



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DE INTERACCIONES PROTEÍNA-LIGANDO PARA
LA BÚSQUEDA DE FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS, UTILIZANDO LA PTP1B COMO
BLANCO MOLECULAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
BIÓLOGA IDALBA ANDREA CORONELL TOVAR

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DE INTERACCIONES PROTEÍNA-LIGANDO PARA
LA BÚSQUEDA DE FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS, UTILIZANDO LA PTP1B COMO
BLANCO MOLECULAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
BIÓLOGA IDALBA ANDREA CORONELL TOVAR

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2023

AGRADECIMIENTOS

La ejecución del presente trabajo fue posible gracias al apoyo y colaboración de distintas personas y entidades de la UNAM. Agradezco el apoyo económico otorgado por el Conahcyt, el proyecto DGAPA-UNAM (PAPIITIN203222), y el proyecto DGTIC-UNAM (LANCAD-UNAM-DGTIC-313).

Agradezco también a la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM por permitirme desarrollar la parte experimental en sus instalaciones. A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación de la UNAM, por proveernos con los recursos computacionales necesarios para realizar los estudios *in silico* a través del sistema Miztli.

Agradezco por el apoyo técnico y académico de la Dra. María del Rocío Álvarez Medina, la Dra. María Isabel Velázquez, Dra. Eugenia Flores Robles, y Dra. Laura Liliana Álvarez Añorve.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 DIABETES Y SU ESTADO EPIDEMIOLÓGICO ACTUAL.....	14
2.2 TIPOS DE DIABETES MELLITUS	14
2.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2).....	15
2.3.1 Tratamiento de la DMT2.....	15
2.3.2 Blancos moleculares implicados en DMT2	16
2.4 PROTEÍNAS TIROSINAS FOSFATASAS (PTPs)	17
2.4.1 Clasificación de las PTPs.....	18
2.4.2 Estructura de las PTPs	19
2.4.3 Especificidad de sustrato de las PTPs.....	21
2.5 PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B (PTP1B).....	21
2.5.1 Estructura de la PTP1B.....	25
2.5.2 Función de la PTP1B	26
2.5.3 Sustratos de unión de la PTP1B.....	29
2.5.4 Importancia farmacológica de la PTP1B	30
2.5.5 PTP1B como blanco molecular antidiabético.....	33
2.5.6 Estrategias de inhibición de la PTP1B	31
2.5.7 Inhibidores de la PTP1B.....	35
2.5.8 Retos en el desarrollo de inhibidores de la PTP1B.....	37
2.6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	37
2.6.1 Actividad enzimática de la PTP1B	38
2.7 CRIBADO VIRTUAL EN EL ESTUDIO Y DESARROLLO DE FÁRMACOS	39
3. HIPÓTESIS	40
3.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	40
3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICA	40
4. OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GENERAL	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	42
5.1 SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	42
5.1.1 Construcción de los sistemas de expresión de las tres formas de hPTP1B: hPTP1B ₁₋₂₈₅ , hPTP1B ₁₋₃₂₁ y hPTP1B ₁₋₄₀₀	42
5.1.2 Expresión de las proteínas PTP1B recombinantes de humano: hPTP1B ₁₋₂₈₅ , hPTP1B ₁₋₃₂₁ y hPTP1B ₁₋₄₀₀	45
5.1.3 Ensayos de actividad enzimática.....	45
5.2 ESTUDIO IN SILICO	50
5.2.1 Cribado virtual basado en estructura.....	50
5.2.2 Modelado de la región C-terminal intrínsecamente desordenada de la PTP1B (PTP1B ₃₀₀₋₄₀₀).....	51
5.2.3 Dinámica molecular de la forma larga de la PTP1B (PTP1B ₁₋₄₀₀)	51
5.2.4 Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)	52

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1 SECCIÓN EXPERIMENTAL	54
6.1.1 <i>Amplificación por PCR de las construcciones que codifican para las tres formas de la hPTP1B</i>	54
6.1.2 <i>Expresión y purificación de las proteínas recombinantes</i>	55
6.1.3 <i>Actividad enzimática</i>	55
6.1.4 <i>Evaluación cualitativa de la actividad inhibitoria de los compuestos derivados del ácido glicirretínico</i>	57
6.1.5 <i>Determinación de IC₅₀</i>	59
6.1.6 <i>Cinética enzimática</i>	63
6.1.7 <i>Ensayos preliminares de competencia enzimática</i>	68
6.1.8 <i>Efecto de la variabilidad estructural de los derivados del AG sobre la inhibición enzimática de la hPTP1B₁₋₄₀₀</i>	69
6.2 ESTUDIO IN SILICO	71
6.2.1 <i>Cribado virtual basado en estructura</i>	71
6.2.2 <i>Modelado de la región C-terminal (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀)</i>	73
6.2.3 <i>Acoplamiento molecular</i>	75
6.2.3 <i>Acoplamiento molecular</i>	74
7. APORTES CIENTÍFICOS	81
8. CONCLUSIONES	82
9. BIBLIOGRAFÍA	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Principales avances en la historia de investigación de la PTP1B.....	24
Cuadro 2.	Función de la PTP1B en diversas condiciones patológicas.....	30
Cuadro 3.	Estrategias de inhibición, inhibidores de la PTP1B y su estado de avance.....	35
Cuadro 4.	Oligonucleótidos de amplificación para los tres sistemas de expresión del gen <i>PTPN1</i>	42
Cuadro 5.	Componentes de la reacción de PCR para la obtención de las tres secuencias de expresión del gen <i>PTPN1</i>	43
Cuadro 6.	Condiciones de PCR para obtener las tres secuencias del gen <i>PTPN1</i>	43
Cuadro 7.	Concentración y pureza del DNA de las construcciones del sistema de expresión pET-28a- <i>PTPN1</i>	44
Cuadro 8.	Nombre y número asignado a los compuestos derivados del AG ₁₋₁₇	47
Cuadro 9.	Ic ₅₀ de distintos inhibidores y las tres construcciones de <i>hPTP1B</i>	60
Cuadro 10.	Ic ₅₀ de los derivados de ácido glicirretínico (AG ₁₋₁₇) en la actividad de <i>hPTP1B</i> ₁₋₄₀₀	63
Cuadro 11.	Parámetros cinéticos de los compuestos evaluados con <i>hPTP1B</i> ₁₋₄₀₀ y <i>hPTP1B</i> ₁₋₂₈₅	66
Cuadro 12.	Energía de unión de diferentes complejos enzima-ligando analizados por acoplamiento molecular ...	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema de clasificación general de las PTPs que sugiere un “PTPoma extendido”	18
Figura 2.	Clasificación de las PTPs clásicas	19
Figura 3.	Elementos de estructura secundaria del dominio catalítico de las PTPs clásicas	20
Figura 4.	Dominios estructurales de la PTP1B	22
Figura 5.	Isoformas de la PTP1B	23
Figura 6.	Estructura 3D y aminoácidos implicados en la unión al ligando y catálisis de la PTP1B	26
Figura 7.	Función reguladora de la PTP1B de las vías de señalización de insulina y leptina	29
Figura 8.	Sitios estructurales de inhibición de la PTP1B	33
Figura 9.	Estructura química y fuente de obtención de algunos inhibidores de la PTP1B	36
Figura 10.	Reacción de hidrólisis del pNPP catalizada por la PTP1B	38
Figura 11.	Alineamiento entre la secuencia completa (<i>PTPN1</i> ₁₋₄₀₀) y una de las tres construcciones del gen <i>PTPN1</i> (<i>PTPN1</i> ₁₋₂₈₅)	44
Figura 12.	Esquema del diseño experimental de los ensayos <i>in vitro</i>	49
Figura 13.	Proceso del cribado virtual basado en estructura y acoplamiento molecular.	50
Figura 14.	Procedimiento <i>in silico</i> realizado a partir del modelamiento de la región C-PTP1B	53
Figura 15.	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR	54
Figura 16.	Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas <i>hPTP1B</i> recombinantes.....	55
Figura 17.	Compuestos evaluados en ensayos de inhibición enzimática	56
Figura 18.	Efecto inhibitorio de los compuestos derivados del ácido glicirretínico sobre el porcentaje de actividad de <i>hPTP1B</i> ₁₋₂₈₅ , <i>hPTP1B</i> ₁₋₃₂₁ y <i>hPTP1B</i> ₁₋₄₀₀	58
Figura 19.	Efecto inhibitorio de los compuestos derivados del ácido glicirretínico sobre el porcentaje de actividad de <i>hPTP1B</i> ₁₋₂₈₅ y <i>hPTP1B</i> ₁₋₄₀₀	59
Figura 20.	Efecto inhibitorio del AC, AU y SUR sobre las tres construcciones de la <i>hPTP1B</i>	60
Figura 21.	Curvas de IC ₅₀ de los compuestos evaluados	61
Figura 22.	Gráficas de Lineweaver-Burk.....	64
Figura 23.	Gráficos de competencia enzimática de PTP1B ₁₋₄₀₀ y distintos inhibidores.....	68
Figura 24.	Cribado virtual dirigido al sitio alostérico de la PTP1B ₁₋₃₀₀	71
Figura 25.	Estructura química de los compuestos con mayor afinidad de unión al sitio alostérico de la PTP1B ₁₋₃₀₀ según el cribado virtual	72
Figura 26.	Curva de inhibición enzimática del ursadiol	73
Figura 27.	Pasos de la simulación de dinámica molecular del modelo estructural de la PTP1B ₁₋₄₀₀ generado por AlphaFold.....	74
Figura 28.	Réplicas de la simulación de dinámica molecular del modelo estructural de la PTP1B ₁₋₄₀₀	74
Figura 29.	Modelo estructural de la PTP1B ₁₋₄₀₀ generado por AlphaFold, antes y después de la simulación de dinámica molecular	75
Figura 30.	Acoplamiento molecular de la PTP1B ₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados <i>in vitro</i>	76

ABREVIATURAS

3D	3 dimensiones
AC	Ácido clorogénico
ADA	Asociación americana de diabetes
AG	Ácido glicirretínico
Akt	Proteína cinasa de Ser/Thr codificada por el oncogen retroviral transformante aislado de una línea celular de timoma AKT-8, derivada de la cepa k del ratón del stock A. Conocida también como proteína cinasa B (PKB)
ALR	Aldosa reductasa
AMBER	Construcción de modelos asistida con refinamiento energético (<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>)
ASOs	Oligonucleótidos anti-sentido
AU	Ácido ursólico
C-PTP1B₃₀₁₋₄₀₀	Dominio C-terminal de la PTP1B (región intrínsecamente desestructurada)
DM	Diabetes mellitus
DMT1/DT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2/DT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidasa-4
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ENT	Enfermedades no transmisibles
Erk	Cinasa reguladas por señales extracelulares
FFAR1	Receptor de ácidos grasos libres-1
FID	Federación Internacional de la Diabetes
GCGr	Receptor de glucagón
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido tipo glucagón 1
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GP	Glucógeno fosforilasa
GPc	Glucógeno fosforilasa cerebral
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPh	Glucógeno fosforilasa hepática
GPm	Glucógeno fosforilasa muscular
GSVs	Vesículas de almacenamiento de GLUT4
hPTP1B	Proteína fosfatasa 1B de humano
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina 1
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
IR	Receptor de insulina
IRK	Dominio tirosina cinasa del receptor de insulina (IR)
iRNA	RNA de interferencia
IRS-1/2	Sustrato del receptor de insulina 1 o 2
JAK2	Janus cinasa 2
kDa	Kilodaton
LepRb	Isoforma larga del receptor de leptina

nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NMR	Resonancia magnética nuclear
N-PTP1B₁₋₃₀₀	Dominio catalítico N-terminal de la PTP1B (dominio PTP)
NRPTPs	PTPs no transmembranales o intracelulares
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGFR	Receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein data bank</i>)
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas
pH	Potencial de Hidrógeno
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosphato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-bisfosphato
pNP	p-nitrofenolato
pNPP	p-nitrofenil fosfato
PPARs	Receptores activados por el proliferador del peroxisoma nuclear
PPARγ	Receptor γ activado por el proliferador del peroxisoma nuclear
PPPs	Fosfoproteínas fosfatasas
PTEN	Proteína homóloga de fosfatasa y tensina
PTKs	Proteínas tirosina cinasas
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
PTP-2	Proteína tirosina fosfatasa -2
PTP's	Proteínas tirosina fosfatasas
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTPN1	Proteína tirosina fosfatasa del tipo no receptor
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media (<i>Root-mean-square deviation</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RPTPs	PTPs transmembranales tipo receptor
RPTP-LAR	RPTP relacionada con el antígeno común de leucocitos
RTKs	Receptores tirosina cinasa
SDM	Simulación de dinámica molecular
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SGLT2	Cotransportador 2 sodio-glucosa
SH2	Dominio de Homología 2 de la oncoproteína Src
Src	Sarcoma
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
SUR	Suramina
TCPTP	Proteína tirosina fosfatasa de células T
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica multifactorial generada por un desorden metabólico, cuyas consecuencias derivan de la hiperglicemia, la cual resulta generalmente por una disfunción en la producción o utilización eficaz de insulina. Dentro de los tipos de diabetes descritos, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2 o DT2) es el tipo para el cual se registra el mayor número de casos diagnosticados a nivel mundial (entre 90 – 95 %), haciéndose más frecuente en adultos jóvenes, adolescentes e incluso niños.

