por lo tanto se puede usar como inhibidor. Así pues, esta secuencia se puede interpretar como que da lugar a una LES de HIV-1-PR. Como se observa en la figura 9, esta LES está bien estructurada, y contiene un número de contactos naturales internos (que estabilizan una vuelta de hélice alfa). Se califica, por lo tanto, como un inhibidor peptídico particularmente específico. Merece la pena mencionar que se encuentra que las mutaciones observadas en este fragmento [35] o en su fragmento 50 complementario (es decir, fragmento 24-34) son mutaciones conservativas, sean inducidas por fármacos comerciales (dirigidos a la inhibición del sitio activo de la proteasa) o no (véase la tabla 1).

TABLA 1

Las mutaciones observadas de HIV-I-PR como se describen en la referencia [35]. Para cada resto de la secuencia natural (nat.) se listan las mutaciones observadas en los pacientes tratados y/o no tratados (mut.) y la puntuación de PAM250 asociada con la menos conservativa de estas mutaciones (PAM250 es una puntuación derivada del análisis de sustituciones de aminoácidos que se producen entre proteínas relacionadas. Especifica un intervalo de valores positivos para las sustituciones que se producen normalmente entre proteínas relacionadas (mutaciones conservativas) y cero o puntuaciones negativas para sustituciones no probables (mutaciones no conservativas)). Se dan en negrilla los sitios que sufren mutaciones no conservativas.

nat.	mut.	PAM	nat.	mut.	PAM	nat.	mut.	PAM	nat.	mut.	PAM
PI			T26			G51			L76	V	2
Q2			G27			G52			V77	I	4
I3	V	4	A28			F53	L	2	G78		
T4			D29			I54	VMLT	0	P79	A	1
L5			D30	N	2	K55	RH	0	T80		
W6			T31			V56			P81	T	0
Q7			V32	I	4	R57	K	3	V82	TAFIS	-1
R8	KQL	1	L33	FVI	2	Q58	E	2	N83		
P9			E34	DQANG	0	Y59			I84	V	4
L10	FIRV	-3	E35	DG	0	D60	E	3	I85	V	4
V11	IL	2	M36	ILV	2	Q61	ENH	1	G86		
T12	PAEIKN	0	S37	DSTEKHC	-4	I62	V	4	R87	K	
I13	V	4	L38	F	2	L63	PSTACQH	-6	N88	DS	1
K14	R	3	P39	SQT	0	164	VLM	2	L89	MVI	2
I15	V	4	G40			E65	D	3	L90	M	4
G16	EA	0	R41	KN	0	166	FV	1	T91		
G17	E	0	W42			C67	FS	-4	Q92	KR	1
Q18	H	3	K43	RT	0	G68			193	L	2
L19	ITVQP	-3	P44			H69	KQYRN	0	G94		
K20	MRTIV	-2	K45	IRN	-2	K70	RTE	0	bf A95	SF	-3
E21			M46	F1LV	0	A71	TVI	-1	T96		
A22			I47	V	4	I72	VTLMER	-2	L97	V	2
L23	I	2	bf G48	V	-1	G73	STCA	1	N98		
L24	IVF	2	G49			T74	SAP	0	F99		
D25			I50	VL	2	V75	I	4			

Ejemplo 4

Dada una proteína que contiene N aminoácidos, se pueden preparar péptidos de longitud $L = (N/10) \pm 2$, que presenten cada uno la misma secuencia de un segmento de la proteína. El péptido n° 1 coincide con el segmento que empieza con el aminoácido 1 y termina con el aminoácido L, el péptido n° 2 coincide con el segmento $(L/z+1) - [(1+z)L/z], \dots$, mientras que el péptido i coincide con el segmento $(iL/z+1) - [(i+z)L/z]$, con $i=1,2,\dots,i_m$, donde $i_m = zN/L - z$. Por consiguiente, el número máximo de péptidos que se van a producir es $i_m + 1$. La cantidad z controla el solapamiento

ES 2 323 654 T3

permitido entre dos péptidos consecutivos. Los valores recomendados son $z=2,3$ que conducen a 50% y 67% de solapamiento.

A modo de ilustración (realista) se escogen los valores $N=100$, $L=10$, $z=3$. Entonces se obtiene i_m 27 y 67% de solapamiento. El número que corresponde al primer y el último aminoácido de cada uno de los 28 péptidos posibles se recogen en la Tabla 2.

Se correlacionan estos resultados con el caso del monómero del dímero de HIV-I-PR y se suponen tres escenarios diferentes que se siguen en la búsqueda de los péptidos que inhiben el plegamiento: a) búsqueda ordenada empezando por el aminoácido (aa) 1 y prosiguiendo al aa 100 (es decir, empezando por el extremo N y prosiguiendo hacia el extremo C), b) búsqueda ordenada pero en el orden inverso (de 100 a 1, es decir, del extremo C al N), c) búsqueda aleatoria empezando por el extremo N y por el extremo C así como por el medio de la proteína, y después moviéndose alejándose de esas regiones para cubrir la proteína entera. En el primer caso se necesitarían 26 intentos para encontrar el inhibidor p-LES (péptido nº 26 de la tabla 2), en el segundo caso 3 intentos, mientras que en el tercer caso 12 intentos (véase la tabla 2).

