

# INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

---

**Biotecnología de Enzimas  
2023**

María Rocío Meini  
mrmeini86@gmail.com

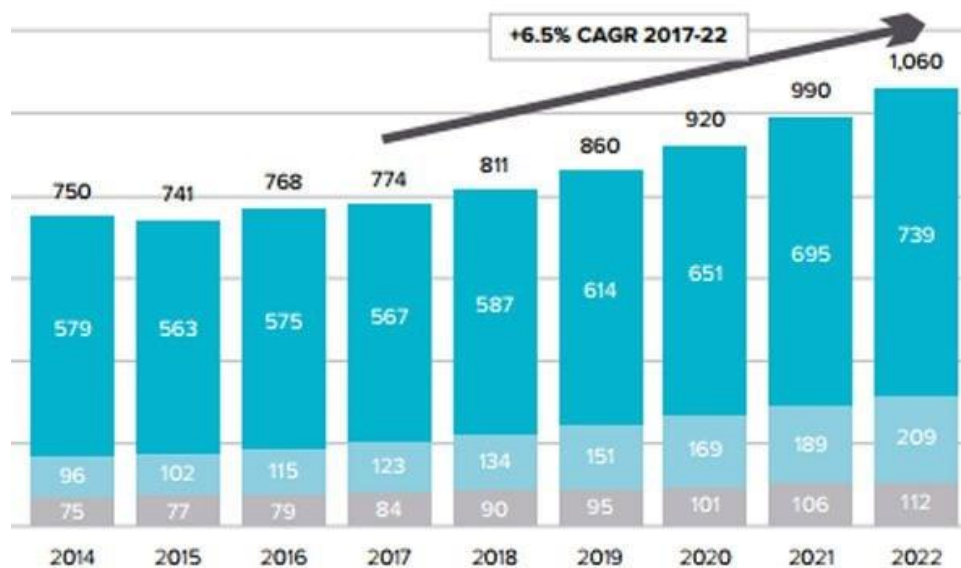
# ¿Qué es un inhibidor? ¿Por qué inhibir enzimas?

- Se entiende por **inhibidor enzimático** aquella molécula capaz de inhibir una reacción, bien **irreversible** ó **reversiblemente**.
- La **inhibición enzimática** sirve como un mecanismo de control en los sistemas biológicos, permitiendo la **regulación de los caminos metabólicos**.
- Los propios inhibidores naturales suelen emplearse para estudiar el **mecanismo de las enzimas**.

# ¿Qué es un inhibidor? ¿Por qué inhibir enzimas?

- Las **enzimas** son **blancos ideales** para intervenciones farmacológicas debido a que cumplen roles esenciales en los **procesos fisiológicos** y **patofisiológicos**.
- Los **inhibidores enzimáticos** representan casi la **mitad de las drogas utilizadas** en la clínica actualmente.

Evolución del mercado farmacéutico, en miles millones de dólares



# ¿Conocen inhibidores? Tal vez más de los que se imaginan...

Inhibidor/es	Condición	Enzima blanco
Aspirina / Ibuprofeno	Inflamación	Ciclooxigenasa ó prostaglandina-endoperóxido sintasa
Captopril	Hipertensión	ACE enzima convertidora de angiotensina
Lovastatina	Colesterol alto	HMGCoA reductasa
Omeprazol	Úlcera gástrica	H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPasa
Penicilina	Infección bacteriana	Transpeptidasa bacteriana
Aciclovir	Herpes	DNA polimerasa viral
Zidovudina	SIDA	Transcriptasa reversa HIV

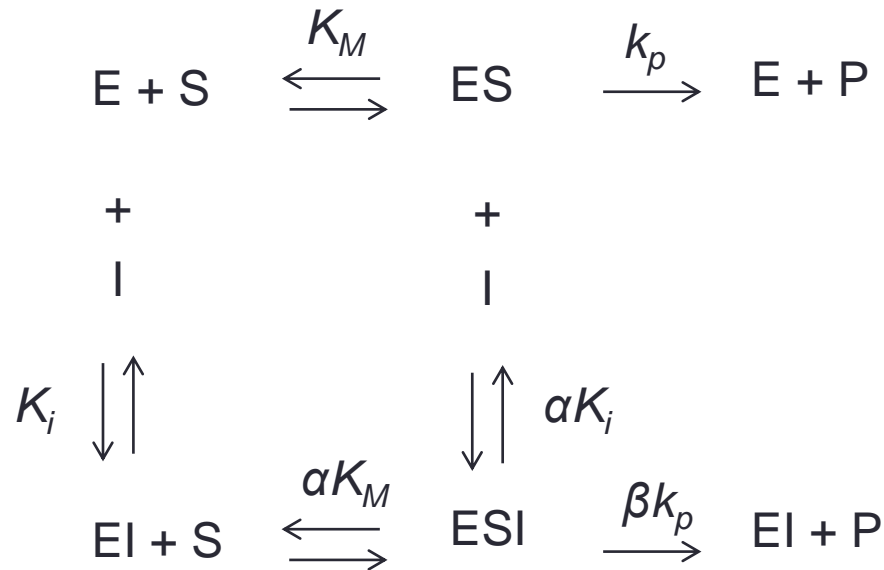
# Tipos de inhibición

- **Irreversible:** la enzima queda inactivada de forma permanente, casi siempre por unión covalente al inhibidor
  - Ej: la aspirina (ác. acetilsalisílico) inhibe irreversiblemente la acción de la prostaglandina sintasa
- **Reversible:** el inhibidor puede disociarse de la enzima porque interacciona de forma no covalente. Puede ser de tipo:
  - **Competitiva:** el inhibidor se une a la enzima libre, la unión del inhibidor y del sustrato son mutuamente excluyentes.
  - **No competitiva (o mixta):** el inhibidor presenta afinidad por la enzima libre y por el complejo enzima-sustrato
  - **Acompetitiva:** el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato

# Parámetros que describen un inhibidor reversible

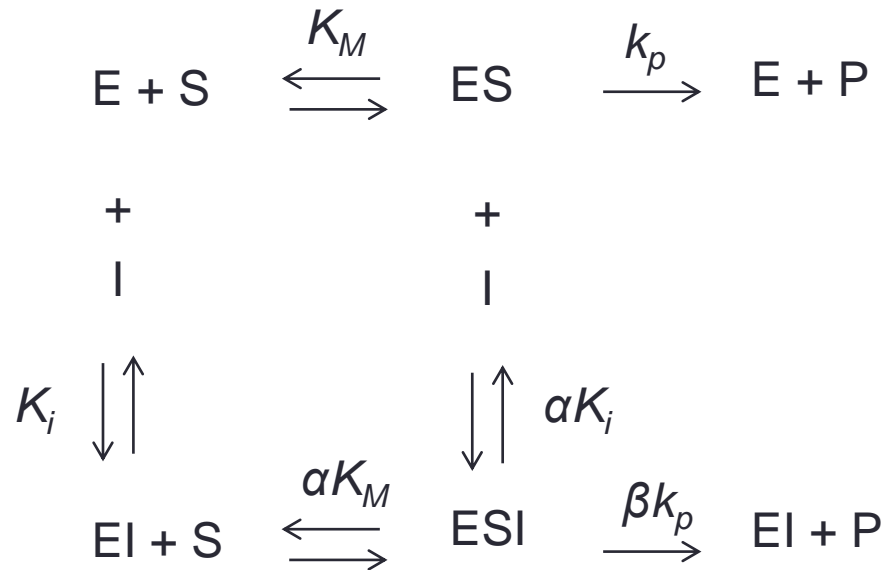
- Los inhibidores se pueden unir a la forma libre de la enzima, al complejo enzima-sustrato ó a ambos.
  - La afinidad de la droga por la enzima se describe en términos de constante de disociación por las distintas formas.
  - Las comparaciones de afinidad se pueden realizar en términos de energía libre de Gibbs
- EI / ESI / EI & ESI
  - $K_i, \alpha K_i$
  - $\Delta G$