Aunque existen opciones farmacológicas disponibles para el tratamiento de la DMT2 dirigidas a distintos blancos moleculares, como la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), receptor de ácidos grasos libres-1 (FFAR1), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), α -Glucosidasa, entre otros; algunos de ellos producen efectos secundarios no deseados que pueden resultar en alteraciones metabólicas perjudiciales, como la hipoglicemia y aumento de peso. Adicionalmente, tampoco existe una alternativa terapéutica que minimice las complicaciones crónicas secundarias que comprometen la calidad y expectativa de vida de los pacientes.

Uno de los blancos farmacológicos ampliamente validados para la intervención terapéutica de la DMT2 es la enzima proteína tirosina fosfatasa (PTP1B). La función de esta enzima como regulador negativo de la vía de señalamiento de insulina y leptina la convierte en un componente fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, control de apetito, y regulador metabólico en general. A nivel estructural, la PTP1B está constituida por 435 residuos de aminoácidos (~50 kDa) distribuidos en tres dominios: un dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀), una región reguladora (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) intrínsecamente desordenada, y un dominio C-terminal (PTP1B₄₀₁₋₄₃₅) de localización celular (retículo endoplasmático o mitocondria).

El diseño de un inhibidor clínicamente aceptable de la PTP1B supone ciertos retos. No obstante, se han identificado principalmente cuatro estrategias de inhibición de la enzima: competitiva, no competitiva, bidentada, y silenciamiento genético. Exceptuando el silenciamiento genético, todas estas estrategias implican la interacción del ligando con sitios específicos del dominio catalítico (N-PTP1B₁₋₃₀₀) y de la región reguladora (C-PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) de la PTP1B. Sin embargo, la forma de la enzima empleada en la mayoría de estudios enzimáticos y computacionales, comprende únicamente el dominio catalítico (PTP1B₁₋₃₀₀).

Para obtener mayor información sobre los mecanismos de inhibición de la PTP1B y la influencia de las regiones estructurales de la enzima sobre su actividad; la estrategia metodológica propuesta en este trabajo incluye ensayos *in vitro* y análisis *in silico*. Ambos realizados con el dominio catalítico y la región reguladora de la enzima. Los ensayos *in vitro* incluyen la construcción y purificación de tres sistemas de expresión de la PTP1B: PTP1B₁₋₂₈₅, PTP1B₁₋₃₂₁ y PTP1B₁₋₄₀₀; ensayos de actividad (con PTP1B₁₋₂₈₅ y PTP1B₁₋₃₂₁) y cinética enzimática (con PTP1B₁₋₄₀₀) con 17 compuestos derivados del ácido glicirretínico (AG) (ensayados por primera vez), y compuestos con efecto inhibitorio conocido (AC, AU y SUR) sobre la PTP1B. El análisis *in silico* comprende el modelamiento de la PTP1B₁₋₄₀₀, cribado virtual basado en estructura, y acoplamiento molecular. De las tres formas de la enzima evaluadas en el ensayo de actividad, la PTP1B₁₋₄₀₀ fue la única forma inhibida por los derivados del AG, cuyo mecanismo de inhibición fue de tipo acompetitivo. Los valores de IC₅₀ del AU y SUR indican que la inhibición es entre tres y cuatro veces mayor con la PTP1B₁₋₄₀₀ que con la PTP1B₁₋₂₈₅ o PTP1B₁₋₃₂₁. La diferencia de actividad observada entre las tres formas de la PTP1B sugiere que la presencia de la región reguladora de la enzima puede ser determinante para su inhibición.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a multifactorial chronic disease generated by a metabolic disorder whose consequences derive from hyperglycemia, generally resulting from a dysfunction in insulin production or effective use. Within the types of diabetes described, type 2 diabetes mellitus (T2DM or T2D) is the type for which the highest number of diagnosed cases is recorded worldwide (between 90 - 95%), becoming more common in young adults, adolescents, and even children.

Although there are pharmacological options available for the treatment of T2DM that target different molecular targets, such as dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), free fatty acid receptor-1 (FFAR1), G protein-coupled receptors (GPCRs), α -Glucosidase, among others; Some of them produce unwanted side effects that can result in harmful metabolic alterations, such as hypoglycemia and weight gain. Additionally, no therapeutic alternative minimizes secondary chronic complications that compromise patients' quality and life expectancy.

One widely validated pharmacological target for therapeutic intervention in T2DM is the enzyme protein tyrosine phosphatase (PTP1B). The function of this enzyme as a negative regulator of the insulin and leptin signaling pathway makes it a fundamental component for maintaining glucose homeostasis, appetite control, and metabolic regulator in general. At a structural level, PTP1B is made up of 435 amino acid residues (~50 kDa) distributed in three domains: an N-terminal catalytic domain (PTP1B₁₋₃₀₀), an intrinsically disordered regulatory region (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀), and a C-terminal domain (PTP1B₄₀₁₋₄₃₅) of cellular localization (endoplasmic reticulum or mitochondria).

Designing a clinically acceptable PTP1B inhibitor remains a challenge. However, four main enzyme inhibition strategies have been identified: competitive, non-competitive, bidentate, and genetic silencing. Except for genetic silencing, all these strategies involve the interaction of the ligand with specific sites of the catalytic domain (N-PTP1B₁₋₃₀₀) and the regulatory region (C-PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) of PTP1B. Nonetheless, the enzyme form used in most enzymatic and computational studies comprises only the catalytic domain (PTP1B₁₋₃₀₀).

To gain more insight into the mechanisms of PTP1B inhibition and the influence of the structural regions of the enzyme on its activity, the methodological strategy proposed in this work includes *in vitro* assays and *in silico* analysis. Both are made with the catalytic domain and the regulatory region of the enzyme. *In vitro* assays include the construction and purification of three PTP1B expression systems: PTP1B₁₋₂₈₅, PTP1B₁₋₃₂₁, and PTP1B₁₋₄₀₀; activity assays (with PTP1B₁₋₂₈₅ and PTP1B₁₋₃₂₁) and enzyme kinetics (with PTP1B₁₋₄₀₀) with 17 compounds-glycyrrhethinic acid (GA) derivatives (tested for the first time), and compounds with known inhibitory effect (chlorogenic acid (CA), ursolic acid (UA), and suramin (SUR)) on PTP1B. *In silico* analysis includes PTP1B₁₋₄₀₀ modeling, structure-based virtual screening, and molecular docking. Of the three forms of the enzyme evaluated in the activity assay, PTP1B₁₋₄₀₀ was the only form inhibited by GA derivatives, whose inhibition mechanism was uncompetitive. The IC₅₀ values of UA and SUR indicate that inhibition is three to four times greater with PTP1B₁₋₄₀₀ than with PTP1B₁₋₂₈₅ or PTP1B₁₋₃₂₁. The difference in activity observed between the three forms of PTP1B suggests that the regulatory region of the enzyme may be decisive for its inhibition.

1. INTRODUCCIÓN

En el marco epidemiológico actual, la diabetes mellitus (DM) o diabetes es un problema de salud pública y una de las cuatro principales enfermedades no transmisibles (ENT)¹ que afecta a la población mundial y requiere intervención prioritaria [1–4]. Con base en el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (abril de 2023), la diabetes afecta a la población mundial, mayoritariamente las zonas rurales de los países de bajo y mediano ingreso. Es una causa importante de ceguera, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio y amputación de miembros inferiores [5]. La prevalencia ajustada por edad en adultos indica que es una enfermedad en constante aumento; de 4.7 % en 1980 ascendió a 8.5 % en 2014 [4]. De no haber una debida intervención, se estima que para el año 2045 la población afectada con diabetes será de al menos 700 millones de personas, lo cual representa un 51 % de incremento respecto a la incidencia global actual [6]. De igual forma, es importante tener en cuenta que sumado al costo económico que representa para el sistema de salud de cada país, la diabetes es un problema que más allá de ser individual, afecta también a las familias y a la sociedad [4].

Con base en la clasificación actualizada de la DM publicada por la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) en 2021, existen principalmente cuatro tipos de diabetes [7]. Entre ellos, los más comunes son la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1/DT1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2/DT2). La DMT2 representa el tipo de diabetes para el cual se registra entre el 90 % y 95 % de los casos de diabetes a nivel mundial, y a pesar de ser más frecuente en adultos, el número de adolescentes e incluso niños afectados aumenta cada vez más. La DMT2 es un serio problema de salud pública que avanza de manera creciente, y se asocia principalmente con cambios económicos, culturales y sociales; cambios en la dieta, poca actividad física y obesidad [5,7]. Esta última es su principal comorbilidad, y puede agravar o incluso causar la resistencia a la insulina; además de afectar la calidad de vida e incrementar la complejidad del problema [4].

Actualmente, las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de la DMT2 consisten en estimular la producción de insulina y potenciar su acción, así como disminuir la adiposidad, lipotoxicidad y producción excesiva de glucosa hepática [8,9]. Sin embargo, su eficacia es inestable en el tiempo, puesto que producen efectos secundarios no deseados como aumento de peso e hipoglicemia [8]. Tampoco existe un tratamiento que minimice las complicaciones crónicas secundarias a largo plazo de la enfermedad (alteraciones en la micro y macrovasculatura), lo cual compromete la calidad y expectativa de vida de los pacientes [8,10].

¹ Las ENT son la principal causa de enfermedad y muerte prematura evitable en el continente americano. Las cuatro ENT que representan la mayor carga de enfermedad son: enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes. Los factores de riesgo comunes de las ENT son: consumo de tabaco y alcohol, inactividad física, dieta poco saludable, y factores biológicos asociados (hipertensión e hiperglicemia) [2,4,246].

Debido a la naturaleza multifactorial de la DMT2 y la variedad de blancos moleculares de las rutas metabólicas asociadas con su etiopatología, no existe un objetivo farmacológico específico que sugiera un tratamiento definitivo para esta enfermedad. No obstante, se han identificado diversos blancos farmacológicos actuales y potenciales para su tratamiento, entre los que se encuentran la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), receptor de ácidos grasos libres-1 (FFAR1), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), α -Glucosidasa, aldosa reductasa (ALR), glucógeno fosforilasa (GP), proteína tirosina fosfatasa (PTP1B), entre otros [8].

La PTP1B es un blanco molecular ampliamente validado para el tratamiento de la DMT2 y la obesidad (comorbilidad asociada) [11–14], principalmente por tres razones: (1) los cambios fisiológicos generados por la inactivación global y neuronal de la función catalítica de la enzima evidencian disminución de los principales síntomas de la enfermedad. Esto es; disminución del índice glicémico y adiposidad, resistencia a ganar peso, sensibilidad a la insulina y leptina [15–21]; (2) la inhibición de la PTP1B puede ayudar a prevenir las complicaciones secundarias a largo plazo derivadas de la diabetes, como desórdenes cardiovasculares, retinopatía, nefropatía, neuropatía [8,10,17,22]; (3), la PTP1B puede ser la mejor opción para favorecer la sensibilidad a la insulina sin generar aumento de peso, tal como se ha observado con los agonistas del receptor γ activado por el proliferador del peroxisoma nuclear (PPAR γ) [21].

Debido a su función biológica e importancia farmacológica, la búsqueda de inhibidores selectivos y eficaces de la PTP1B ha sido objeto de investigación a nivel mundial de múltiples laboratorios y grupos de investigación académicos, incluyendo compañías farmacéuticas como Aventis, Takeda, Wyeth, Abott, Novo Nordisk, Albert Einstein College of Medicine, entre otros. Sin embargo, el descubrimiento y desarrollo de los compuestos más cercanos a convertirse en fármacos inhibidores de la PTP1B, ha sido suspendido en las fases clínicas I y II debido a la eficacia terapéutica limitada y efectos colaterales adversos asociados con la biodisponibilidad y dosis de estos compuestos [11,12,21,23–26].