TABLA 2

Un ejemplo de división de la secuencia de HIV-1-PR en péptidos. Las columnas indican, respectivamente, el número de identificación del péptido, el índice i (véase el texto), el fragmento correspondiente en la secuencia de HIV-I-PR, y (en números romanos) un ejemplo de inhibición no secuencial, partiendo del centro de la proteína y los extremos C y N terminales esencialmente de forma simultánea. En este caso la búsqueda termina después de 12 etapas cuando se ensaya el péptido nº 26.

péptido nº	i	intervalo	aleatorio
1	—	1-10	III
2	1	4-13	VII
3	2	8-17	XI
4	3	11-20	
5	4	14-23	
6	5	18-27	
7	6	21-30	
8	7	24-33	
9	8	28-37	
10	9	31-40	
11	10	34-43	
12	11	38-47	X
13	12	41-50	V
14	13	44-53	I
15	14	48-57	II
16	15	51-60	VI
17	16	54-63	IX
18	17	58-67	
19	18	61-70	
20	19	64-73	
21	20	68-77	

22	21	71-80	
23	22	74-83	
24	23	78-87	
25	24	81-90	
26	25	84-93	XII
27	26	87-97	VIII
28	27	91-100	IV

Referencias

1. A.L. **Horwich** y J.S. **Weissman**, Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease, *Cell* 89 (1997) 499
2. D.R. **Booth** y col., Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis, *Nature* 385 (1997) 787
3. D. **Sidransky** y M. **Hollstein**, Clinical implications of the p53 gene. *Annual Review of Medicine*, 47 (1996) 285
4. A. **Fersht**, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, New York (1999)
5. C. **Branden** y J. **Tooze**, *Introduction to Protein Structure*, Garland, New York (1999)
6. H. J. **Dyson** y P. E. **Write**, Peptide conformation and protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993) 60-65
7. L.C. Wu, R. **Grandorri** y J. **Carey**, Autonomous Subdomains in Protein Folding, *Prot. Sci.* 3 (1994) 396-371
8. Y. **Bai**, J.S. **Mulue**, L. **Mayne** y S.W. **Englander**, Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, *Proteins* 17 (1993) 75-86
9. R. **Jaenicke**, Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies, *Biochem.* 30 (1991) 3147-61
10. A. **Wallqvist**, G.W. **Smithers** y D.G. **Covell**, A cooperative folding unit in HIV-1 protease. Implications for protein stability and occurrence of drug-induced mutations, *Prot. Engin.* 11 (1998) 999-1005
11. R.A. **Broglia** y G. **Tiana**, Hierarchy of Events in the folding of model proteins, *J. Chem. Phys.* 114 (2001) 7267-7273
12. G. **Tiana** y R.A. **Broglia**, Statistical Analysis of Native Contact Formation in the Folding of Designed Model Proteins, *J. Chem. Phys.* 114 (2001) 2503-2507
13. V.I. **Abkevich**, A.M. **Gutin** y E.I. **Shakhnovich**, Specific nucleus as the transition state for protein folding, *Biochem.* 33 (1994) 10026-10032
14. R.A. **Broglia**, G. **Tiana** y R. **Berera**, Resistance proof, folding-inhibitor drugs, *J. Chem. Phys.* 118 (2003) 4754-4758
15. R.A. **Broglia** y G. **Tiana**, Reading the three-dimensional structure of a protein from its amino acid sequence, *Proteins* 45 (2001), 421-427
16. G. **Tiana**, R.A. **Broglia**, H.E. **Roman**, E. **Vigazzi** y E.I. **Shakhnovich**, Folding and Misfolding of Designed I Protein-like Folding and Misfolding of Designed Protein-like Chains with Mutations, *J. Chem. Phys.* 108 (1998) 757-761
17. D.B. **Wetlaufer**, Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 697-701
18. D.B. **Wetlaufer**, Folding of protein fragments, *Adv. Prot. Chem.* 34 (1981) 61-92
19. G.E. **Schuly** y R.H. **Schirmer**, *Principles of Protein Structure*, Springer, Heidelberg (1979)
20. G.E. **Schulz**, Domain motions in proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1 (1991) 883-888