# Esquema general de equilibrio en presencia de un inhibidor reversible



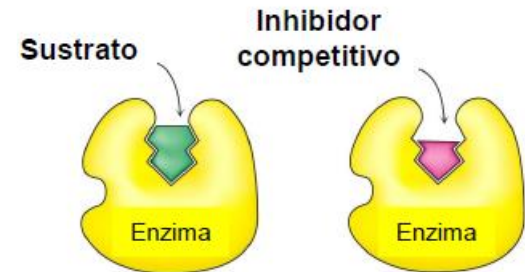
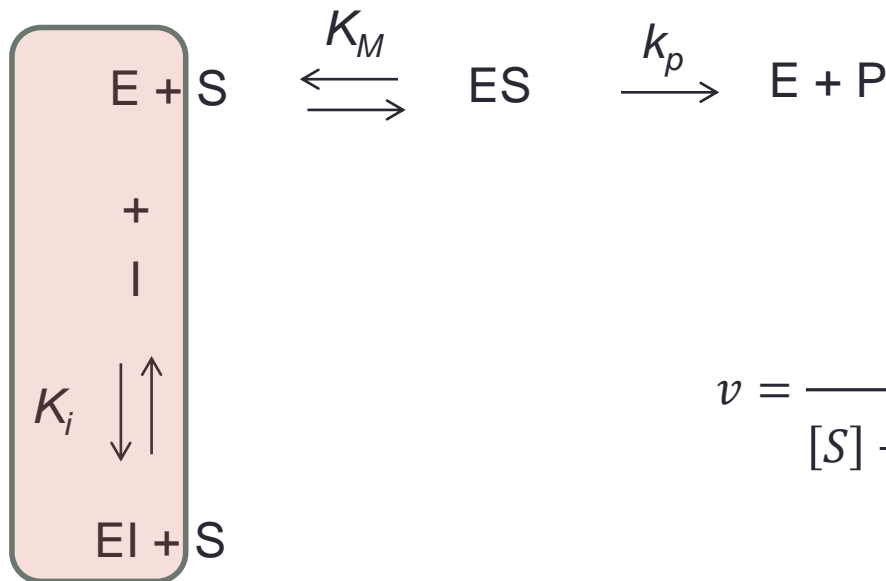
$\alpha$	Efecto en la afinidad de la enzima por S en presencia de I	Tipo de inhibición
1	No cambia	No competitiva "pura"
<1	Aumenta	No competitiva ó "mixta"
>1	Disminuye	No competitiva ó "mixta"

# Esquema general de equilibrio en presencia de un inhibidor reversible



$\alpha$	Efecto en la afinidad de la enzima por S en presencia de I	Tipo de inhibición
$\lll 1$	El inhibidor sólo se une a ES	Acompetitiva
$\infty$	El inhibidor excluye la unión de S	Competitiva

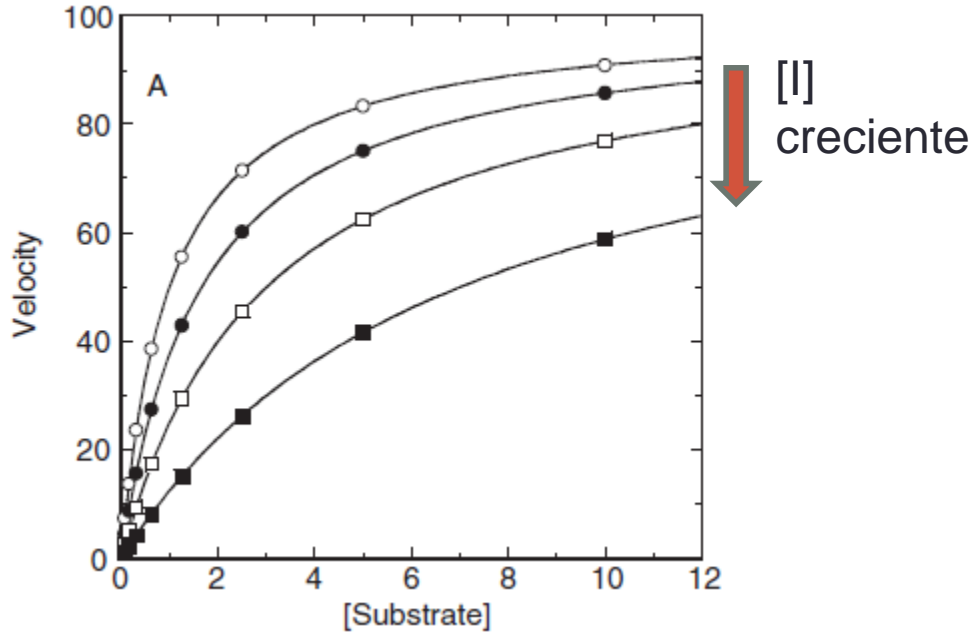
# Inhibidor competitivo



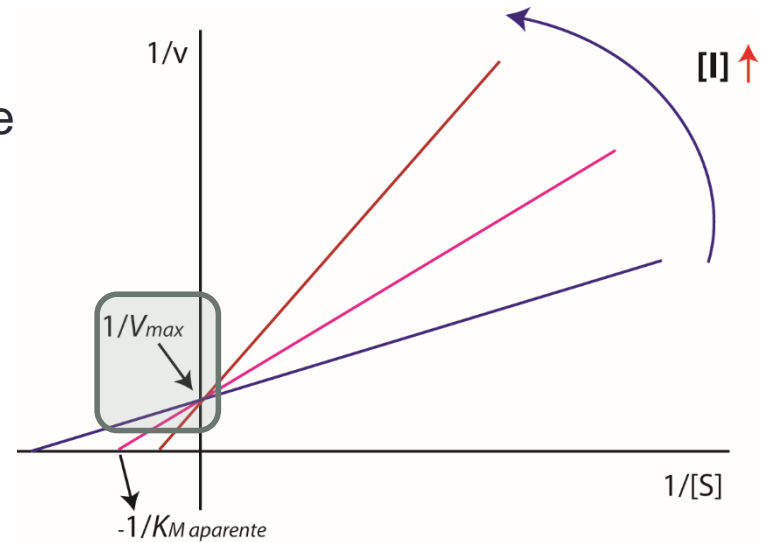
$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{[S] + K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

- Se une exclusivamente a la enzima libre → compete con el sustrato por el pool de enzima (en general se une al sitio activo, pero no necesariamente).
- No afecta los pasos que siguen a la formación de ES → no afecta  $V_{max}$
- Aumenta el valor de  $K_M$  aparente.
- A  $[S] \gg K_M$  puede evitarse el efecto de la inhibición.