Aunque el desarrollo y descubrimiento de un fármaco inhibidor de la PTP1B supone varios retos, la evidencia experimental *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, ha permitido identificar cuatro estrategias de inhibición de la PTP1B con base en el mecanismo de acción y el sitio de unión al ligando. Estas estrategias son: (1) inhibición competitiva u ortostérica, que implica la unión del ligando con el sitio activo de la enzima [27–35]; (2) inhibición no competitiva o alostérica, que implica la unión del ligando con el sitio alostérico [28,36–39]; (3) inhibición bidentada, que implica la unión del ligando con el sitio activo y sitios adyacentes a él [20,28,40–43]; y (4) silenciamiento genético, a través de la utilización de oligonucleótidos anti-sentido (ASOs) [26,44–47] y iRNA [26,48].

La inhibición competitiva, no competitiva y bidentada involucran la interacción del ligando con sitios específicos del dominio catalítico de la PTP1B (N-PTP1B₁₋₃₀₀) y ciertos aminoácidos con elementos de estructura secundaria presentes en la región reguladora (C-PTP1B₃₀₁₋₄₀₀). La evidencia experimental indica que esta última región influye en la actividad de la enzima [12,49,50]. Sin embargo, debido a la naturaleza intrínsecamente desestructurada de la región reguladora, los estudios de cristalografía de rayos X, y la mayoría de ensayos enzimáticos, estudios estructurales y computacionales de inhibición de la PTP1B, se han llevado a cabo con el dominio catalítico de la enzima [36]. De ahí que, para profundizar y ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de inhibición de la PTP1B, es crucial evaluar la influencia de la región reguladora sobre su actividad enzimática. Esta región reguladora contiene aminoácidos que constituyen sitios específicos de unión al ligando que pueden conferir especificidad de sustrato [12] y ser determinantes para la inactivación de la PTP1B [50].

Con el objetivo de obtener información detallada sobre los mecanismos de inhibición de la PTP1B y la influencia de las regiones estructurales de la enzima sobre su actividad; la estrategia metodológica propuesta en este estudio comprende ensayos *in vitro* y predicciones *in silico* para evaluar la actividad e interacción proteína-ligando de la PTP1B en presencia de compuestos con potencial efecto inhibitor. Inicialmente, el análisis se hizo a partir de la comparación de la actividad enzimática de tres formas o construcciones de la PTP1B: dos que comprenden el dominio catalítico (PTP1B₁₋₂₈₅ y PTP1B₁₋₃₂₁) y una que incluye la región reguladora de la enzima (PTP1B₁₋₄₀₀). Finalmente, los análisis de cinética enzimática se realizaron con la forma de la proteína que comprende su región reguladora (PTP1B₁₋₄₀₀).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Diabetes mellitus y su estado epidemiológico actual*

La diabetes mellitus, conocida también como diabetes, es una enfermedad crónica multifactorial generada por un desorden metabólico, cuyas consecuencias derivan de un aumento crónico del nivel de glucosa en la sangre, conocido como hiperglicemia. Esta resulta generalmente por una disfunción en la secreción y/o utilización eficaz de insulina producida por el páncreas, aunque también puede originarse por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas [4]. Los efectos a largo plazo de la diabetes incluyen perturbaciones del sistema micro y macrovascular, lo cual afecta la función normal de distintos órganos y tejidos como la retina (retinopatía), riñón (nefropatía), nervios periféricos (neuropatía), y el sistema cardiovascular [2,4,8,10]. Adicionalmente, la diabetes está asociada con un incremento del riesgo de accidente cerebrovascular, enfermedad del hígado graso no alcohólico, disfunción eréctil, tuberculosis (entre otras enfermedades infecciosas) [4], ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, y amputación de miembros inferiores [5].

En México, la diabetes representa un serio problema de salud pública, siendo el mayor reto que enfrenta el sistema de salud a nivel nacional. De acuerdo con el índice de competitividad internacional del periodo 2018 – 2024, la diabetes, al igual que las demás ENT, es una de las enfermedades con mayor prevalencia en los mexicanos [51,52]. Junto con la hipertensión y obesidad, la diabetes es una de las enfermedades crónicas con mayor impacto en el país, siendo la tercera causa de muerte y discapacidad en el país [53], y una de las 10 principales causas de defunción en el mundo [54]. Esto, además del deterioro de la calidad de vida de la población, supone una demanda económica importante para las instituciones públicas de atención en salud (2.25 % del producto interno bruto anual) [55]. Con base en los resultados de la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT), el número de personas con diabetes en México fue de 8.6 millones en 2018 [51]. Según el reporte del Atlas de la diabetes de la Federación Internacional de la Diabetes (FID), en 2019 y 2021, ese número ascendió a 12.8 [6] y 14.12 millones de personas, respectivamente. Para 2030 y 2045 se estima que ese número se eleve aproximadamente a 17 y 21 millones, respectivamente [56].

2.2 *Tipos de diabetes mellitus*

El conocimiento de los tipos de diabetes es importante para una intervención terapéutica adecuada y oportuna [7]. Se han identificado varios tipos de DM. La última clasificación de la OMS en 2019 [4] define seis tipos². La clasificación actualizada de la ADA de 2021 reagrupa los tipos de DM descritos por la OMS en cuatro categorías: (1) diabetes mellitus tipo 1 (DMT1/DT1), causada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, resultando en insuficiencia total de insulina; (2) diabetes mellitus tipo 2 (DMT2/DT2), generada por disminución progresiva de la producción de insulina, acompañada de resistencia a la misma; (3) tipos de diabetes mellitus

² En la actualización más reciente de la clasificación de la diabetes publicada en 2019, la OMS reconoce seis tipos principales: Diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, formas híbridas de diabetes (e.g., DMT2 propensa a cetosis), otros tipos específicos de diabetes (e.g., Diabetes monogénica, desordenes endocrinos, entre otros subtipos), diabetes no clasificada, e hiperglicemia durante el embarazo [4].

causados por diversas causas, como el síndrome de diabetes monogénica (por ejemplo, diabetes neonatal), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística y pancreatitis), y la diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas, como glucocorticoides; (4) diabetes gestacional, diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo. En general, las formas clínicas más comunes de la diabetes o diabetes mellitus son la DMT1 y la DMT2 [7,22].

2.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

Inicialmente conocida como “diabetes no insulino dependiente” o “diabetes del adulto”, la diabetes mellitus tipo 2, denominada también diabetes tipo 2 (DT2), es el tipo de diabetes para el cual se registra entre el 90-95 % de los casos diagnosticados de diabetes en el mundo. Aunque la etiopatogenia de la DMT2 es multifactorial, se asocia principalmente con componentes hereditarios (predisposición genética o epigenética), diferentes grados de disfunción de las células β del páncreas, deficiencia de producción de insulina –incluso durante el embarazo (diabetes gestacional)- y resistencia periférica a la misma. Esta última condición, conocida como resistencia a la insulina, está relacionada a su vez con inflamación, estrés metabólico, y obesidad [7]. Generalmente, la obesidad es la comorbilidad que acompaña a la DMT2, lo cual incrementa la complejidad de la condición metabólica y afecta la calidad de vida. La aparición de la DMT2 se puede evitar y sus consecuencias se pueden retrasar a través de la actividad física regular, dieta balanceada, mantener un peso corporal normal, y evitar el consumo de tabaco [4]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que ciertos factores económicos, culturales (grupos étnicos), sociales, y demográficos; pueden intervenir en la prevención, desarrollo, evolución, y tratamiento de la enfermedad [2,4].

La DMT2, considerada como una “enfermedad de la civilización” [57], es un serio problema de salud pública que avanza de manera creciente y constante en el tiempo, por lo que requiere atención prioritaria a nivel global. A pesar de ser una condición más frecuente en adultos, el riesgo, número de personas, y prevalencia de la enfermedad en adultos jóvenes, adolescentes, e incluso niños, se encuentra en continuo aumento [2–4,7]. Asimismo, la distribución de la enfermedad se hace cada vez más extensa [6]. Según las estimaciones globales de la FID, 374 millones de personas tienen mayor riesgo de desarrollar DMT2 [6].

2.3.1 Tratamiento de la DMT2

El tratamiento de la DMT2 generalmente no requiere administración de insulina, pero sí de la disminución del nivel de glucosa en sangre (idealmente lo más cercano posible a su nivel normal) para prevenir complicaciones crónicas [4,8]. Si bien, una de las modalidades terapéuticas para evitar la DMT2 consiste en su prevención a través de hábitos alimenticios saludables y la práctica de actividad física; una vez se presente la enfermedad, la medida más efectiva para su tratamiento es la administración de medicamento.

Actualmente, existen diversos medicamentos comercialmente disponibles para el tratamiento de la DMT2, como la Glimpirida [8], Glipizida [58,59], Rosiglitazona [59,60], Pioglitazona [58–60], Glibenclamida, Metformina, Gliclazida [8,58,59], Acarbosa, Repaglinida, entre otros [8,59]. Todos han mostrado disminuir eficazmente los niveles de glucosa en sangre, estimular la producción de insulina y potenciar su acción, así como también, disminuir la adiposidad, lipotoxicidad y producción excesiva de glucosa hepática [8,9]. Sin embargo, su eficacia es inestable en el tiempo, puesto que producen efectos secundarios no deseados como

aumento de peso, hipoglicemia, náusea y fatiga, entre otros [8]. Sumado a lo anterior, no existe un tratamiento que minimice las complicaciones crónicas secundarias a largo plazo de la enfermedad, lo cual afecta la calidad y expectativa de vida de los pacientes. Las complicaciones asociadas a la DMT2 comprometen el endotelio del sistema micro y macrovascular [22], alterando la función normal de diversos órganos y tejidos, como la retina (retinopatía), riñón (nefropatía), nervios periféricos (neuropatía) y sistema cardiovascular [8,10]. Estas alteraciones pueden causar y aumentar el riesgo de otras enfermedades, como cataratas, glaucoma [8], insuficiencia cardíaca [22], y accidente cerebrovascular [5,7].

2.3.2 Blancos moleculares implicados en DMT2

Debido a la naturaleza multifactorial de la DMT2 y a la variedad de blancos moleculares implicados en las rutas metabólicas asociadas con su etiopatogenia, no existe un objetivo terapéutico específico que sugiera un tratamiento definitivo para esta enfermedad. No obstante, se ha identificado diversos blancos farmacológicos plausibles para su tratamiento, tales como la DPP-4, FFAR1, GPCRs, α -Glucosidasa, PPAR γ , ALR, receptor de glucagón (GCGr), GP, cotransportador 2 sodio-glucosa (SGLT2), fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y PTP1B, entre otros [8]. A continuación, se describe la relación de cada una de ellos con la etiopatogenia de la DMT2.

DPP-4: se asocia con deficiencia de los dos tipos de incretina secretadas por el tracto gastrointestinal (GIP y GLP-1) que regulan la secreción de insulina después de comer [8].

FFAR1: interviene en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β del páncreas [8].

GPCRs: específicamente GPR40, GPR119, GPR120 y GPR142, median la transducción de señales internas implicadas en la secreción de insulina e incretinas, a través de la detección de moléculas de la superficie celular [8].

α -Glucosidasa: cataliza la hidrólisis y digestión del glucógeno para favorecer no solo la absorción de carbohidratos consumidos en la dieta, sino también el plegamiento y maduración de glicoproteínas [8].

PPARs: son importantes en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como también en la regulación de la diferenciación y expansión celular [8].

PPAR γ : contribuye en la homeostasis de la glucosa, induciendo la expresión y traslocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4), causando disminución de los niveles de glucosa en sangre, supresión de la glucogénesis en el tejido hepático, aumento en el almacenamiento de lípidos y entrada de glucosa en el tejido muscular [8].

ALR: es considerada un blanco molecular aceptable para el tratamiento de las complicaciones causadas por la DMT2 ligada a la acumulación tisular de sorbitol, a su vez generada por deficiencias en su metabolismo y baja penetración [8].

GCGr: participa en la regulación de la tasa de producción de glucosa hepática. Su función está ligada a su interacción con el glucagón, su ligando endógeno. La acción conjunta del glucagón y la insulina controla la homeostasis y metabolismo de la glucosa. La activación del GCGr por su ligando promueve la glucogenólisis y gluconeogénesis, lo cual incrementa la disponibilidad de glucosa en sangre [8]. Además, el GCGr modula la lipogénesis hepática y la síntesis de colesterol [61].