21. K.A. **Dill**, Theory for the folding and stability of globular proteins, *Biochem.* 24 (1985) 1501-1509
22. J.S. **Richardson**, The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, *Adv. Prot. Chem.* 34 (1981) 167-339
- 5 23. J. **Janin** y S.J. **Wodak**, Structural domains in proteins and their role in the dynamics of protein function, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 42 (1983) 21-78
24. D.S. **Goodsell** y A. J. **Olson**, Soluble proteins: size, shape and function, *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993) 65-68
- 10 25. R.F. **Doolittle**, Reconstructing history with amino acid sequences, *Prot. Sci.* 1 (1992) 191-200
26. P. **Bork**, Mobile modules and motifs, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 413- 421
- 15 27. A. L. **Berman**, E. **Kolker** y E. N. **Trifonov**, Underlying order in protein sequence organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 4044-4047
28. D. **Xu** y R. **Nussinov**, Favorable domain size in proteins, *Fold. Design.* 3 (1998) 11
- 20 29. E. **Shakhnovich**, Proteins with selected sequences fold into unique native conformation, *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994) 3907
30. G. **Tiana** y R.A. **Broglia**, Folding and design of dimeric proteins, *Proteins* 49 (2002) 82-94
31. C. **Cantor** and C. **Schimmel**, *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman and Co. (1994)
- 25 32. V.P. **Grantcharova**, D.S. **Riddle**, J.V. **Santiago** y D. **Baker**, Important role of hydrogen bonds in the structurally polarized transition state for folding of the src SH3 domain, *Nature Struct. Biol.*, 5 714 (1998)
33. N. Gö, Theoretical studies of protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 12 183-21 (1983)
- 30 34. T.A. **Tomaszek** y col., Chromophoric peptide substrates for the spectrophotometric assay of HIV-1 protease, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168, 274-280 (1990)
- 35 35. R.W. **Shafer**, P. **Hu**, A.K. **Patick**, C. **Craig** y V. **Brendel**, Identification of biased amino acid substitution patterns in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with protease inhibitors, *J. Virol.* 73 (1999) 6197-6202
36. R.A. **Broglia**, G. **Tiana**, D. **Provasi**, F. **Simona**, L. **Sutto**, F. **Vasile** y M. **Zanotti**, pendiente de publicación, Design of a folding inhibitor of the HIV-1 Protease, q-bio/0408013
- 40 37. R.A. **Broglia**, G. **Tiana**, L. **Sutto**, D. **Provasi** y F. **Simona**, Design of HIV-I-PR inhibitors which do not create resistance: blocking the folding of single monomers, q-bio/0504011
38. H. **Maity**, M. **Maity**, M.M.G. **Krishna**, L. **Mayne** y S.W. **Englander**, NMR characterization of residual structure in the denatured state of protein L, *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 102 (2005) 4741-4746
- 45 39. Q. **Yi**, M.L. **Salley-Kim**, E.J. **Alm** y D. **Baker**, NMR Characterization of residual structure in the denatured state of protein L, *J. Mol. Biol.* 299 (2000) 1341-1351.
- 50 40. R.A. **Broglia**, G. **Tiana** y D. **Provasi**, Simple models of protein folding, *J. Phys. Cond. Mat.* 16 (2004) R111-R114
41. A.M. **Lesk** y G.D. **Rose**, Folding units in globular proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 4304-4308

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la identificación de inhibidores peptídicos del plegamiento de una proteína que contienen N aminoácidos, cuyo procedimiento comprende:

a) diseñar M péptidos de longitud L normalmente del orden de 10 y, en general, en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 20, presentando cada uno una secuencia idéntica a un segmento de la proteína que se está considerando, de modo que se cubra la longitud entera de la proteína con cierto grado de solapamiento, en el que M es un número entero que normalmente varía de 5 a 50;

b) preparar los M péptidos diseñados individualmente o en grupos;

c) preparar M disoluciones que contengan cada una la proteína que se está considerando y uno de los péptidos en una relación molar adecuada, e incubar cada una de las disoluciones a 37°C;

d) evaluar la eficacia inhibidora del péptido en las disoluciones anteriores o el grado de desplegamiento o ambos, mediante técnicas estándar, de modo que se identifique el péptido dotado de actividad inhibidora frente a la proteína.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que N está comprendido entre 60 y 150.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la longitud L del péptido está comprendida entre 4 y 20.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la longitud del péptido corresponde a $L=N/10$.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se lleva a cabo sintetizando los M péptidos o cortando de forma adecuada la proteína diana, de acuerdo con procedimientos estándar.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la relación molar de péptido/proteína puede variar de 1:1 a 10:1.

7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la relación molar de péptido/proteína es 3 a 1.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las etapas (b) y (c) se pueden sustituir por simulaciones con programas de ordenador.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las etapas (b) y (c) se llevan a cabo mediante ensayos espectrofotométricos, ensayos de equilibrio de sedimentación, dicroísmo circular o técnicas de resonancia magnética nuclear.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, aplicado a cada dominio de proteínas de múltiples dominios.