# Inhibidor competitivo



Lineweaver-Burk



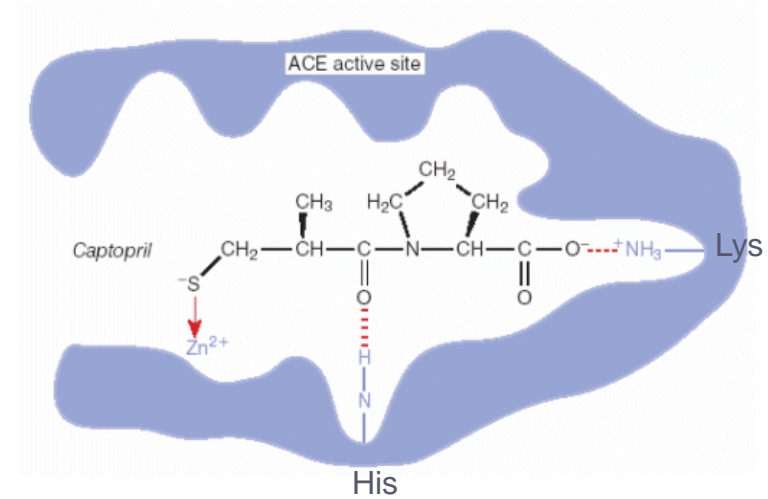
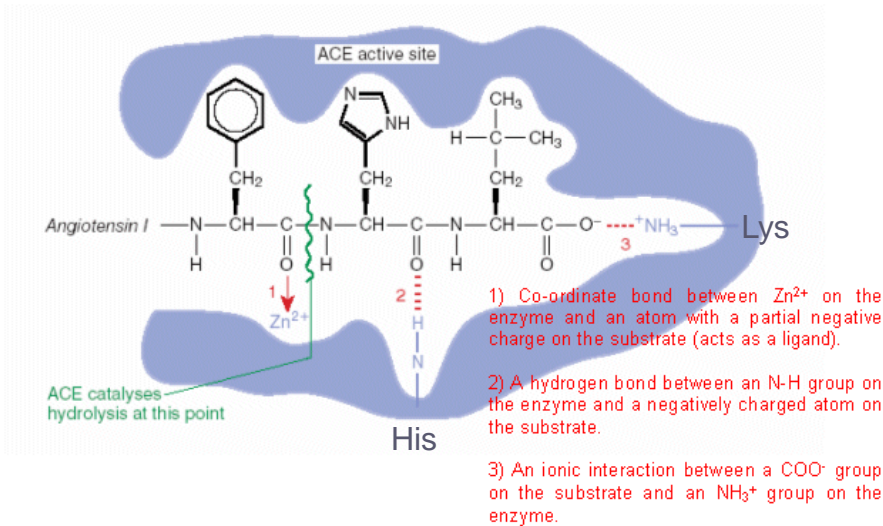
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right]}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

pendiente

# Ejemplo de Inhibidor competitivo: Captopril

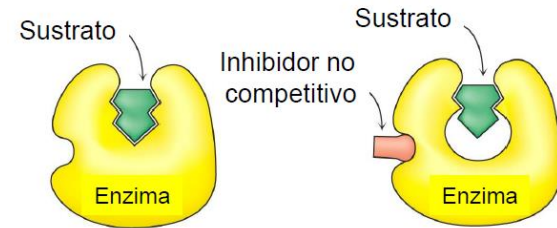
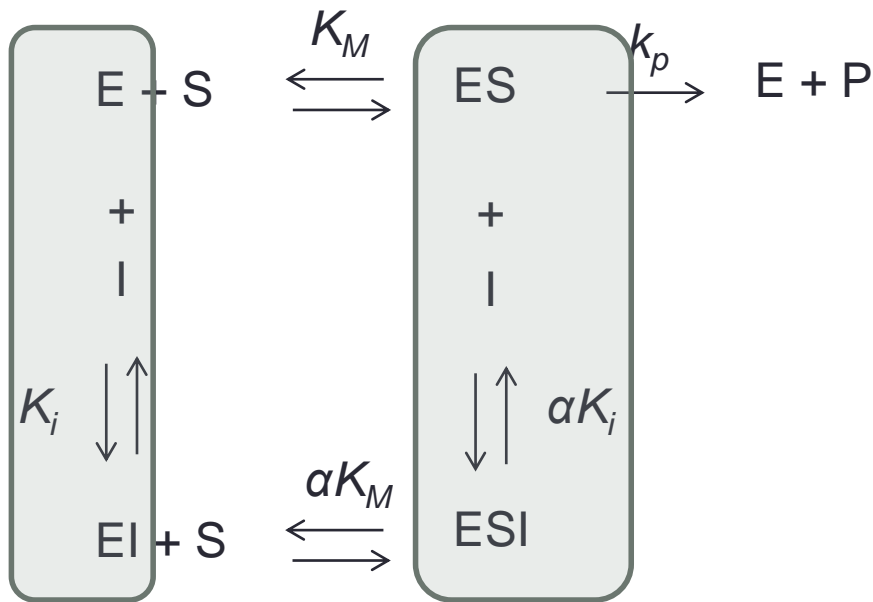
- El captopril es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), ampliamente utilizado como agente anti-hipertensivo.
- ACE es una carboxipeptidasa dependiente de zinc, que cataliza la hidrólisis del decapeptido angiotensina I al octapeptido angiotensina II. Angiotensina II es un vasoconstrictor que incrementa la presión sanguínea.
- Captopril es un ejemplo de **inhibidor competitivo diseñado en base al mecanismo de la enzima**.

# Ejemplo de Inhibidor competitivo: Captopril



Captopril – ACE humana  
 $K_i = 1.7 \text{ nM}$

# Inhibición no competitiva



$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} [S]}{[S] + K_M \left(\frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}\right)}$$