GP: participa en el control glicémico, favoreciendo la glucogenólisis y la movilización de glucosa a nivel celular. La función de esta enzima está vinculada a las isoformas tisulares [8] en las cuales predomina su expresión, esto es, músculo (GPm), hígado (GPh) y cerebro (GPc). La función de las tres isoenzimas de la GP está regulada por la demanda local de energía intra y extracelular [62]. La GPm está asociada con la provisión de energía para la contracción muscular [62,63]; la GPh está implicada en la liberación de glucosa en la circulación sistémica; y la GPc interviene en el aprovechamiento local del glucógeno para abastecer las necesidades energéticas de las neuronas, protegiéndolas del estrés causado por hipoxia e hipoglicemia [62].

SGLT2: controla en aproximadamente un 90 % la reabsorción de la glucosa filtrada por el glomérulo renal [64,65].

PEPCK: estimula la producción y liberación de glucosa hepática a partir del metabolismo de los aminoácidos derivados del piruvato [8].

PTP1B: ha sido ampliamente validada como un elemento clave en la homeostasis de la glucosa y el mecanismo molecular de resistencia a la insulina y leptina. En adición a su función metabólica, la PTP1B modula diversos procesos fisiológicos, como respuesta inmune, crecimiento, migración y diferenciación celular [8,11–14].

2.4 *Proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs)*

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs)³ son una superfamilia de enzimas de señalización transduccional, implicadas en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos, con una alta selectividad para defosforilar los residuos de fosfotirosina (pTyr) de sus sustratos [20,28,66–68]. Las PTPs conforman una de las cuatro familias de proteína fosfatasas descritas hasta el momento. Las otras tres familias las constituyen las fosfoproteínas fosfatasas (PPPs), las proteína tipo fosfoproteína fosfatasa (conocidas también como proteína fosfatasas metalodependientes; MTDP, por sus siglas en inglés), y fosfatasas dependientes de aspartato (Asp) [69]. De manera global, las 264 tirosín fosfatasas –que agrupan a las PTPs- identificadas en humano representan el 1.17 % de su proteoma. Estas fosfatasas son codificadas por 189 genes conocidos y predichos, y 79 pseudogenes o retrogenes de PTPs [70,71]. En conjunto con las proteína tirosina cinasas (PTKs, por sus siglas en inglés), cuya función opuesta es fosforilar los residuos de tirosina⁴, las PTPs contribuyen a la regulación dinámica de la fosforilación de los residuos de tirosina de diversas proteínas intracelulares [20,28,66–68]. De esta manera, intervienen en la iniciación, mantenimiento y terminación de diversas vías moleculares de señalización [66]. En general, estas vías de señalización están vinculadas con funciones biológicas como crecimiento, migración, supervivencia, diferenciación [28,72], metabolismo [28], comunicación intra e intercelular, regulación de la transcripción genética, procesamiento del mRNA, transporte molecular [20,67], y apoptosis [72]. Todas importantes en la coordinación de procesos como la homeostasis tisular, embriogénesis, desarrollo de órganos, y regulación del sistema inmune [20,67]. De ahí que las alteraciones en el proceso de fosforilación se encuentren estrechamente relacionadas con diversas enfermedades [28,66,67], incluyendo diabetes,

³ A diferencia de las proteínas tirosina cinasas (PTKs), que divergieron de un ancestro común, las PTPs evolucionaron en familias separadas y diferentes en estructura y función [77].

⁴ En relación con el proceso general de fosforilación de proteínas, la fosforilación de los residuos de tirosina es característico únicamente de los organismos eucariotas multicelulares [67]. Alrededor del 30 % de las proteínas celulares son fosfoproteínas. La fosforilación del residuo de tirosina representa entre 0.01-0.05% del total de la fosforilación [20].

hipertensión [20], enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide), neurológicas [72], y cáncer (pulmón, colorectal, mama, glioma y diferentes tipos de mieloma) [50,73–76]. En consecuencia, las PTPs y PTKs constituyen blancos farmacológicos bastante atractivos para el tratamiento de múltiples patologías. Aunque existen medicamentos dirigidos a las PTKs utilizados en terapia clínica, todavía no existen fármacos con características clínicas aceptables dirigidos a las PTPs. Esto, a pesar de que varias de estas proteínas han sido validadas como blancos moleculares terapéuticos, y algunos estudios de desarrollo farmacológico han alcanzado la fase clínica II [12,26,28].

2.4.1 Clasificación de las PTPs

A partir de ser fundada por la PTP1B, la familia de las PTPs comenzó a crecer a medida que se iban identificando como fosfatasa de tirosina a otra serie de proteínas con funciones hasta entonces desconocidas. Con la secuenciación del genoma humano, se ha identificado más de 100 genes que conforman la familia de las PTPs [28,66–68,77,78]. En principio, la familia de las PTPs comprende entre 107 [67,68] y 113 [66] miembros distribuidos principalmente en tres grupos, subdivididos a su vez en varios subgrupos. Estos subgrupos pueden variar según el sistema de clasificación de referencia. Sin embargo, los sistemas de clasificación generalmente toman en cuenta la especificidad de sustrato [67] y el residuo nucleofílico del dominio catalítico; que puede ser Cys, Asp e His [66,67,78]. La clasificación convencional incluye a las PTPs basadas en cisteína: clase I, clase II, y clase III [28,66]. El sistema de clasificación de cuatro grupos reúne a las tres clases anteriores, y a las PTPs basadas en aspartato [67]. Por último, el sistema de clasificación más reciente (Figura 1), que sugiere un “PTPoma extendido” constituido por 125 proteínas, agrega a los cuatro grupos anteriores, uno de PTPs basado en histidina [78].

				Sustratos	
Basadas en Cys CxxxxR	Clase I	Subclase I	Clásicas	37	pTyr, PIPs
		Subclase II	Tipo VH1	63	pTyr, pSer, pThr, PIPs, Otras
		Subclase III	SACs	6	PIPs
		Subclase IV	PALD1	1	? = Sustrato desconocido
		Subclase V	INPP4s	2	PIPs
		Subclase VI	TMEM155s	2	PIPs
	Clase II	LMW-PTP	1	pTyr	
		SSU72	1	pSer	
	Clase III	CDC25s	3	pTyr, pThr	
Basadas en Asp	HAD	EYAs	4	pTyr, pSer	
Basadas en His	PGM	UBASH3s	2	pTyr	
	Fosfatasa ácida	ACPs	3	pTyr, pSer, pThr, Otras	

Figura 1. Sistema de clasificación general de las PTPs que sugiere un “PTPoma extendido”. Cada color indica el residuo catalítico de cada grupo de PTPs. La tonalidad de color muestra a las subfamilias dentro de cada grupo. Los números indican la cantidad de miembros en cada grupo. La columna de la derecha indica el sustrato de cada tipo de PTP: fosfoinositido fosfatasa (PIPs), y las formas fosforiladas de los residuos de Tyr (pTyr), Ser (pSer), y Thr (pThr). Tomado de: Alonso y Pulido, 2016. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family [78].

De acuerdo con la clasificación que propone la extensión del PTPoma (Figura 1), las PTPs basadas en cisteína conforman el grupo más grande, dividido a su vez en tres clases: (i) **clase I**, que incluye a las 38 PTPs clásicas [66], también conocidas como el PTPoma clásico [68], y las PTPs de especificidad dual (DSPs) [66], entre otras subclases; (ii) **clase II**, que reúne las PTPs

de bajo peso molecular (LMW)-PTPs; y (iv) **clase III**, representada por las PTPs implicadas en el ciclo de división celular (CDC25s). Los grupos más pequeños y relativamente recientes, conocidos como **PTPs no basadas en cisteína**, exhiben un patrón de plegamiento distinto, y agrupan a las PTPs ojos ausentes (EYA) (PTPs basadas en aspartato), y fosfatasa ácida (PTPs basadas en histidina) [78].

La **clase I** está constituida por 99 PTPs en total; clasificadas como se indica a continuación, en subgrupos o subfamilias con base en la arquitectura y homología entre los dominios catalíticos: (i) 61 PTPs de especificidad dual y (ii) 38 PTPs clásicas específicas de tirosina [68]. Estas últimas, ilustradas en la Figura 2, se subdividen a su vez en PTPs transmembranales tipo receptor (RPTPs; R1-R8) y PTPs no transmembranales, intracelulares o tipo no receptor (NRPTPs; NT1-NT9) [67,68]. Ambas codificadas por 21 y 17 genes, respectivamente [67]. La PTP1B y la proteína tirosina fosfatasa de células T (TCPTP, el pariente más cercano de la PTP1B) pertenecen al grupo de las NRPTPs, concretamente al grupo NT1 [68]. En general, el dominio catalítico N-terminal o dominio PTP de las RPTPs y NRPTPs (representado en esferas de color azul, Figura 2) se localiza en el interior de la célula. El dominio C-terminal no catalítico está constituido por una amplia variedad de elementos estructurales propios de cada grupo de PTPs. Así, el dominio tipo inmunoglobulina, el dominio similar a fibronectina tipo III, y el dominio pseudofosfatasa PTP; forman parte de la estructura de las RPTPs. Mientras que los dominios SH2, PDZ, FERM y el dominio rico en prolina constituyen la estructura de las NRPTPs.

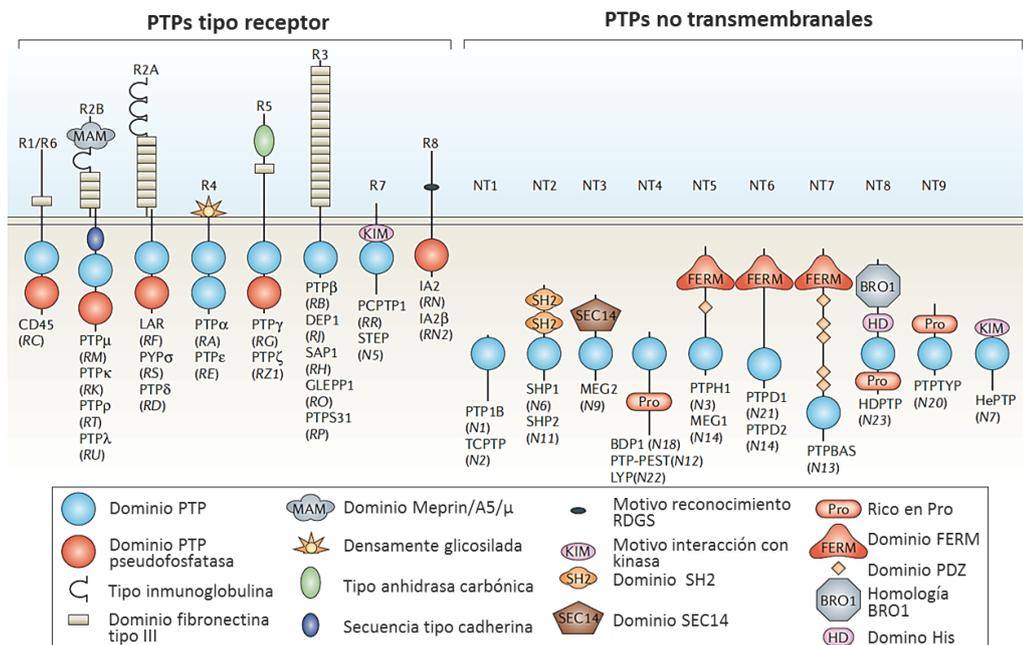


Figura 2. Clasificación de las PTPs clásicas (clase I). Tomado de: Tonks, 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease [77].

2.4.2 Estructura de las PTPs

Las PTPs poseen un dominio catalítico y uno no catalítico. El dominio catalítico o dominio PTP es altamente conservado en secuencia de aminoácidos y plegamiento estructural [20,28]. Sin embargo, sus propiedades de superficie son variadas, dando lugar a diferencias en el

potencial electrostático de superficie, que probablemente influyen en el reconocimiento del sustrato. La Figura 3 que se muestra a continuación, ilustra la estructura 3D de las RPTPs y NRPTPs. El dominio PTP de las NRPTPs (Figura 3a) consta de alrededor de 300 residuos de aminoácidos dispuestos en una estructura alfa/beta (α/β), que a su vez conforman tres partes estructuralmente distintivas e importantes en el mecanismo catalítico. Estas son: (1) un sitio activo [68], definido por la secuencia [(V/H)C(X)₅R(S/T)], el cual contiene un residuo catalítico de cisteína (Cys) que actúa como nucleófilo durante la catálisis (esfera amarilla, Figura 3a) [20], y un residuo de arginina (Arg), que contribuye con la unión al sustrato [28]; (2) Un giro “WPD” (Trp-Pro-Asp) asociado a los cambios conformacionales de cierre y apertura (estructura apo y holo) generados por la interacción con el ligando durante la actividad e inactividad enzimática (de color púrpura, Figura 3a); (3) Un giro de reconocimiento del residuo de pTyr, pSer o pThre, según la especificidad del sustrato (de color azul, Figura 3a), un sitio secundario de unión (de color naranja, Figura 3a), un giro β 5- β 6 (de color verde, Figura 3a), y un giro que contiene al residuo Gln o loop Q (de color gris, Figura 3a) [20,68]. Todos importantes para la función catalítica de las NRPTPs. Además del dominio PTP, la estructura de la mayoría de RPTPs consta de una región transmembranal, un dominio extracelular, y dos dominios PTP citoplasmáticos: (i) un dominio cercano a la membrana, o dominio proximal (D1), y (ii) un dominio distante de membrana, o dominio distal (D2) (Figura 3b) [66].