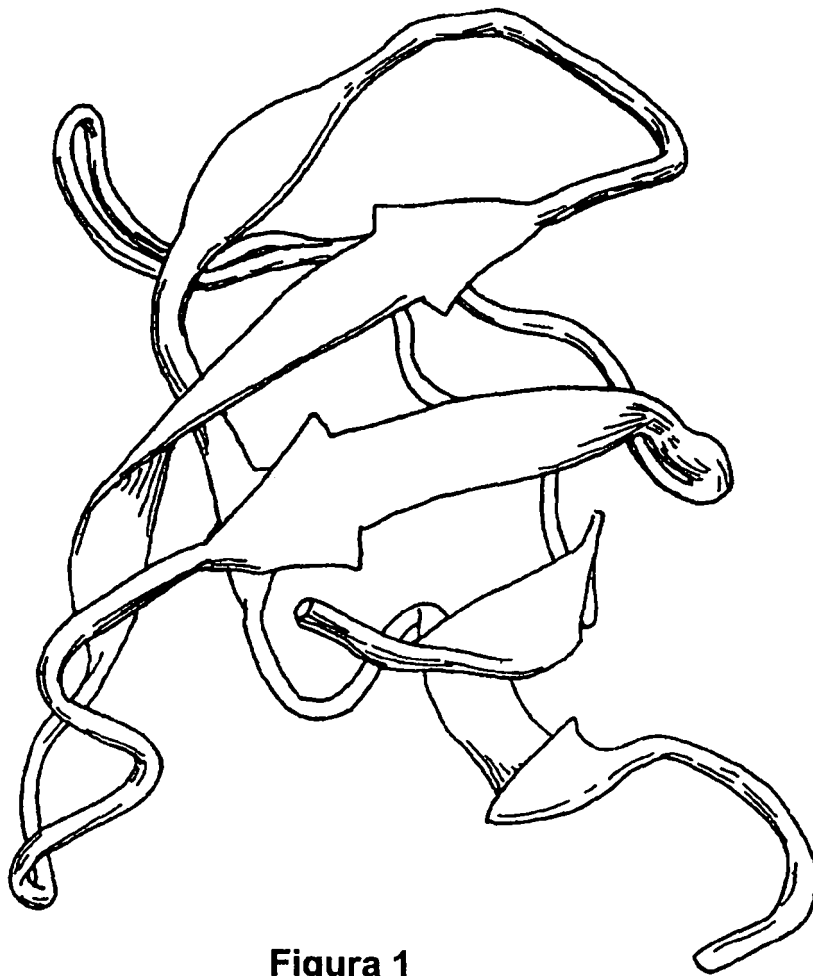


Figura 1

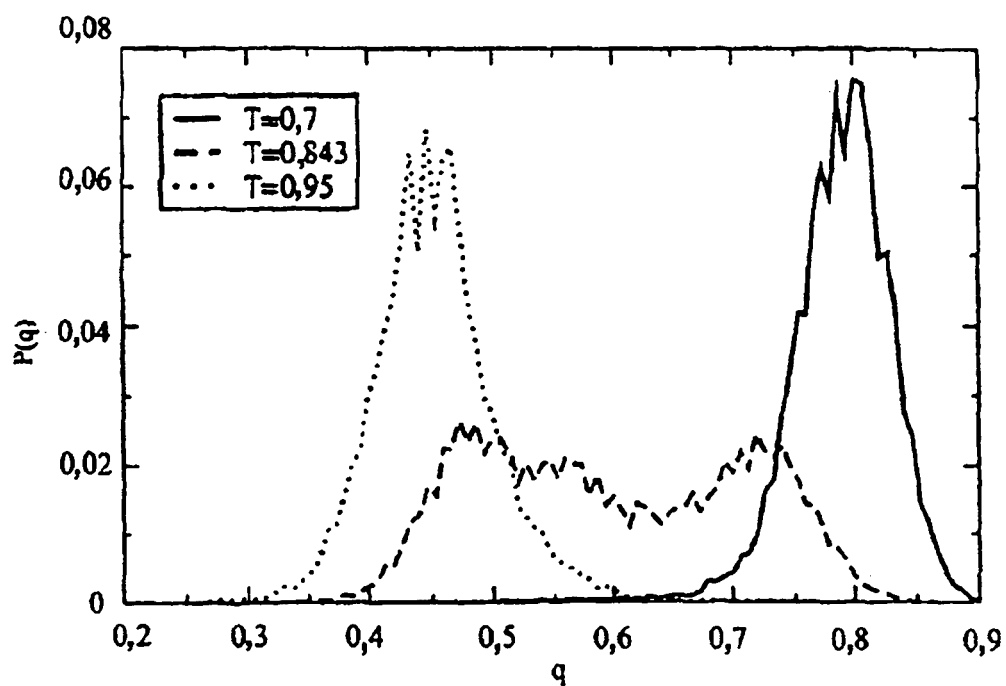


Figura 2