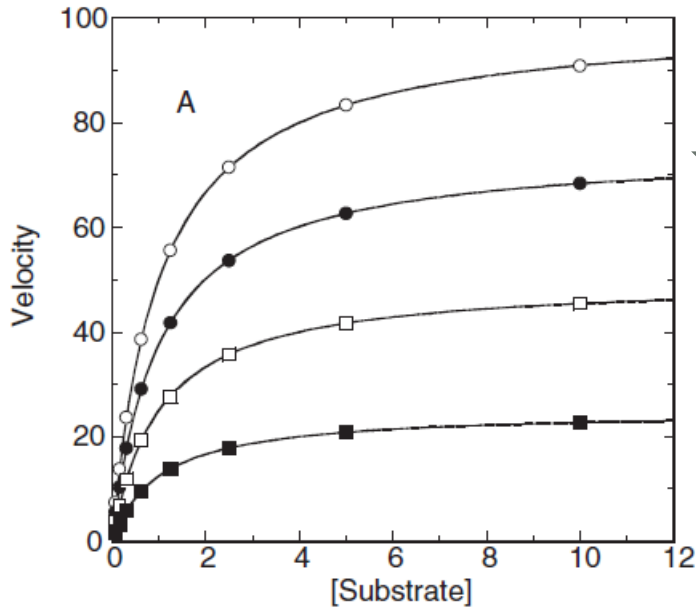
↓ simplificando

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

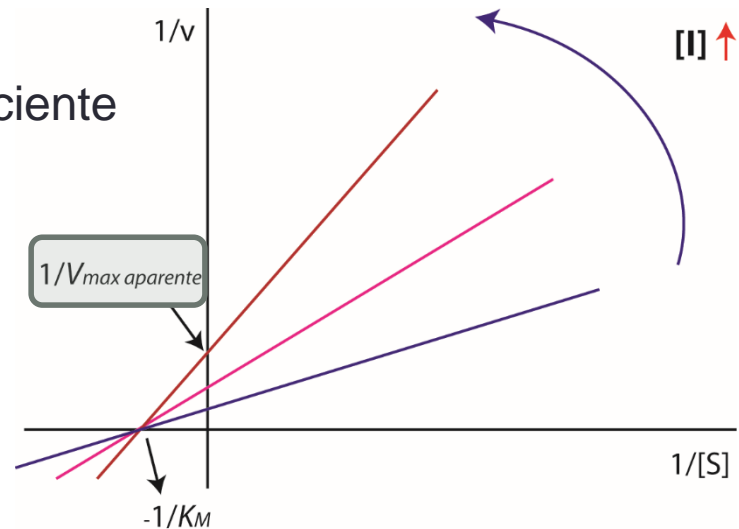
- El inhibidor se une tanto a E como a ES, por lo tanto afecta los valores aparentes de  $V_{max}$  (influenciado por  $\alpha K_i$ ) y de  $K_M$  (influenciado por  $K_i$  y  $\alpha K_i$ )

# Inhibición no competitiva

$\alpha=1$



Lineweaver-Burk



- $V_{m\acute{a}x}$  aparente disminuye
- $K_M$  aparente no cambia

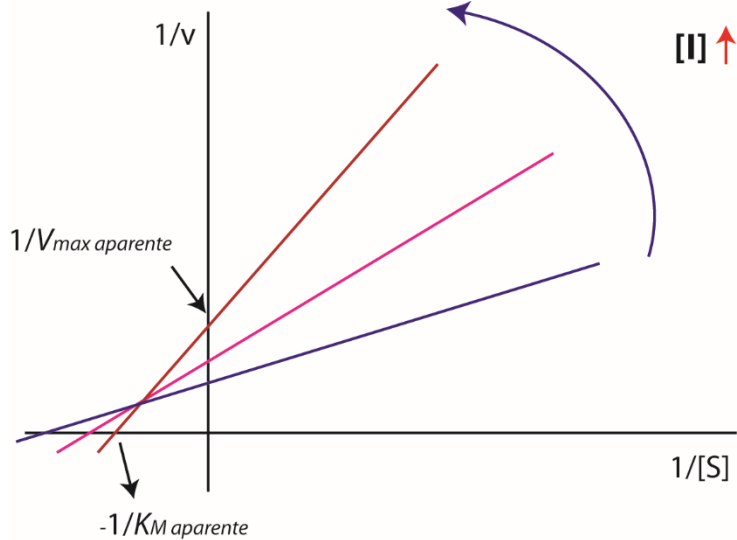
$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}{V_{max}} + \frac{1}{[S]} \times \frac{K_M}{V_{max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

↘ pendiente

# Inhibición no competitiva

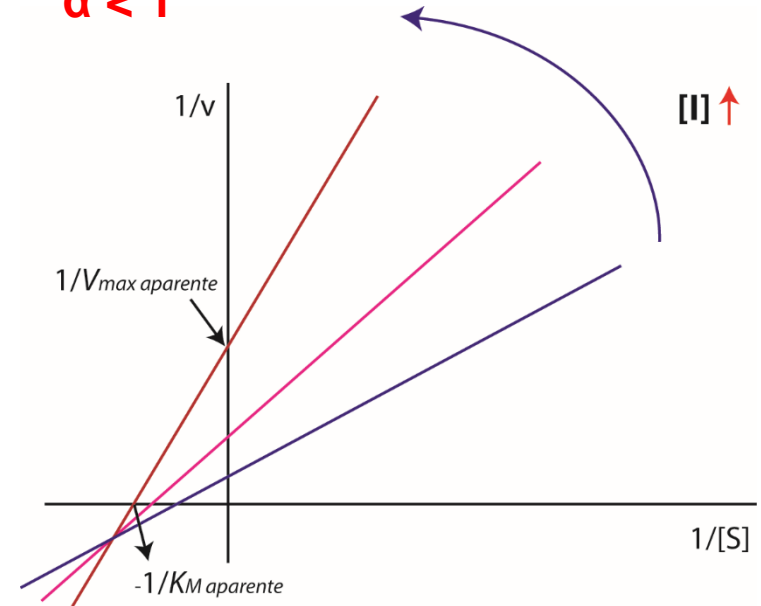
Lineweaver-Burk

$\alpha > 1$



- $V_{m\acute{a}x}$  aparente disminuye
- Para  $\alpha > 1$   $K_M$  aparente aumenta

$\alpha < 1$



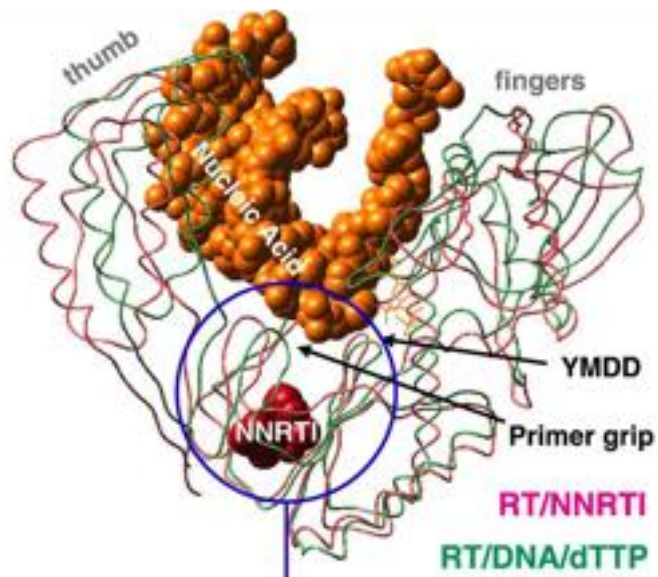
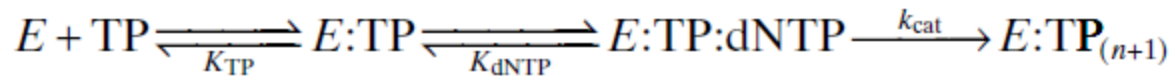
- $V_{m\acute{a}x}$  aparente disminuye
- Para  $\alpha < 1$   $K_M$  aparente disminuye

$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}{V_{max}} + \frac{1}{[S]} \times \frac{K_M}{V_{max}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

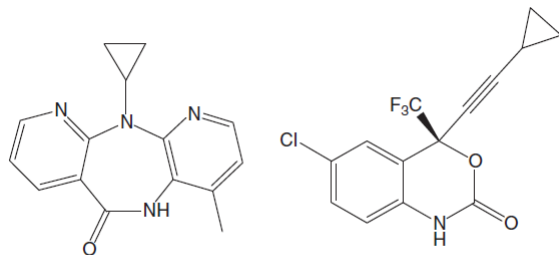
# Inhibición no competitiva

- Existen muchos menos ejemplos de aplicación en la clínica como fármacos respecto a los inhibidores competitivos → relacionado con la estrategia clásica de diseño de inhibidores basados en el mecanismo.
- ***¿Qué ventaja puede tener la inhibición no competitiva respecto a la competitiva?***
  - ***Ejemplo:*** Nevirapine y efavirenz, inhibidores no competitivos de la transcriptasa reversa de HIV (nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors NNRTIs)