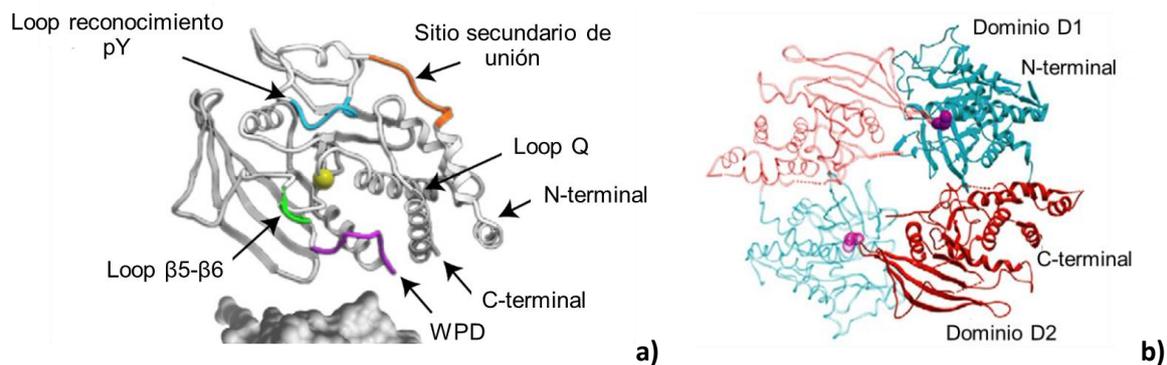


Figura 3. Elementos de estructura secundaria del dominio catalítico de las PTPs clásicas (clase I). **a)** modelo estructural de la PTP1B, elegido miembro representativo del grupo de las NRPTPs. La esfera amarilla representa el residuo catalítico de cisteína ubicado en el sitio activo [(V/H)C(X)₅R(S/T)]. **b)** modelo estructural de las RPTPs. La región de color azul corresponde al dominio D1 y la de color rojo al dominio D2. La esfera púrpura representa el residuo catalítico de cisteína ubicado en el sitio activo dentro del dominio D1. Tomado de: Barr et al., 2009. Large-Scale Structural Analysis of the Classical Human Protein Tyrosine Phosphatome [68].

El sitio activo del dominio catalítico (o dominio PTP) de las PTPs se encuentra dentro de una hendidura o bolsillo; de ~ 9 Å y de ~ 6 Å de profundidad para las PTPs específicas de tirosina y las PTPs de especificidad dual, respectivamente. El sitio activo de las PTPs de especificidad dual puede acoplarse a los sustratos que contengan pTyr y pSer/pThr. Por el contrario, el bolsillo del sitio activo de las PTPs específicas de tirosina, que contiene el giro de reconocimiento de pTyr (ubicado entre α 1- β 1) [68], es selectivo para los sustratos que contienen pTyr (de color azul, Figura 3a) [79]. Adicionalmente, cerca del sitio activo, puede haber un sitio secundario de unión a pTyr, como el que se ha identificado en la PTP1B (de color naranja, Figura 3a) [68].

2.4.3 Especificidad de sustrato de las PTPs

En general, los sustratos fisiológicos de las PTPs son fosfoproteínas. Sin embargo, a pesar de la similitud estructural y de secuencia; existen diferencias de especificidad de sustrato entre los distintos grupos de la familia. Esta especificidad de sustrato depende de las reacciones de hidrólisis de ésteres de fosfato catalizadas por las PTPs [20,78]. Así por ejemplo, las PTPs específicas de tirosina, tienen especificidad restringida por la forma fosforilada de este residuo (pTyr) en sustratos de naturaleza peptídica [20]. En contraste, las PTPs de especificidad dual, además de defosforilar las formas fosforiladas de los residuos de tirosina (pTyr), serina (pSer) y treonina (pThr) de sustratos proteicos, pueden remover fosfatos de sustratos no proteicos, incluyendo lípidos de señalización [80], como el fosfoinosítido PIP₃ [81].

En términos estructurales, se ha demostrado que, *in vivo*, la especificidad del sustrato de las PTPs está definida por el dominio catalítico, el dominio no catalítico [66], y por otros mecanismos regulatorios, como modificaciones postraduccionales (e.g. fosforilación), localización subcelular, tisular, y acción de otros dominios o elementos regulatorios (e.g. SH2 o motivo KIM) [68]. Por su parte, el dominio no catalítico orienta a las PTPs hacia los compartimentos intracelulares en los que hay disponibilidad local efectiva de sustrato en concentración alta [66].

2.5 Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

La PTP1B es una fosfatasa citosólica monomérica, del tipo no receptor (NRPTP), codificada por el gen *PTPN1* (locus 20q13). La forma de la PTP1B que incluye su estructura completa (PTP1B₁₋₄₃₅), también conocida como la forma completa o canónica de la PTP1B, pesa alrededor de 50 kDa, y consta de tres dominios estructurales: (i) un dominio catalítico o dominio PTP N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀) altamente conservado entre los miembros de la familia PTP, cuyo peso molecular es de aproximadamente 37 kDa; (ii) un dominio regulador no catalítico rico en prolina, intrínsecamente desestructurado (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀); y (iii) un dominio C-terminal (PTP1B₄₀₁₋₄₃₅) hidrofóbico de localización celular [12,36,82,83] (Figura 4) que dirige a la PTP1B hacia el retículo endoplasmático o mitocondria (Figura 5). Cada uno de estos dominios estructurales será descrito en detalle más adelante (ver en la sección: 2.5.1 estructura de la PTP1B).

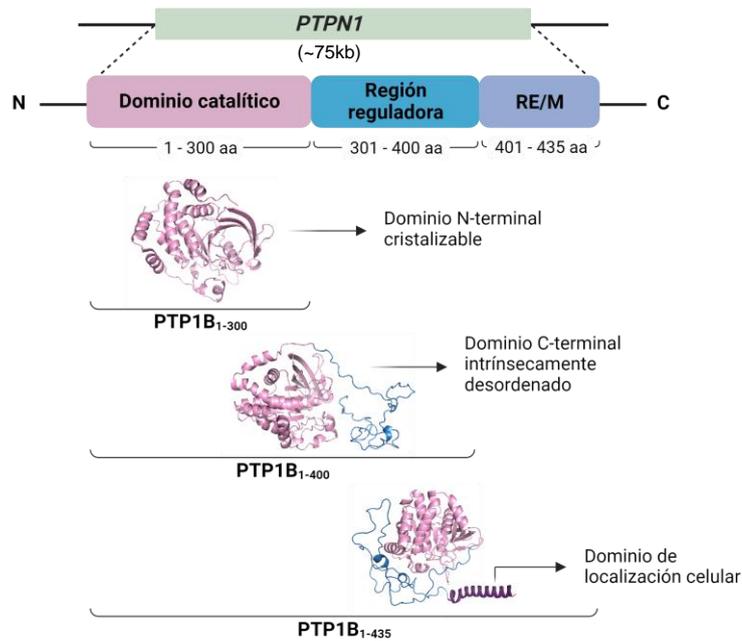


Figura 4. Dominios estructurales de la PTP1B. La estructura completa de la PTP1B está constituida por el dominio catalítico N-terminal (PDB ID: 1SUG), la región reguladora rica en prolina, intrínsecamente desestructurada, y el dominio de localización celular que dirige a la PTP1B hacia el RE o mitocondria, dependiendo de la isoforma que se exprese. Tomado de: Coronell et al., 2023. The importance of including the C-terminal domain of PTP1B₁₋₄₀₀ to identify potential antidiabetic inhibitors [84].

La PTP1B se expresa como dos variantes o isoformas generadas por corte y empalme (del inglés, *splicing*) alternativo. Cada isoforma define su anclaje y ubicación dentro de la célula, los cuales están diferencialmente dirigidos por los últimos aminoácidos del dominio de localización celular C-terminal (PTP1B₄₀₁₋₄₃₅) [85–88] (Figura 5). La primera isoforma, cuya secuencia terminal de aminoácidos es VCFH, se ancla en la membrana mitocondrial externa. Aunque esta variante fue identificada inicialmente en cerebro de rata (siendo la única variante que se expresa en estos organismos), también se ha encontrado en varias líneas celulares de mamífero (e.g. COS-7, HeLa, y MDCK). La segunda isoforma, cuya secuencia terminal es FLFNSNT, se ancla en la membrana del retículo endoplasmático (RE). Esta variante se aisló por primera vez de placenta humana [86,87], y representa la principal forma de NRPTPs en humanos [87].

A pesar de su localización celular, la variante de PTP1B ubicada en el RE interactúa con diversos sustratos localizados en la membrana plasmática (e.g. sarcoma (Src) y el receptor de insulina) a través de movimientos dinámicos y extensiones de la red membranal del RE [85]. En contraparte, el mecanismo de interacción entre la variante mitocondrial y sus sustratos no es completamente entendido. Sin embargo, se sugiere que algunos de los sustratos de esta variante pueden incluir la familia Src de proteínas cinasas, PTPs que contienen el dominio de homología Src 2 (SH2), receptores del factor de crecimiento epidermal (EGF: ErbB1/ErbB2), y algunas enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones [86].

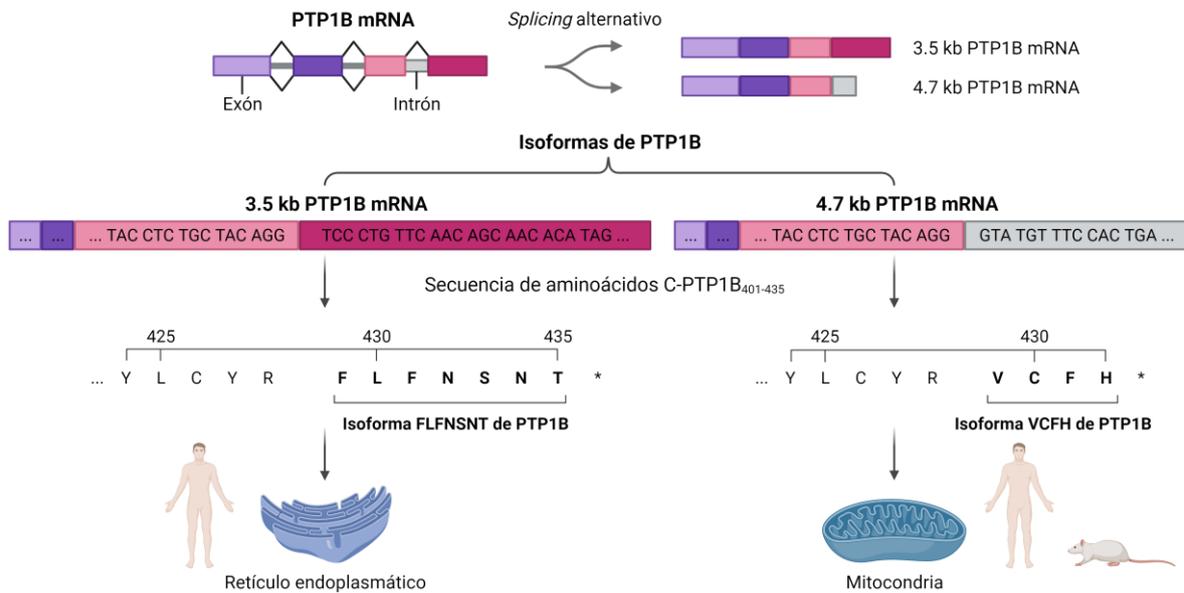


Figura 5. Isoformas de la PTP1B. El tipo de *splicing* alternativo del mRNA de la PTP1B que da lugar a las dos variantes de la enzima implica la retención del último intrón. Ambas variantes difieren en la secuencia de los últimos 7 y 4 aminoácidos. La isoforma FLFNSNT (expresada en humano) dirige a la PTP1B hacia el RE. La isoforma VCFH (expresada en humano y otras líneas celulares de mamífero), dirige a la PTP1B a la mitocondria. La información de las secuencias se obtuvo de Shifrin and Neel [87], Chernoff et al. [89] and Guan et al. [90].