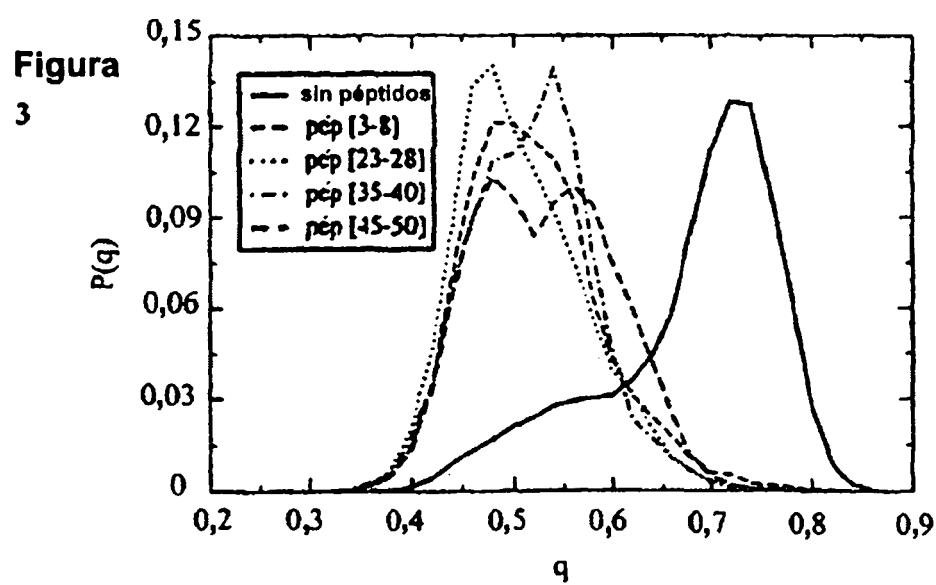


Figura 3

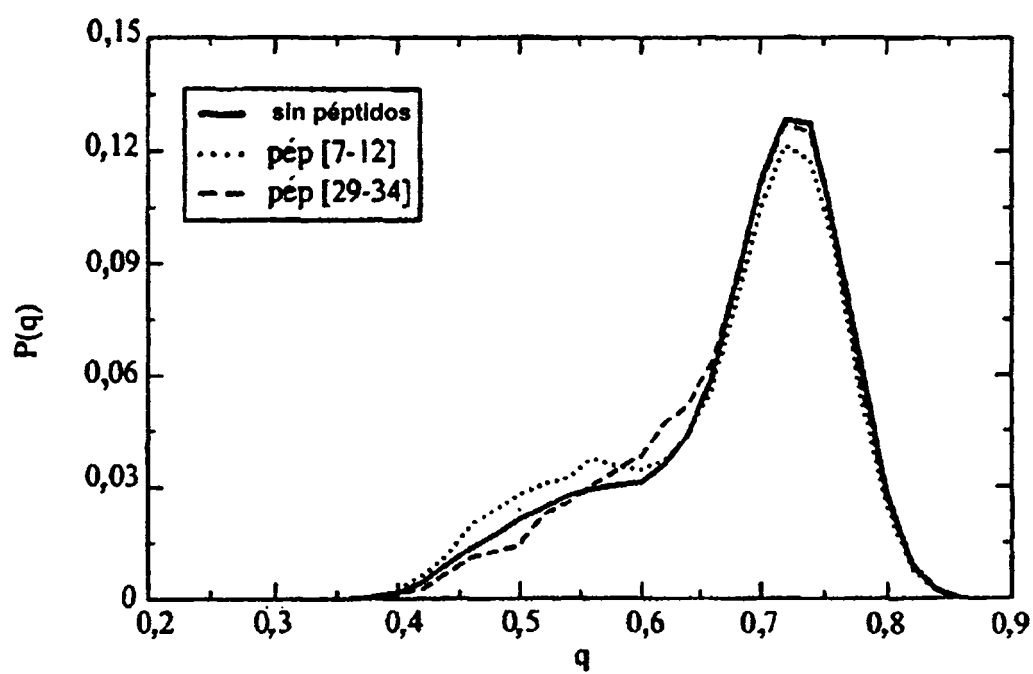


Figura 4

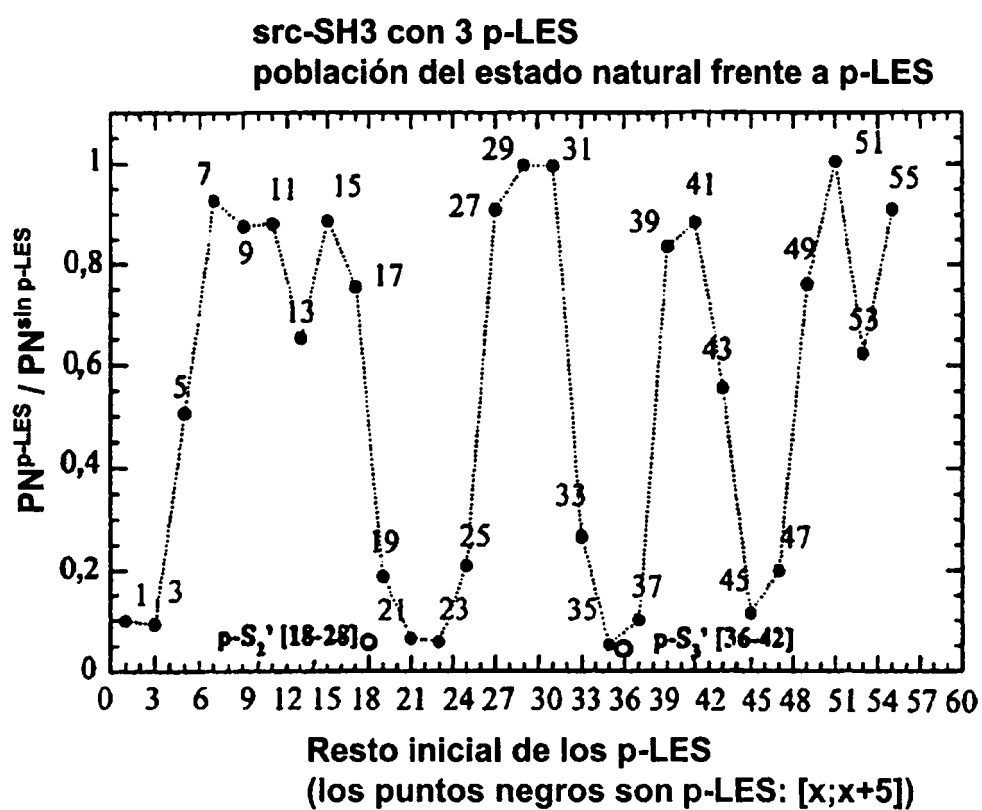