# Ejemplo de inhibidor no competitivo: NNRTIs



- La enzima une dos sustratos en forma secuencial, el complejo “template-primer” (TP) y el nucleosido (dNTP).
- Los primeros inhibidores competitivos fueron análogos de nucleósidos → poca especificidad por la enzima viral
- Screening de bibliotecas** → identificación de los NNRTI → se unen a un sitio alostérico, con especificidad por la enzima viral



(A) Nevirapine

(B) Efavirenz

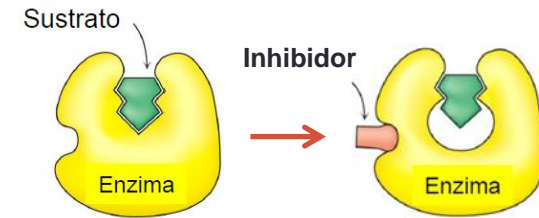
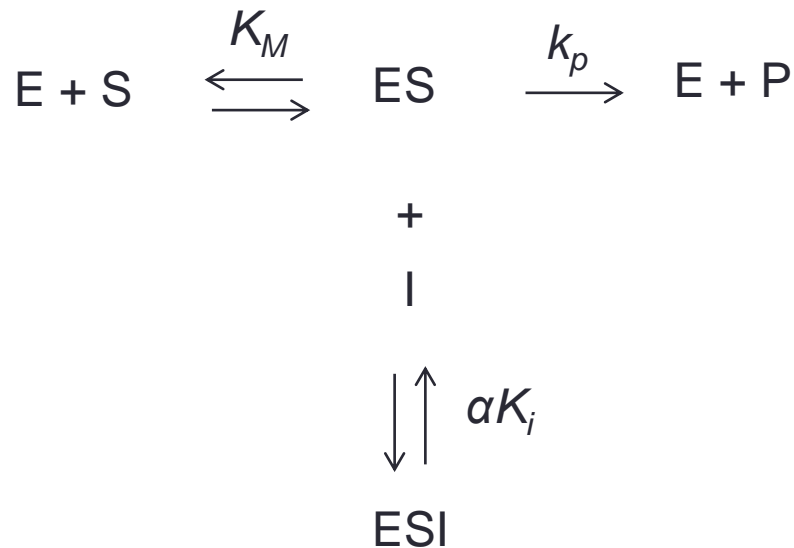
**Nevirapine:**  $K_i = 19-400$  nM, afinidad similar E:TP y E:TP:dNTP

**Efavirenz:**  $K_i E = 170$  nM;  $K_i E:TP = 30$  nM;  $K_i E:TP:dNTP = 4$  nM

# Ejemplo de inhibidor no competitivo: NNRTIs

- *¿Qué ventajas puede tener la inhibición no competitiva respecto a la competitiva?*
  - Al unirse a un sitio alostérico en vez de al sitio activo, puedo conseguir **especificidad** cuando no quiero afectar otra enzima que utiliza el mismo sustrato o mecanismo de reacción → **menor toxicidad**.
  - La inhibición no competitiva **no se puede evitar aumentando la concentración de sustrato**. Esto es una ventaja cuando las condiciones fisiológicas donde debe actuar el inhibidor implican altas concentraciones de sustrato.

# Inhibición acompetitiva

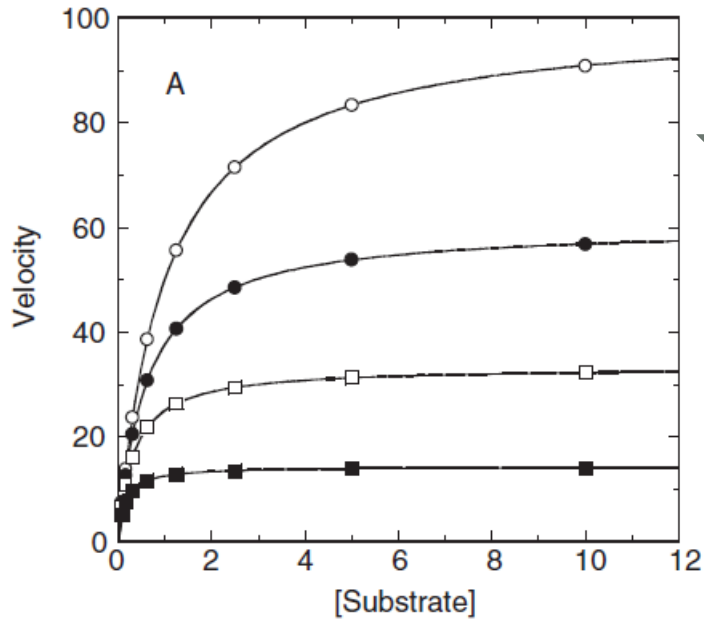


$$v = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} [S]}{[S] + \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}} \quad \downarrow \text{simplificando}$$

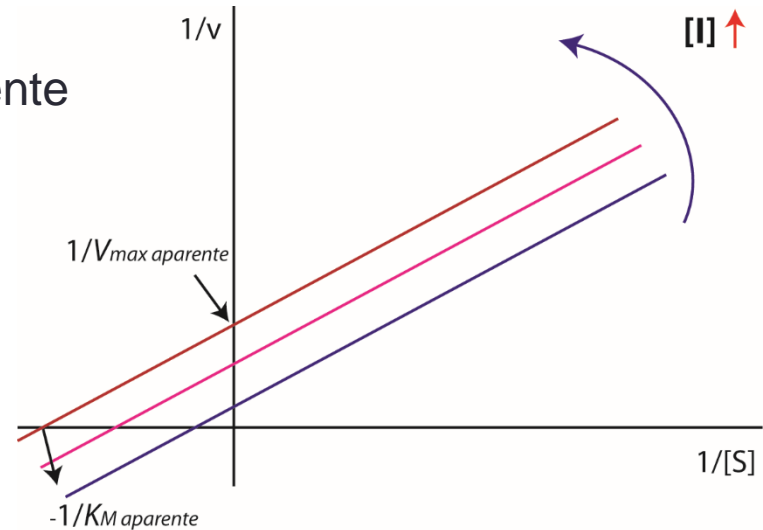
$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_M}$$

- El inhibidor tiene muy poca afinidad por la enzima libre, en cambio se une a ES **o a cualquier otra especie subsiguiente** → La unión de S aumenta la afinidad de E por I
- A su vez, aumenta la afinidad de EI por S → **Disminución en la  $K_M$  aparente**
- Disminuye la concentración de ES → **Disminuye  $V_{max}$**

# Inhibición acompetitiva



[I]  
creciente



$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}{V_{max}} + \frac{1}{[S]} \times \frac{K_M}{V_{max}}$$

- $K_M$  y  $V_{max}$  disminuyen en la misma proporción

# Inhibición acompetitiva

- Al igual que lo que sucede con los inhibidores no competitivos, su efecto no se evita aumentando la cantidad de sustrato. Al contrario, su afinidad es mayor a concentración de sustrato saturante, lo que puede ser una ventaja ante ciertas condiciones fisiológicas.
- **Ejemplo:** epristerida, inhibidor de la enzima esteroide 5-alfa-reductasa, efectos antiandrogénicos.