La función biológica de la PTP1B está vinculada con la variedad de sustratos con los que interactúa. Gran parte de los sustratos de unión de la PTP1B participan en vías de señalamiento que controlan diversos procesos fisiológicos como metabolismo, sinapsis, crecimiento celular, estrés del RE, respuesta inmune [91–93], y otras funciones que serán descritas más adelante (ver en la sección: función de la PTP1B). Las alteraciones en la función de la PTP1B están asociadas con varias condiciones patológicas. Entre ellas la DMT2, obesidad [11,17,24,27,38,40,50,74,93,94], cáncer [50,73–76], y enfermedad de Alzheimer [95,96].

El papel fisiológico de la PTP1B en todos estos procesos la ha convertido en un blanco molecular ideal para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas. De ahí el interés científico en desarrollar un fármaco clínicamente aceptable que pueda inhibir la función catalítica de esta enzima. A partir de su descubrimiento, la investigación sobre la PTP1B ha guiado el desarrollo de compuestos antidiabéticos y antitumorales. Además, ha proporcionado claves en la implementación de estrategias metodológicas más robustas dirigidas al desarrollo viable de un inhibidor con un beneficio terapéutico real. Retomando parte del trabajo de Yip et al. [97], y reuniendo evidencia más reciente, el Cuadro 1 resume las principales contribuciones a la investigación de la PTP1B desde que fue aislada por primera vez.

Cuadro 1. Principales avances en la historia de investigación de la PTP1B

Año	Hallazgos	Referencias
1988	<ul style="list-style-type: none"> Primera purificación y caracterización del dominio catalítico de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₂₁, 37 kDa) aislada de placenta humana. 	[95]
	<ul style="list-style-type: none"> Aislamiento de un clon de cDNA de hPTP1B (isoforma FLFNSNT) 	[86]
	<ul style="list-style-type: none"> Mapeo cromosómico del gen hPTP1B 	[96]
1990	<ul style="list-style-type: none"> Efecto antagónico de la PTP1B en eventos tempranos conducidos por la insulina en ovocitos de <i>Xenopus</i> Primera variante de PTP1B generada por splicing (isoforma VCFH) identificada en cerebro de rata 	[97] [87]
1992	<ul style="list-style-type: none"> Primera caracterización de la localización de la isoforma FLFNSNT de PTP1B en el RE (variante del RE) dirigida por el dominio C-terminal de localización celular (PTP1B₄₀₁₋₄₃₅) 	[85]
1993	<ul style="list-style-type: none"> Primer hallazgo de la isoforma VCFH (variante mitocondrial) de PTP1B en fibroblastos diploides humanos y células HeLa 	[84]
1994	<ul style="list-style-type: none"> Primera estructura cristalina del dominio catalítico de hPTP1B (PTP1B₁₋₃₂₁) resuelta a 2.85 Å (PDB: 2HNQ) Asociación de la sobreexpresión de PTP1B con tumor mamario humano y carcinoma ovárico Compuesto mimético de pTyr (DFMP) como primer inhibidor de fosfatasa 	[98] [99,100]
1995	<ul style="list-style-type: none"> Evidencia estructural de la especificidad de PTP1B por aminoácidos ácidos en sus sustratos peptídicos 	[101]
1996	<ul style="list-style-type: none"> Primera demostración de la asociación directa entre el RI y la PTP1B 	[102]
1997	<ul style="list-style-type: none"> Descubrimiento de un sitio de unión de fosfato secundario, adyacente al sitio activo de la PTP1B 	[103]
	<ul style="list-style-type: none"> Primera evidencia fisiológica del rol de la PTP1B en el señalamiento de la insulina y su validación como blanco farmacológico para el tratamiento de la diabetes y obesidad 	[16]
1999	<ul style="list-style-type: none"> Primera molécula pequeña inhibidora de la PTP1B (identificada como competitiva) estabilizadora de glucosa plasmática en ratones ob/ob, y que entró a ensayos clínicos: Ertiprotafib Primera evidencia que sugiere desarrollar inhibidores bidentados potentes y altamente selectivos de la PTP1B 	[11,104] [105]
2001	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición oxidativa reversible de PTP1B por H₂O₂ estimulado por insulina Identificación del motivo consenso de reconocimiento de sustrato PTP1B [(E/D)-pY-pY-(R/K)] Identificación de janus quinasa 2 (JAK2) y tirosina quinasa 2 (TYK2) como sustratos de PTP1B 	[106] [107]
2002	<ul style="list-style-type: none"> Primer uso de ASOs como estrategia de inhibición de la PTP1B Segunda evidencia que valida a la PTP1B como blanco farmacológico antidiabético y antiobesidad: disminución de insulina en plasma y glucosa sanguínea en ratones diabéticos tratados con ASOs Modulación de la vía de señalamiento de la leptina por acción de la PTP1B Primera evidencia de la asociación entre la variabilidad del gen de PTP1B y DT2 Análogos de piridazina identificados como primeros inhibidores no competitivos* de la PTP1B Primera evidencia que sugiere un sitio alostérico de inhibición de la PTP1B 	[45,108] [109] [110] [111]
2004	<ul style="list-style-type: none"> Descubrimiento de un sitio alostérico específico que involucra las hélices α3, α6 and α7 del dominio catalítico de la PTP1B 	[38]
2005	<ul style="list-style-type: none"> Primera evidencia de la presencia de PTP1B mitocondrial en tejido cerebral 	[112]
2014	<ul style="list-style-type: none"> Resolución por NMR de la región C-terminal intrínsecamente desordenada de PTP1B (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀) 	[50]
2017	<ul style="list-style-type: none"> Primera evidencia que indica que los inhibidores de PTP1B podrían también prevenir y revertir la arteriosclerosis 	[91]

* Los análogos de piridazina no fueron los primeros inhibidores no competitivos de la PTP1B. El trabajo de Kumar et al. [11] demuestra que el ertiprotafib (inicialmente considerado como inhibidor competitivo de la PTP1B) es un inhibidor no competitivo que induce agregación.

2.5.1 Estructura de la PTP1B

La forma completa, fisiológica, canónica o *in vivo* de la PTP1B (~ 50 kDa) consta de 435 residuos de aminoácidos dispuestos en tres dominios estructurales que controlan su función catalítica: (i) un dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀), conocido también como dominio PTP, el cual es altamente conservado entre los miembros de la familia de PTPs; (ii) un dominio regulador no catalítico, intrínsecamente desordenado rico en prolina (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀); y (iii) un dominio C-terminal hidrofóbico de localización celular (PTP1B₄₀₁₋₄₃₅) [12,36,83] que, dependiendo de la isoforma expresada de la enzima, dirige a la PTP1B al RE (variante FLFNSNT) [85,86,98] o a la mitocondria (variante VCFH) [86]. Debido a que el dominio N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀) tiene una estructura conformacional 3D bien definida, ha sido el único que ha logrado ser resuelto por difracción de rayos X. En cambio, debido a la naturaleza intrínsecamente desordenada e inestable en solución del dominio regulador C-terminal (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀), la única aproximación de su estructura ha sido obtenida a partir de los confórmeros definidos por NMR [50]. Por este motivo, los estudios de cristalización, enzimáticos y computacionales, en su mayoría son llevados a cabo con el dominio catalítico de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀), el cual representa la forma o versión corta de la enzima [12,36,50,83,84,99]. Sin embargo, es importante denotar que la región reguladora C-terminal (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) no es del todo desestructurada. Hay dos hélices alfa que pueden actuar como potenciales sitios de unión e inhibición, a través de un efecto de cooperatividad positiva. Estas son: hélice $\alpha 8'$ (320-327) y hélice $\alpha 9'$ (360-377) [50].

La conformación 3D del dominio catalítico N-terminal de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀) consiste en una estructura alfa/beta (α/β) dispuesta en once láminas β mixtas, rodeadas por ambos lados de ocho hélices α [68]. Todas estos elementos de estructura secundaria están unidos por cinco asas y dos giros [36]. Dentro del dominio PTP catalítico, hay regiones importantes para la especificidad del reconocimiento, unión al sustrato, asistencia en los cambios conformacionales – asociados con las transiciones de estructura apo-holo que definen la forma activa e inactiva de la enzima-, y por lo tanto determinantes para la función catalítica de la PTP1B. Cabe mencionar que las fuerzas intermoleculares que intervienen en la interacción enzima-sustrato son principalmente enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas [12,38,50,82].

En la Figura 6 se ilustran las regiones identificadas en el dominio catalítico que son importantes para la unión, reconocimiento del sustrato y función catalítica de la PTP1B. El nombre de cada región está dado por el símbolo del residuo de aminoácido conservado evolutivamente en cada *loop*. Así, el *loop* Q y E reciben su nombre porque contienen los residuos altamente conservados de glutamina y glutamato, respectivamente. El *loop* P o PTP corresponde al sitio activo (Phe182-Arg221), el cual incluye el residuo catalítico de Cys215, presente en el motivo (I/V)HCXAGXXR(S/T)G (donde X es cualquier aminoácido), importante para el mecanismo nucleofílico [89]. El *loop* catalítico WPD (Trp179, Pro180, Asp181), localizado en el bolsillo de unión (Tyr176-Pro185), coordina las conformaciones de apertura y cierre asociadas al cambio de estado de actividad e inactividad de la enzima. El *loop* pTyr (Lys36, Tyr46-Val49, Lys120, and Phe182), es importante para el reconocimiento y estabilización de la interacción con el sustrato. El *loop* Q (Gly259-Thr263) ayuda a estabilizar la conformación activa del *loop* WPD durante la catálisis enzimática. El *loop* E, localizado en medio del *loop* pTyr y WPD, estabiliza el acceso al grupo fosfato del sustrato y la conformación cerrada del *loop* WPD. Además de estos sitios primarios de unión, existen otros sitios secundarios de unión involucrados en la función catalítica de la PTP1B. Algunos de estos se encuentran dentro del dominio PTP (e.g. Tyr20, Arg24, His25, Phe52, and Arg254) [82], y otros, en la región C-terminal intrínsecamente desordenada (i.e. hélices $\alpha 8'$ and $\alpha 9'$, conformada por los aminoácidos 320-327 y 360-377, respectivamente). La

evidencia sugiere que los sitios identificados en la región reguladora C-terminal de la PTP1B (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) no solo son claves, sino también determinantes para su inhibición [50,84]. Aunque no se señalan en la Figura 6, cabe resaltar que las hélices α_3 (Glu186-Glu200), α_6 (Ala264-Ile281) y α_7 (Ser285-Ser295) son importantes para la regulación alostérica de la PTP1B (ver más adelante en la Figura 8) [12,82,83].

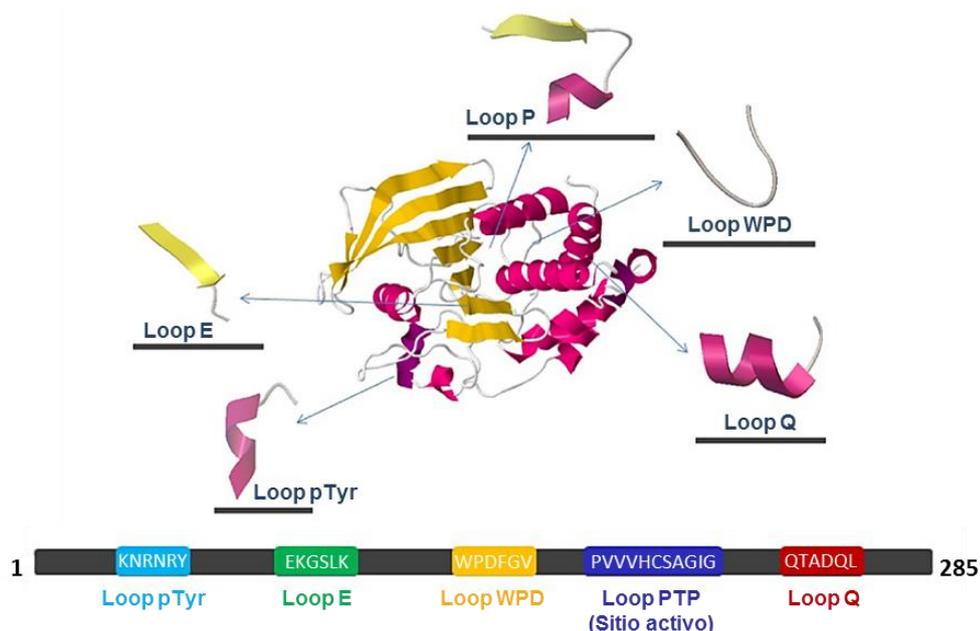


Figura 6. Estructura 3D y aminoácidos implicados en la unión al ligando y catálisis de la PTP1B. Las regiones estructurales resaltadas corresponden a aquellas regiones altamente conservadas (>85%) en las PTPs de organismos eucariotas. El nombre de cada *loop* (Q, E, WPD, PTP) está dado por el símbolo del residuo de aminoácido conservado evolutivamente en cada región. El loop pTyr facilita el acceso del sustrato al sitio activo a través de interacciones electrostáticas. El *loop* WPD coordina los cambios conformacionales de apertura y cierre asociados al estado activo e inactivo de la enzima. Los *loops* Q y E, ayudan a estabilizar la interacción con el sustrato y los cambios conformacionales de actividad e inactividad de la PTP1B. El *loop* P o PTP contiene el residuo catalítico Cys215, importante para el ataque nucleofílico de los residuos de pTyr durante la catálisis enzimática. La estructura representada corresponde al dominio catalítico PTP1B₁₋₂₈₅ (PDB ID: 3A5K). Adaptado de: Reddy et al., 2017. Structure-Based Virtual Screening of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors: Significance, Challenges, and Solutions [99].