Figura 5

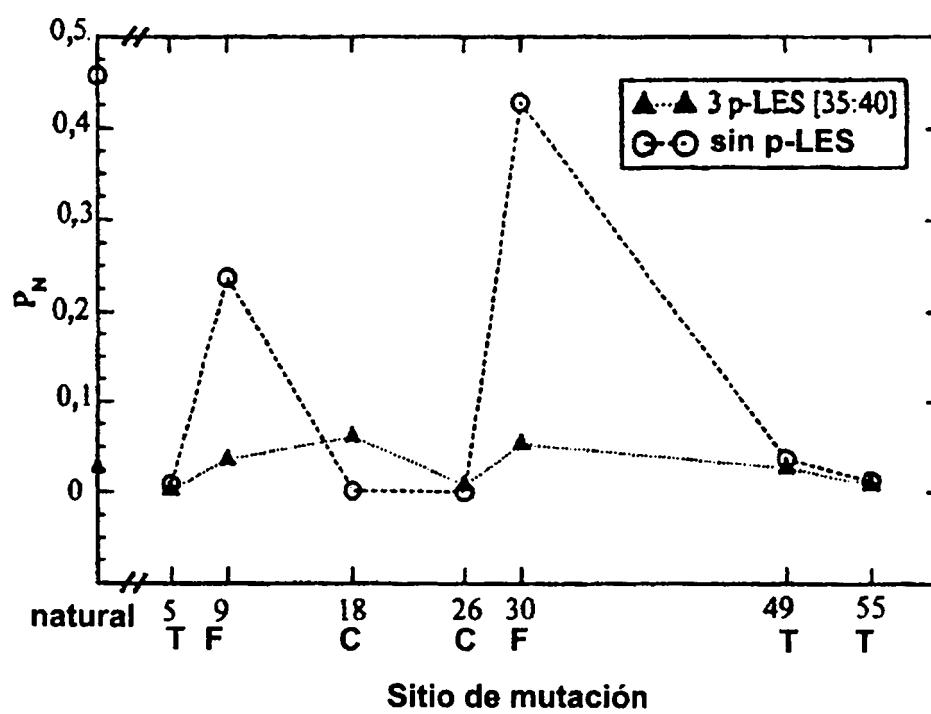


Figura 6

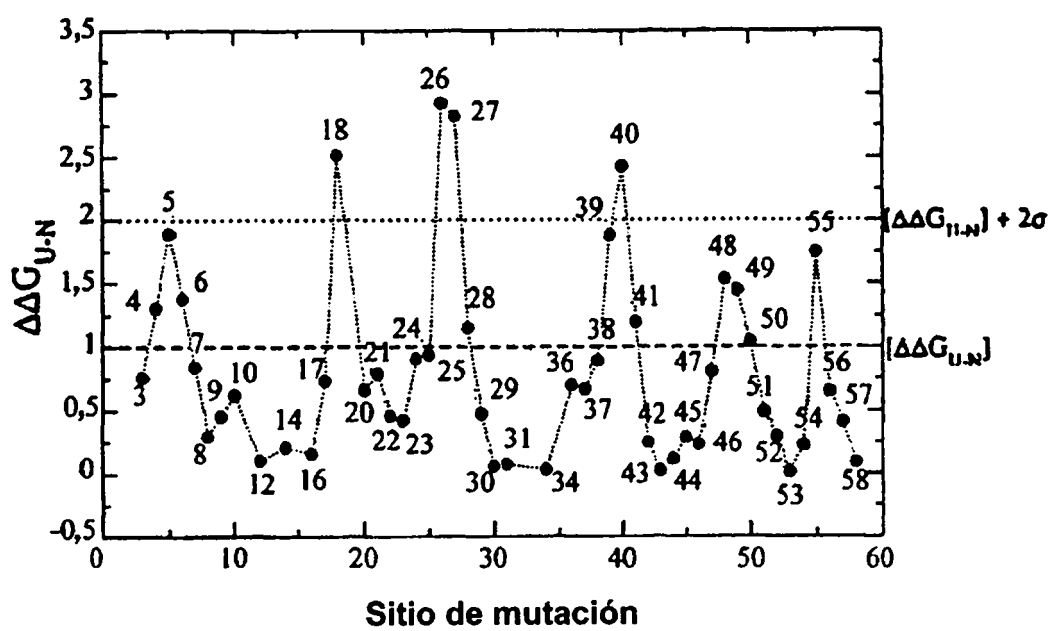