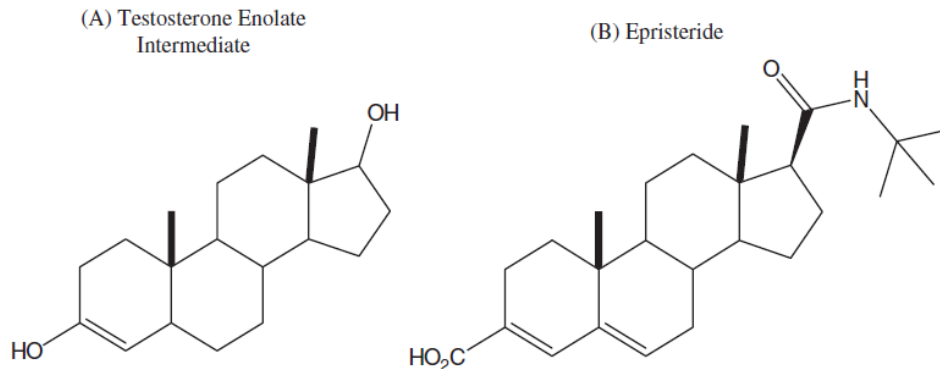
# Ejemplo de inhibidor acompetitivo: epristerida



T: testosterona

DHT: dihidrotestosterona

- Diseñado para simular el intermediario enolato de la testosterona → se esperaría que fuese inhibidor acompetitivo para NADPH y competitivo para testosterona

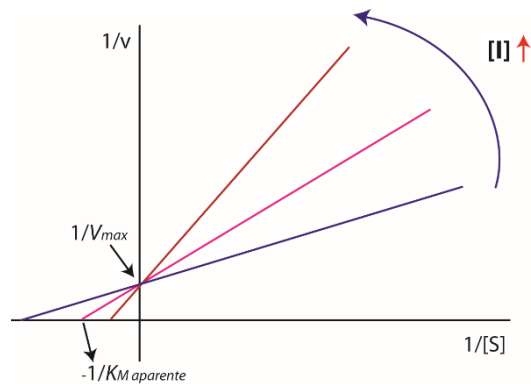


**Figure 3.16** Chemical structures of (A) the enolate intermediate of testosterone formed during the reaction of steroid 5 $\alpha$ -reductase and (B) the steroid 5 $\alpha$ -reductase inhibitor epristeride.

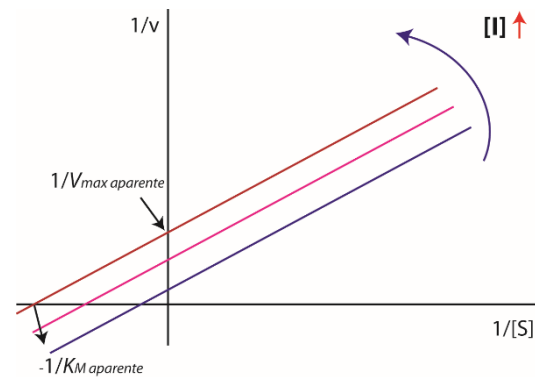
- Sin embargo, se encontró que es acompetitivo para ambos → la unión se daría al estado poblado luego de liberar el DHT, pero antes de liberar el NADP<sup>+</sup> → epristerida es un **inhibidor acompetitivo que se une a una especie subsiguiente a la formación del complejo ES.**