2.5.2 Función de la PTP1B

En principio, la actividad biológica de la PTP1B es regulada por seis tipos de modificaciones postraduccionales: oxidación, nitrosilación, sulfhidración, sumoilación, fosforilación, y corte proteolítico [36,91]. La función catalítica de la PTP1B reside en la defosforilación de los residuos de fosfotirosina (pTyr) presentes en sus sustratos. La mayoría estos sustratos se encuentran localizados en la membrana plasmática (e.g. receptor de insulina-IR, receptor de leptina-LepR, y receptor 5 de efrina tipo A-EphA5) [16,45,91,100–106]; y en menor cantidad en el citoplasma (e.g. janus cinasa 2-JAK2, isoforma de piruvato kinasa M2-PKM2, y factor de iniciación de la traducción eucariota 2-eIF2 α) [91,107–112]. El mecanismo de defosforilación ocurre por ataque nucleofílico por parte del residuo reducido de cisteína (Cys215) localizado en el dominio catalítico de la enzima, específicamente, en la secuencia conservada (I/V)HCXAGXXR(S/T)G [11,91].

Todas las vías bioquímicas en las cuales participa la PTP1B como regulador positivo o negativo, bien sea en condiciones fisiológicas basales o patológicas, son iniciadas por la interacción de la enzima con sus diferentes sustratos (estos pueden ser RTKs y NRTKs). Por lo tanto, la actividad biológica de la PTP1B está asociada con su localización celular, tipo, variedad, y distancia espacial de sus sustratos [28,91,113]. Además de su rol como regulador negativo de las vías metabólicas de insulina y leptina (Figura 7), la PTP1B está involucrada en otros procesos de transducción de señales que implican respuesta a estrés por parte del RE, comunicación intercelular, balance de energía, tráfico de vesículas, proliferación celular, respuesta inmune [91], y vías de señalamiento en la que participa el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) [92]. Adicionalmente, la PTP1B regula otras funciones del sistema nervioso central, como aprendizaje, memoria y sinapsis [96]. A continuación, se describe la función metabólica de la PTP1B y los principales sustratos de unión en las vías de señalización de insulina y leptina.

2.5.2.1 Función de la PTP1B en la vía de señalización de insulina

La vía de señalización de insulina inicia con la interacción entre la insulina y su receptor (IR), lo cual conduce a la activación del receptor a través de la autofosforilación de los residuos de tirosina presentes en el dominio intracelular tirosina-cinasa (IRK, por sus siglas en inglés) [114,115]. La activación del IR genera una cascada de señalización bioquímica que involucra el reclutamiento y fosforilación de los residuos de tirosina (Tyr) de la proteína Shc que contiene un único dominio SH2 [116–118], y de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2). Estas dos proteínas son expresadas normalmente en todos los tejidos del cuerpo, y su función depende del contexto celular y fisiológico. En el hígado, el IRS-1 produce una señal continua en estado posprandial, mientras que el IRS-2 participa en periodos de ayuno y después de la ingesta de alimentos. En páncreas, el IRS-1 interviene en la secreción de insulina, mientras que la función del IRS-2 está asociada con el desarrollo y crecimiento de las células β [119,120].

De un lado, la vía de señalización activada por la fosforilación de la proteína Shc, promueve la activación de la vía de señalización Erk/MAPK, implicada en diferenciación y proliferación celular, apoptosis, respuesta a estrés, supervivencia y desarrollo de células tumorales [121,122]. Por otro lado, la fosforilación del IRS-1/2 modula la vía PI3K/Akt (también conocida como PI3K-PKB/Akt) (Figura 7), importante en el metabolismo (homeóstasis de glucosa, síntesis de glucógeno y proteínas), crecimiento, diferenciación, proliferación celular, apoptosis, y cáncer [123–126]. Además de participar en la contracción muscular, la vía de señalización PI3K/Akt mediada por insulina regula el tránsito intracelular y el transporte de glucosa a través de la membrana, principalmente en adipocitos y células de músculo esquelético [115,127]. La vía PI3K/Akt se activa cuando las proteínas IRS-1/2 (que están cerca a la membrana plasmática) son fosforiladas. Una vez activado, el IRS-1/2 recluta y activa la PI3K de clase 1A, contrarrestando así la función inactivadora de la subunidad catalítica p110 y la subunidad reguladora p85 de PI3K [125,126].

Además de ser regulada a través de su reclutamiento en la membrana plasmática, PI3K también puede ser regulada por algunos miembros de la familia Ras. La activación de PI3K genera la producción de polifosfoinosítidos en el lado citosólico de la membrana plasmática. Estos resultan de la conversión del fosfolípido PIP₂ (también denominado PtdIns(3,4)P₂) en PIP₃ (también denominado PtdIns(3,4,5)P₃). Dicha reacción es revertida por la proteína homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN), que defosforila PIP₃ para producir PIP₂ [124,128]. La proteína Akt inactiva se une a PIP₃ a través de su dominio PH, lo cual conduce a su activación. Esta activación ocurre una vez esta Akt es fosforilada en los residuos de Thr308 y Ser473 por acción de la cinasa

dependiente de fosfatidilinositol 1 (PDK1) y Complejo 2 diana de rapamicina en mamíferos (mTORC2), respectivamente [115,124]. Akt participa principalmente en el metabolismo de lípidos y glucosa mediado por insulina. En su estado activo, Akt fosforila a la proteína sustrato de Akt de 160 kDa (AS160) [129] y promueve el transporte intracelular de glucosa mediado por el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) [125,129]. Este proceso de transporte requiere la translocación de GLUT4 desde el interior hasta el exterior de la célula, la cual es conducida por las vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSVs). La exocitosis de GLUT4 favorece la captación de glucosa por los tejidos adyacentes y la disminución de los niveles de glucosa en plasma [91,115].

La participación de la PTP1B en el balance energético se lleva a cabo a través de la vía de señalización de leptina. La leptina se expresa principalmente en el hipotálamo y es secretada por el tejido adiposo blanco y ejecuta sus funciones en el cerebro y otros tejidos. En el cerebro, la unión de la leptina con los residuos de tirosina Try985, Try1077 y Try1138 de la isoforma larga del receptor de leptina (LepRb) activa diferentes vías de señalamiento, entre ellas, la vía janus cinasa 2/transductor de señal y activador de la transcripción 3 (JAK2/STAT3) e IRS/PI3K. La vía de IRS/PI3K converge con la vía de señalización de insulina (descrita anteriormente). La vía JAK2/STAT3, sobre la cual se hace énfasis en la Figura 7, está implicada directamente en el control energético a través de la acción de factores orexigénicos (proteína relacionada con agutí-AgRP y neuropéptido Y-NPY) y anorexigénicos (pro-opiomelanocortina-POMC). Esta vía requiere la fosforilación de JAK2 y la consecuente fosforilación de STAT3 [130–132]. Una vez fosforilado, STAT3 se activa tras su dimerización, facilitando así su translocación desde el citoplasma al núcleo celular. De manera independiente o asistido por otros factores de transcripción, STAT3 regula positiva y negativamente la expresión de diferentes genes involucrados en proliferación, diferenciación, supervivencia celular, inmunosupresión, oncogénesis, angiogénesis y troncalidad. Alguno de los blancos directos de STAT3 asociados con tumorigénesis incluyen c-Fos, c-Myc, AKT, TGF- β , FOXO1, POMC (representados en recuadros dentro del núcleo, Figura 7), entre otros [133,134].

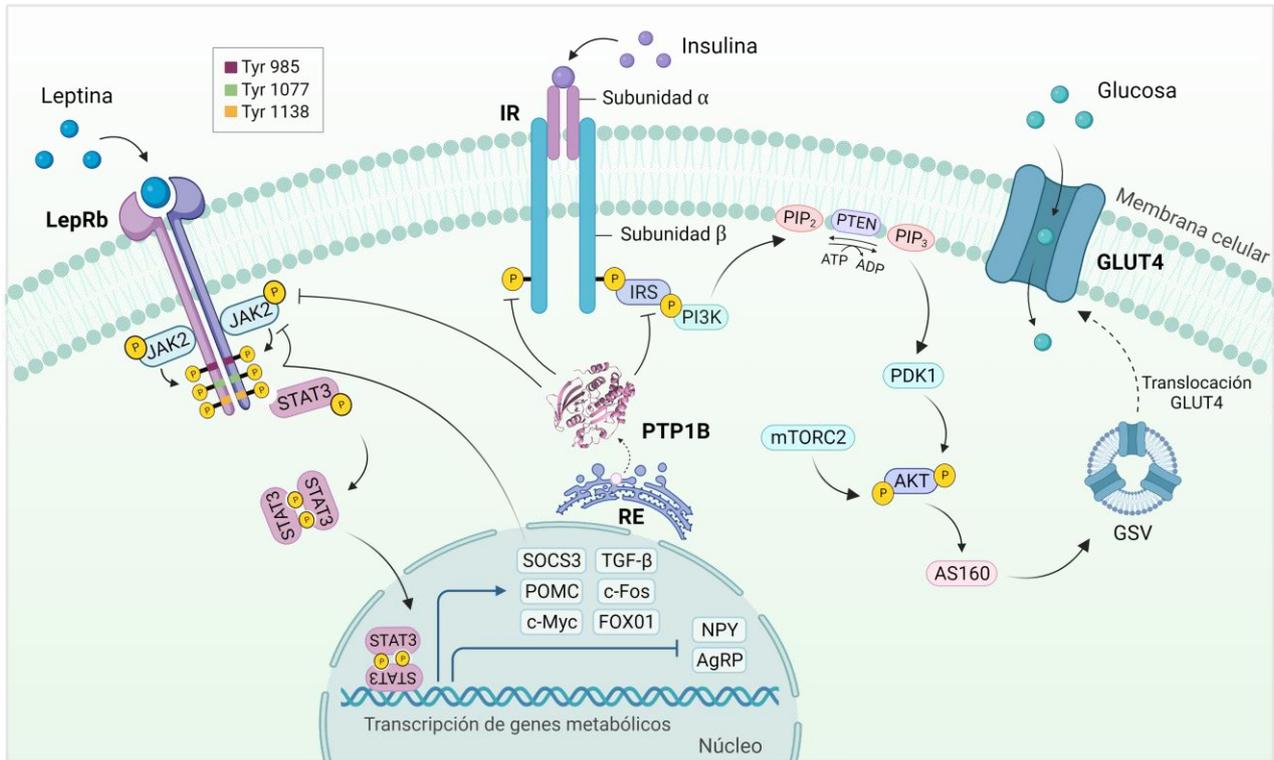


Figura 7. Función reguladora de la PTP1B de las vías de señalización de insulina y leptina. En condiciones fisiológicas basales, PTP1B actúa como regulador negativo de las vías de insulina y leptina. En la vía de insulina, la PTP1B defosforila los residuos de Tyr en IR, IRS-1 y IRS-2, promoviendo la entrada controlada de glucosa al interior de la célula, a través del control de la translocación de GLUT4. En la vía de leptina, la PTP1B controla el balance energético mediante la activación de STAT3 y sus genes blancos después de defosforilar LepRb y JAK2. Los blancos directos de STAT3 incluyen SOCS3, POMC, c-Fos, c-Myc, TGF- β , FOXO1, entre otros [134].