Figura 7

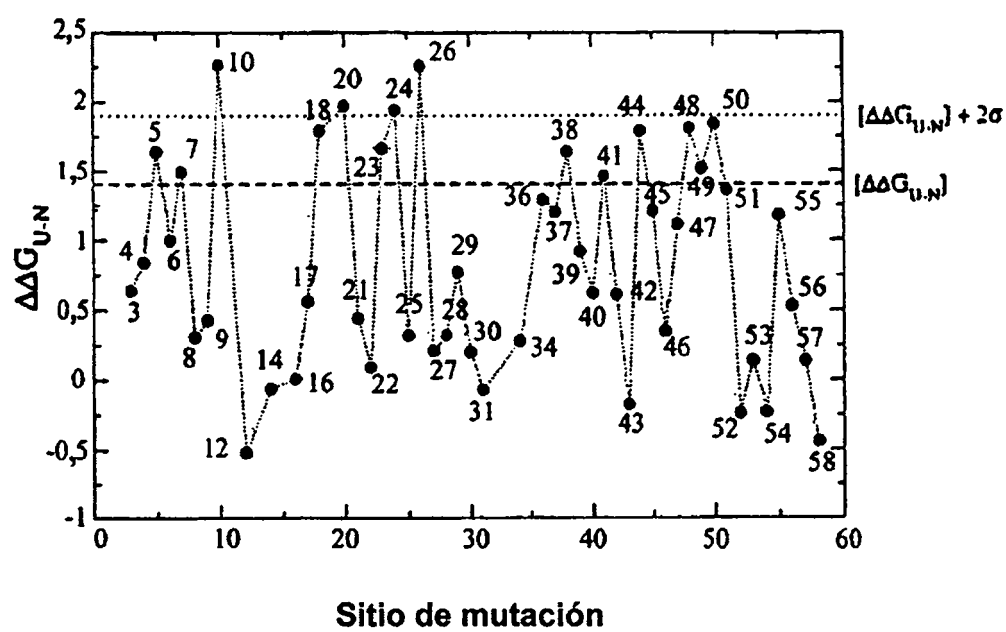


Figura 8

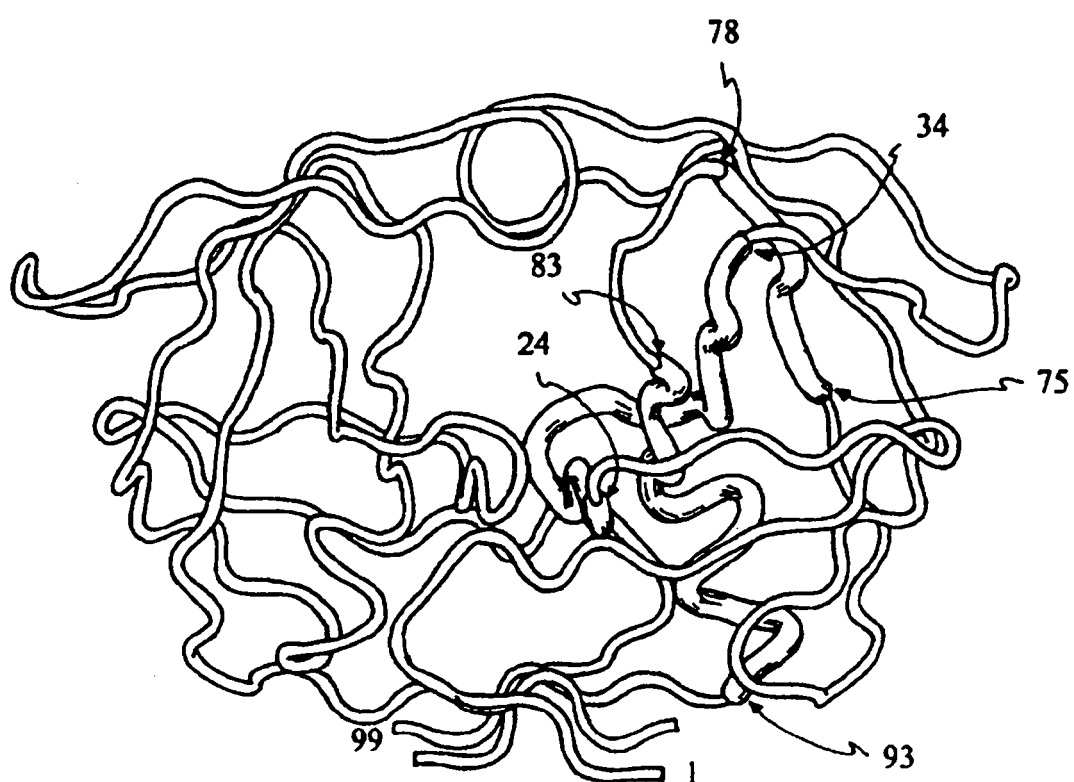