# Señales de diagnóstico- Dobles recíprocas

## Inhibidor competitivo

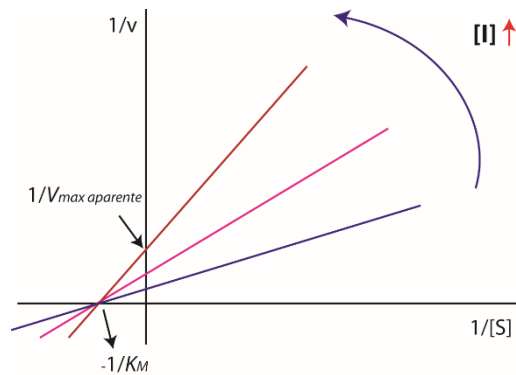


## Inhibidor acompetitivo

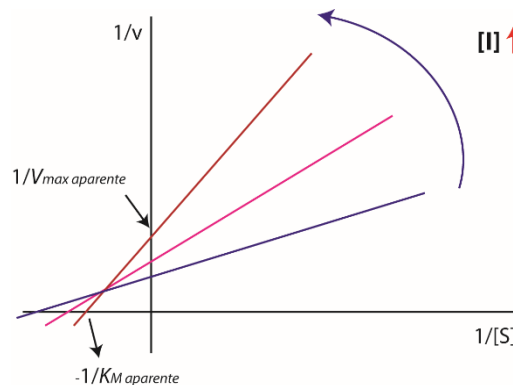


## Inhibidor no competitivo

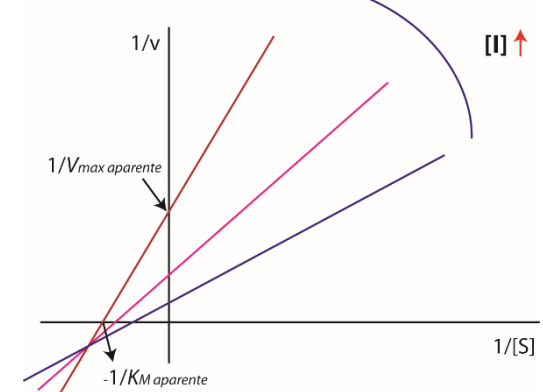
$\alpha = 1$



$\alpha > 1$



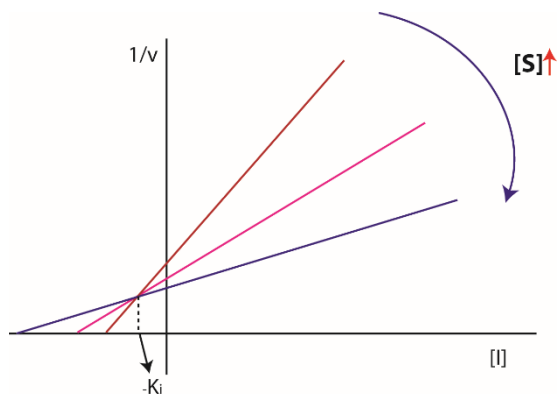
$\alpha < 1$



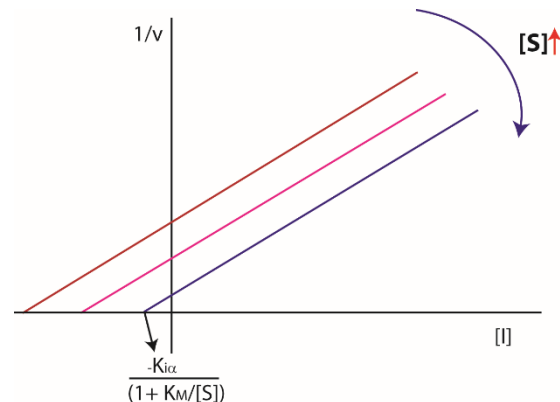
# Dixon plot

- Método gráfico para determinar  $K_i$  y tipo de inhibición.  $1/v$  vs  $[I]$

## Inhibidor competitivo

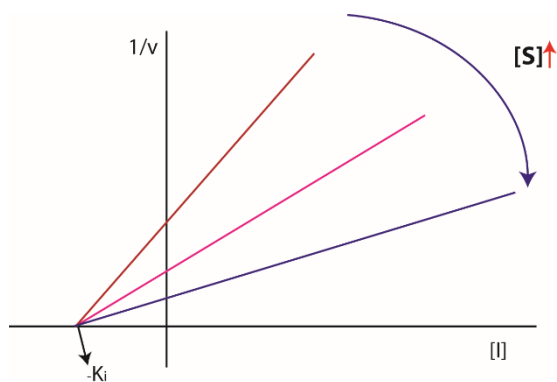


## Inhibidor acompetitivo

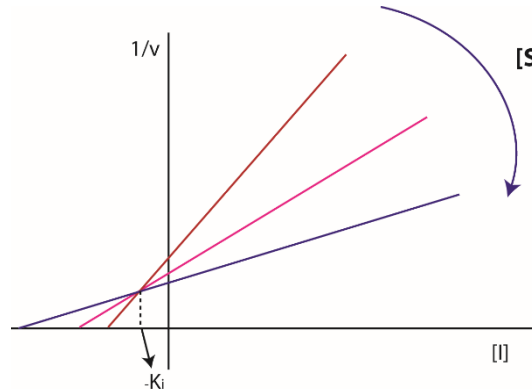


## Inhibidor no competitivo

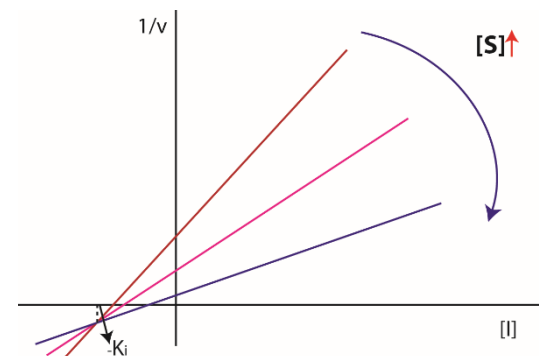
$\alpha = 1$



$\alpha > 1$



$\alpha < 1$

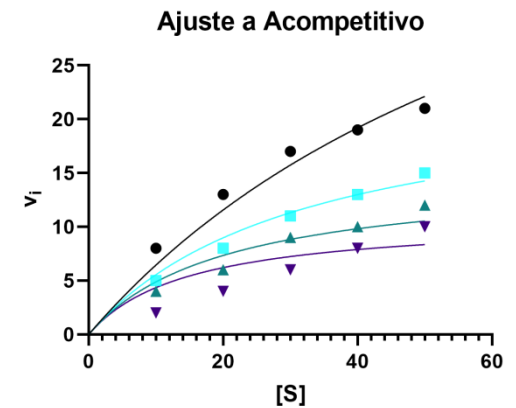
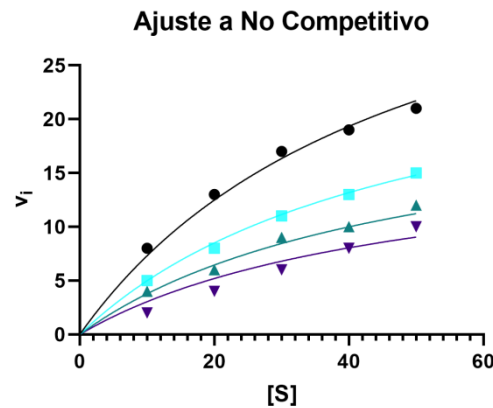
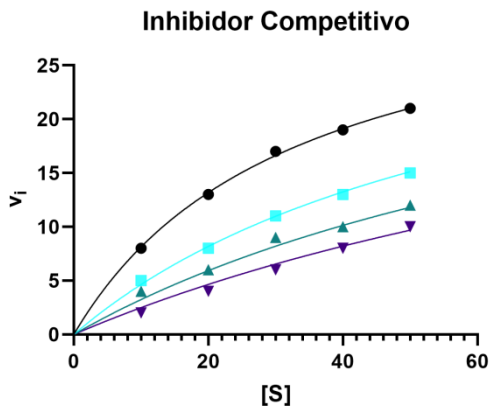


# Ajuste mediante regresión no lineal

- Actualmente existen muchas herramientas computacionales que permiten la **estimación directa de los parámetros cinéticos** mediante **regresión no lineal** → **método de mínimos cuadrados**.
- Algunos ejemplos: MatLab, SageMath (libre, basado en Python), Igor Pro, OriginLab, SigmaPlot, GraphPad Prism

# Ajuste mediante regresión no lineal

- Ejemplo GraphPad:



Nonlin fit Table of results		A	B	C	D	E
		0	10	20	30	Global (shared)
1	Comparison of Fits					Can't calculate
2	Null hypothesis					Competitive inhibition
3	Alternative hypothesis					Noncompetitive inhibition
4	P value					
5	Conclusion (alpha = 0.05)					Models have the same DF
6	Preferred model					Competitive inhibition
7	F (DFn, DFd)					
8						

# Ajuste mediante regresión no lineal

- Ejemplo GraphPad:

9	<b>Competitive inhibition</b>					
10	<b>Best-fit values</b>					
11	Km	32.83	32.83	32.83	32.83	32.83
12	I	= 0.000	= 10.00	= 20.00	= 30.00	
13	Ki	10.16	10.16	10.16	10.16	10.16
14	Vmax	34.81	34.81	34.81	34.81	34.81
15	<b>Std. Error</b>					
16	Km	3.371	3.371	3.371	3.371	3.371
17	Ki	0.6487	0.6487	0.6487	0.6487	0.6487
18	Vmax	1.762	1.762	1.762	1.762	1.762
19	<b>95% CI (profile likelihood)</b>					
20	Km	26.56 to 40.95	26.56 to 40.95	26.56 to 40.95	26.56 to 40.95	26.56 to 40.95
21	Ki	8.876 to 11.61	8.876 to 11.61	8.876 to 11.61	8.876 to 11.61	8.876 to 11.61
22	Vmax	31.49 to 39.01	31.49 to 39.01	31.49 to 39.01	31.49 to 39.01	31.49 to 39.01
23	<b>Goodness of Fit</b>					
24	Degrees of Freedom					17
25	R squared	0.9981	0.9962	0.9685	0.9727	0.9944
26	Sum of Squares	0.2059	0.2398	1.287	1.093	2.826
27	Sy.x					0.4077
28	<b>Normality of Residuals</b>					
29	<b>Shapiro-Wilk (W)</b>	0.7725	0.8769	0.8785	0.8652	0.9455
30	P value	0.0474	0.2954	0.3025	0.2474	0.3036
31	Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	Yes	Yes	Yes
32	P value summary	*	ns	ns	ns	ns