Figura 9

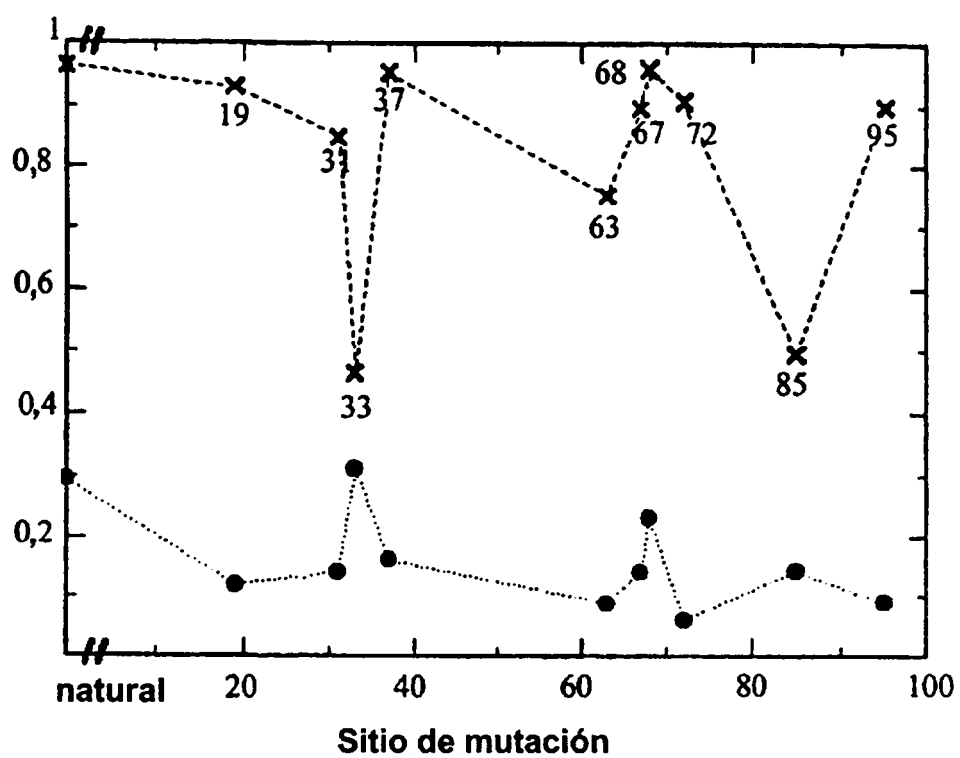


Figura 10

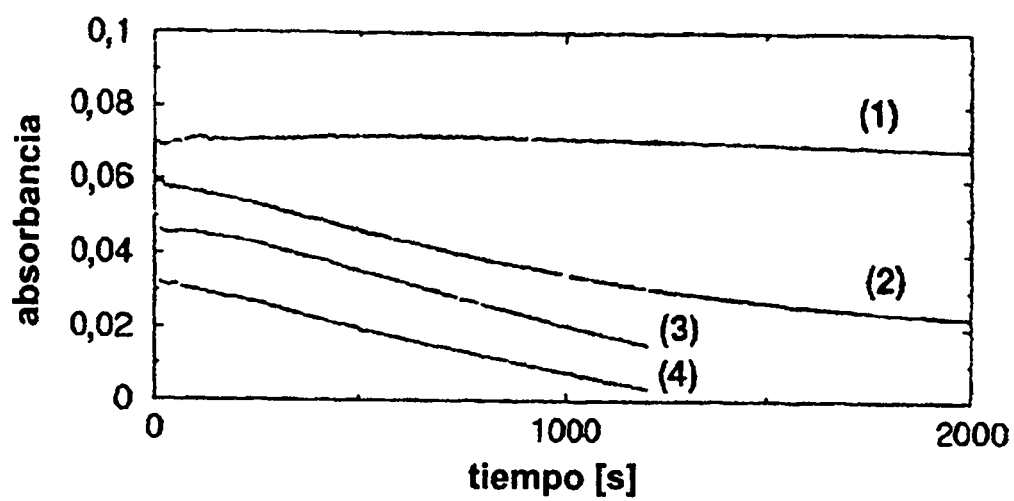


Figura 11