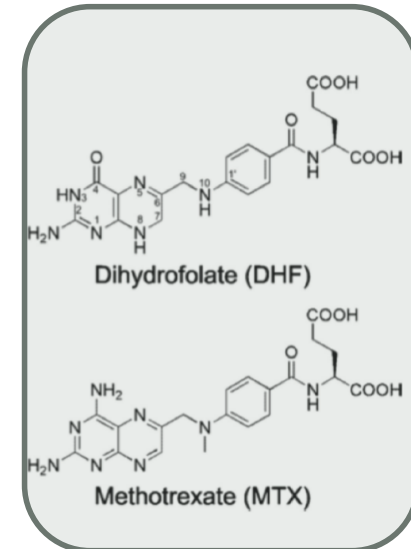
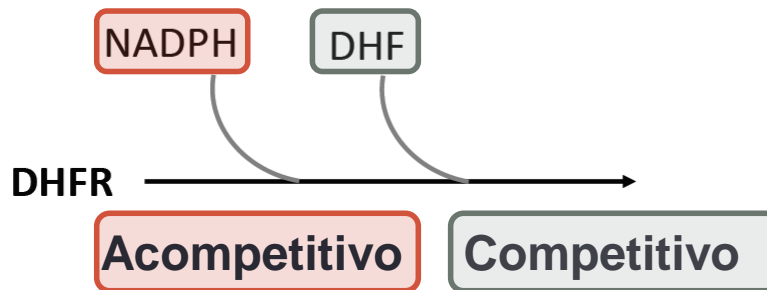
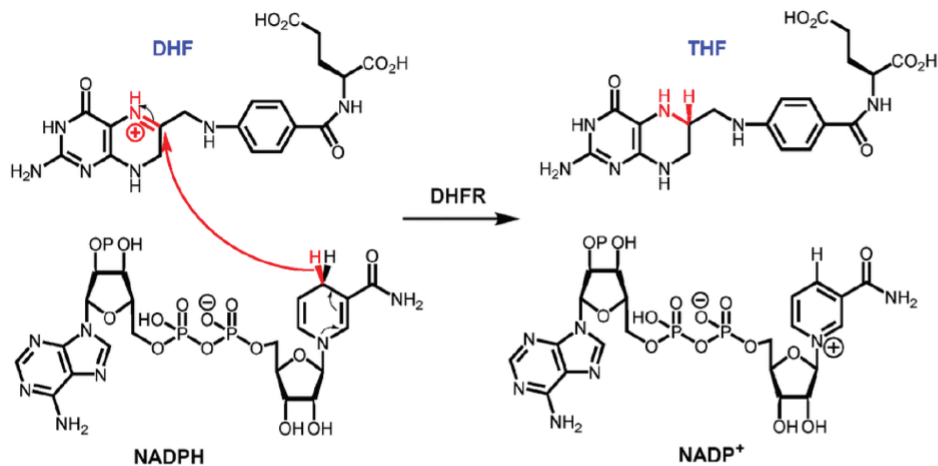
# Efecto sobre las constantes cinéticas aparentes

Parámetro APARENTE	Modalidad de inhibición				
	Competitivo	No competitivo $\alpha > 1$	No competitivo $\alpha = 1$	No competitivo $\alpha < 1$	Acompetitivo
$K_M$	Aumenta linealmente con la concentración de [I]	Aumenta en forma curvilínea con la concentración de [I]	No cambia	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]
$V_{max}$	No cambia	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]
$V_{max}/K_M$	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	Disminuye en forma curvilínea con la concentración de [I]	No cambia

# Modalidades de inhibición en reacciones de dos sustratos

- La modalidad de inhibición va a diferir respecto a los dos sustratos y va a depender del mecanismo de reacción.
- Cuando definimos el tipo de inhibición → especificar respecto a qué sustrato.
- **Ejemplo:** Metotrexato → inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR)

# Ejemplo de inhibición en reacciones de dos sustratos



- ✓ MTX es un análogo estructural del DHF
- ✓ MTX presenta afinidad por E y por E-NADPH, pero  $K_i/\alpha K_i > 6000 \rightarrow$  a los fines prácticos se lo considera incompetitivo

# Modalidades de inhibición en reacciones de dos sustratos

**TABLE 3.6 Pattern of Dead-End Inhibition Observed for Bisubstrate Reactions**

Reaction Mechanism	Competitive Inhibitor for Substrate	Inhibition Pattern Observed	
		For Varied [AX]	For Varied [B]
Compulsory ordered with $AX$ binding first	$AX$	Competitive	Noncompetitive
Compulsory ordered with $AX$ binding first	$B$	Uncompetitive	Competitive
Compulsory ordered with $B$ binding first	$AX$	Competitive	Uncompetitive
Compulsory ordered with $B$ binding first	$B$	Noncompetitive	Competitive
Random ternary complex	$AX$	Competitive	Noncompetitive
Random ternary complex	$B$	Noncompetitive	Competitive
Double displacement	$AX$	Competitive	Uncompetitive
Double displacement	$B$	Uncompetitive	Competitive

Source: Copeland (2000).

# El valor de saber la modalidad de inhibición

- Conocer la modalidad de inhibición nos permite hacer **comparaciones cuantitativas** entre:
  - Diferentes compuestos para la misma enzima
  - El mismo compuesto por distintas enzimas
- Podemos hacer estas comparaciones en base a la  $K_i$
- A partir de la  $K_i$  podemos calcular la **energía libre de Gibbs** de la unión y los **cambios asociados a cambios estructurales en el compuesto o la enzima.**

# Relación entre $K_i$ y la energía libre de Gibbs

$$\Delta G_{binding} = RT \ln(K_i) \quad K_d = \frac{1}{K_i} \quad \Delta \Delta G_{binding} = RT \ln \left( \frac{K_{iA}}{K_{iB}} \right)$$

$$\Delta G_{binding} = \Delta H_{binding} - T \Delta S_{binding}$$

$$\ln(K_i) = \left( \frac{\Delta H_{binding}}{R} \frac{1}{T} \right) - \frac{\Delta S_{binding}}{R}$$

**Ecuación de Van't Hoff** → permite determinar la contribución individual de  $\Delta H_{binding}$  y  $T \Delta S_{binding}$  al  $\Delta G_{binding}$  midiendo  $K_i$  en función de la temperatura → se puede mejorar la afinidad en base al conocimiento de la relación estructura-actividad para optimizar uno, otro o ambos componentes del  $\Delta G_{binding}$ .

# Relación entre $K_i$ y la energía libre de Gibbs

- Para mejorar la afinidad de unión de un compuesto de  $10 \mu\text{M}$  a  $1 \text{nM}$ , requiere modificaciones químicas que aumenten favorablemente la energía de unión de Gibbs en  $5,5 \text{ kcal / mol}$ .
- En el **diseño tradicional**, se ha puesto énfasis en **optimizar la interacción** con componentes claves del **sitio activo**  $\rightarrow$  **optimizar el componente entálpico**. Esto en general tiene un **costo entrópico**  $\rightarrow$  “**Compensación entalpía-entropía**”
- Alcanzar **afinidades extremas (rango pM)** requiere de la **optimización de ambos componentes a la vez**.

# Relación entre $K_i$ y la energía libre de Gibbs

- Uno de los mayores problemas que surge en el uso de inhibidores es la **aparición de mutaciones que disminuyen la afinidad de unión del inhibidor**.
- **Paradigma de “inhibición adaptativa”** (Velazquez-Campoy et al., 2003) → diseñar inhibidores que **maximicen las interacciones entálpicas favorables con grupos del sitio activo** que sean **inmutables** por su rol clave en la catálisis y luego proporcionar mayor **flexibilidad** a la estructura del inhibidor para que pueda adaptarse a cambios en el sitio activo inducido por mutaciones.

# Bibliografía

- **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists;** Robert A. Copeland, Second Edition, 2013, Wiley.
- **Enzyme Kinetics: Principles and Methods;** Hans Bisswanger, Second Edition, 2008, Wiley.