2.5.3 Sustratos de unión de la PTP1B

La diversidad de sustratos de unión de la PTP1B está directamente relacionada con la variedad de funciones que ejerce la enzima. Por lo que, además del IR implicado en el metabolismo, comprenden otros que están involucrados en la respuesta a estrés del RE, comunicación intercelular, balance de energía, tráfico vesicular, cáncer y respuesta inmune [91]. Entre estos sustratos, se encuentran otros receptores de proteína tirosina cinasas (RTKs), como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Así como también, algunas tirosina cinasas del tipo no receptor como JAK2, TYK2 [91], HER1, STAT, y Src [135]. También, proteínas como STAM2, EphA45 [91,103–106], PERK, PKM2, y otras que contienen el dominio de homología 3 de la proteína Src (SH3) como la p130^{Cas} [12,136–138]. Algunos de los sustratos de la PTP1B se indican en la vía de señalización de insulina y leptina.

En el Cuadro 2 se recapitulan los sustratos involucrados en las diferentes vías de señalización moduladas por la PTP1B que se encuentran asociadas con condiciones patológicas como estrés del RE e inflamación, condiciones primarias que promueven el desarrollo de otras enfermedades.

Cuadro 2. Función de la PTP1B en diversas condiciones patológicas

Enfermedad/condición patológica	Vía de señalamiento	Sustratos	Tipo de regulación	Referencia
Diabetes tipo 1 y 2	<ul style="list-style-type: none"> Insulina/Akt/GLUT4 Insulina/EphA5/Efrina A5 	IR, IRS-1/2, IGF-1 Shc, EphA5	Negativa	[16,45,88,98–104]
Obesidad	<ul style="list-style-type: none"> Leptina-STAT 	JAK2, LepR, GHR, STAT3, TYK2	Negativa	[111,112]
Estrés del RE ^a	<ul style="list-style-type: none"> General Específica (UPR) 	Mecanismo UPR: PERK, IRE-1, JNK, eIF2 α	Negativa	[88,105–108]
Respuesta inmune, inflamación	<ul style="list-style-type: none"> JAK-STAT 	JAK2 (IFN γ), (IFN α), STAT5a/b	Negativa	[107,160]
Oncogénesis ^b	<ul style="list-style-type: none"> PTKs Ras EGF 	EGFR, PDGFR, IGF-1R, p210Bcr-Abl, p62Dok, p120 ^{RasGAP} , Src, p130 ^{Cas} , Crk, Grb2	<ul style="list-style-type: none"> Negativa (p210Bcr-Abl) Positiva (EGFR, PDGFR, IGF-1R, Src, p62Dok, p120^{RasGap}) 	[12,94,154–158]
Cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> HER2/Neu 	Src, p210, Bcr-Abl	Positiva	[102,155,161]
Adenocarcinoma pancreático	<ul style="list-style-type: none"> PKM2/AMPK/mTOC1 	PKM2	Positiva	[109,110]
Cáncer gástrico	<ul style="list-style-type: none"> Src/Ras/MAPK Src/PI3K/Akt Erk1/2 FAK 	Src	Positiva	[75,162,163]
Cardiopatía	<ul style="list-style-type: none"> Insulina, leptina NO (células del endotelio vascular) IRS1/PI3K/AKT/eNOS 	JAK2, VEGFR2 IRS1	Negativa	[17,22,107,164]
Enfermedad de Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> Plasticidad presináptica de NMDA mediada por receptor Señalamiento neuronal e hipotalámico de insulina y leptina BDNF-TrkB Estrés RE-UPR-ATF6 nSOC 	NMDAR, IR, IRS1 LepR, JAK2, IRE-1, TrkB, Src	<ul style="list-style-type: none"> Negativa Positiva (neuroinflamación) 	[92,93]

^a El estrés del RE es una condición primaria para el desarrollo de DMT2, obesidad y otros desórdenes metabólicos. PTP1B regula la respuesta a estrés del RE a través de dos mecanismos: (1) general, a través de la regulación indirecta de una o más vías de señalamiento; (2) específica, mediante la regulación directa que involucra la respuesta a proteínas no plegadas (UPR) [91,107–110].

^b Bajo ciertas condiciones fisiológicas, dependiendo de la interacción enzima-sustrato, la función de PTP1B puede ser como regulador positivo o negativo [74,136].

2.5.4 Importancia farmacológica de la PTP1B

El interés terapéutico de la PTP1B estaba enfocado principalmente en su función metabólica, razón por la cual se convirtió en un blanco farmacológico ampliamente validado para el tratamiento de la DMT2 y obesidad [11–14]. Sin embargo, diversos estudios evidencian que la PTP1B puede ser considerada también como un blanco de intervención terapéutica para el tratamiento de otras enfermedades y condiciones patológicas como el cáncer, enfermedad de Alzheimer, inflamación y estrés del RE [28,139].

Las razones por las cuales, la PTP1B es un blanco molecular farmacológico con amplio potencial para el tratamiento de estas enfermedades se resumen a continuación: (i) tratamiento de la DMT2 y obesidad: aumento de sensibilidad a la insulina, resistencia al aumento de peso, y disminución de la tendencia a la obesidad en ratones nulos (a nivel global y neuronal) para el gen de la PTP1B [15–19]; (ii) efecto antidiabético y antiobesidad observados en respuesta a la interacción de PTP1B con diversos compuestos químicos (Figura 8) y ASOs [11,12,29,38,58,135,140–157]; (iii) la inhibición de la PTP1B puede asistir en la prevención de las complicaciones secundarias a largo plazo derivadas de la DMT2 (retinopatía, nefropatía, neuropatía, y desórdenes cardiovasculares) [8,10,17]; (iv) con base en el sustrato y el contexto fisiológico, al igual que otras PTPs, la PTP1B puede actuar como supresor o promotor tumoral [12,74,75,97,136–138,158–160], de ahí que alteraciones en su función estén estrechamente relacionadas con diversos tipos de cáncer, entre los que cabe mencionar, cáncer de pulmón [50,73], leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de Hodgkin, cáncer de piel, mama, gástrico, colorectal, hígado, próstata, y cáncer de ovario [74,75]; (v) la PTP1B regula algunas vías de señalamiento involucradas con la enfermedad de Alzheimer. Esto compromete la función de la enzima en la sinapsis neuronal, neuroinflamación mediada por células de la microglía, y procesos de aprendizaje y memoria [95,96].

2.5.5 PTP1B como blanco molecular antidiabético

La PTP1B, es un blanco molecular validado en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la DMT2 y la obesidad principalmente por tres razones: la primera, se fundamenta en los cambios fisiológicos generados por la inactivación de su función catalítica, que muestran disminución de los principales síntomas de la enfermedad. Esto es; disminución del índice glicémico, adiposidad y resistencia a la insulina [20,21]. La segunda razón, resalta la participación de la PTP1B en los desórdenes cardiovasculares que resultan de la disfunción endotelial y cardíaca, a su vez asociadas con las complicaciones a largo plazo de la DMT2 y obesidad. De hecho, por esta última razón, se ha sugerido a la PTP1B como único blanco farmacológico para tratar tanto la DMT2, como los desórdenes cardiovasculares generados como una de sus complicaciones a largo plazo [17,22]. La tercera razón, propone a la PTP1B como la mejor opción para mejorar la sensibilidad a la insulina sin generar aumento de peso, tal como se ha observado con los agonistas de PPAR γ [21].

2.5.6 Estrategias de inhibición de la PTP1B

Las estrategias de inhibición o modalidades terapéuticas dirigidas a la PTP1B son dirigidas al desarrollo de un inhibidor selectivo, eficaz, permeable y biodisponible. Con base en el sitio de interacción ligando-proteína de los diferentes compuestos que han mostrado tener efecto inhibitorio de la PTP1B, es posible identificar principalmente cuatro estrategias de inhibición para inactivar de forma específica a la PTP1B: (1) inhibición competitiva u ortostérica dirigida al sitio activo, la cual sugiere que la conformación oxidada de la enzima es importante para estabilizar su estado inactivo [27–35]; (2) inhibición no competitiva o alostérica dirigida los sitios alostéricos $\alpha 3$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ identificados dentro del dominio catalítico (PTP1B₁₋₃₀₀) [28,36–39], y las hélices $\alpha 8'$ (320-327) y $\alpha 9'$ (360-377) ubicados en el dominio regulador intrínsecamente desordenado (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) [50]; (3) inhibición bidentada, dirigida al sitio activo (sitio A) y otros sitios secundarios adyacentes de unión (sitios B, C, y D), preferiblemente no conservados en los demás miembros de la familia PTP [20,28,40–43]; (4) silenciamiento genético de la PTP1B a través de la

utilización de i) ASOs que inhiben la expresión del mRNA de la PTP1B [26,44–47], y (ii) RNA interferente que induce la degradación del mRNA de la PTP1B mediante el clivaje de ~95 % del mismo [26,48]. En general, el silenciamiento del gen de la PTP1B ha mostrado ser potente y tener alta afinidad de unión a las secuencias de mRNA de PTP1B. Adicionalmente, el resultado del silenciamiento genético de la PTP1B *in vivo* resulta en un incremento de la sensibilización a la insulina, control glicémico y resistencia a la obesidad inducida por dieta [47].

Otra estrategia de inactivación de la enzima sugiere un nuevo y único mecanismo de inhibición producido por la oligomerización o agregación del dominio catalítico de la PTP1B. Este tipo de inhibición no involucra la unión del ligando en el sitio activo o alostérico de la enzima, por lo tanto, sigue una cinética enzimática no clásica, y no la cinética clásica de Michaelis-Menten [11,161]. Debido a que la agregación de la PTP1B es un mecanismo de inhibición observado únicamente por efecto del ertiprotafib [11,161,162], y el silenciamiento genético no hizo parte de la estrategia metodológica de este trabajo, a continuación, se hará énfasis en las primeras tres estrategias de inhibición, las cuales son representadas en la Figura 8.

2.5.6.1 Inhibición ortostérica

Este tipo de inhibición reversible, conocido también como competitiva, se dirige al sitio activo (A), y constituye el tipo de metodología tradicional de diseño de inhibidores de la PTP1B. Es una estrategia que se considera “vulnerable” y quizás la menos adecuada, puesto que los residuos de aminoácido del sitio activo son positivamente cargados y son bastante conservados entre las PTPs. Esto supondría una demanda de densidad de carga muy alta de un potencial inhibidor del sitio activo, lo cual limita su selectividad, permeabilidad celular y biodisponibilidad [12,21,24,28,36,38,163]. Adicionalmente, la mayoría de los miembros de esta familia están involucrados en diversas funciones celulares importantes [99,164], por lo que, a través de esta estrategia se incrementa la probabilidad de diseñar una molécula bioactiva con efecto *off target*.

2.5.6.2 Inhibición alostérica

Este mecanismo⁵ consiste en inhibir la acción catalítica de la PTP1B dirigiendo el ligando hacia una región ubicada a 20 Å del sitio activo, y de este modo bloquear el cierre del giro WPD y mantener su conformación abierta. Debido a que los residuos del sitio de inhibición alostérica no son conservados entre las PTPs, y tienen polaridad distinta a los residuos del sitio activo, la inhibición alostérica permite mayor selectividad y biodisponibilidad. De un lado, el aumento de la selectividad es favorecido por la presencia de ciertos residuos de aminoácidos dentro del sitio alostérico que no están presentes dentro del dominio catalítico altamente conservado en la familia de las PTPs. Por otro lado, el incremento de la biodisponibilidad puede estar favorecido por la susceptibilidad del sitio alostérico de unirse a moléculas de bajo peso molecular, y por la naturaleza hidrofóbica de los residuos ahí presentes. Estas dos condiciones implican una disminución de cargas negativas, incremento de la permeabilidad celular, y por tanto una mayor biodisponibilidad de los potenciales inhibidores de la PTP1B [21,28,38].

⁵ La inhibición alostérica junto con la bidentada ha marcado un punto de partida opcional en el desarrollo de fármacos inhibidores de la PTP1B y otros miembros de la familia PTP, como la DUSP6, CD45, SHP-2 [28,38].

La inhibición alostérica de la actividad catalítica de la PTP1B puede ser inducida a través de dos formas: (i) dirigiendo la interacción del ligando con ciertos aminoácidos de las hélices α_3 , α_6 , and α_7 del dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀) [38] o (ii) dirigiendo y potenciando la interacción del ligando con las hélices α_8' and α_9' del dominio regulador C-terminal (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀). Estas últimas también pueden interactuar con la hélice α_7 del dominio catalítico N-terminal y formar nuevos sitios de unión [50].

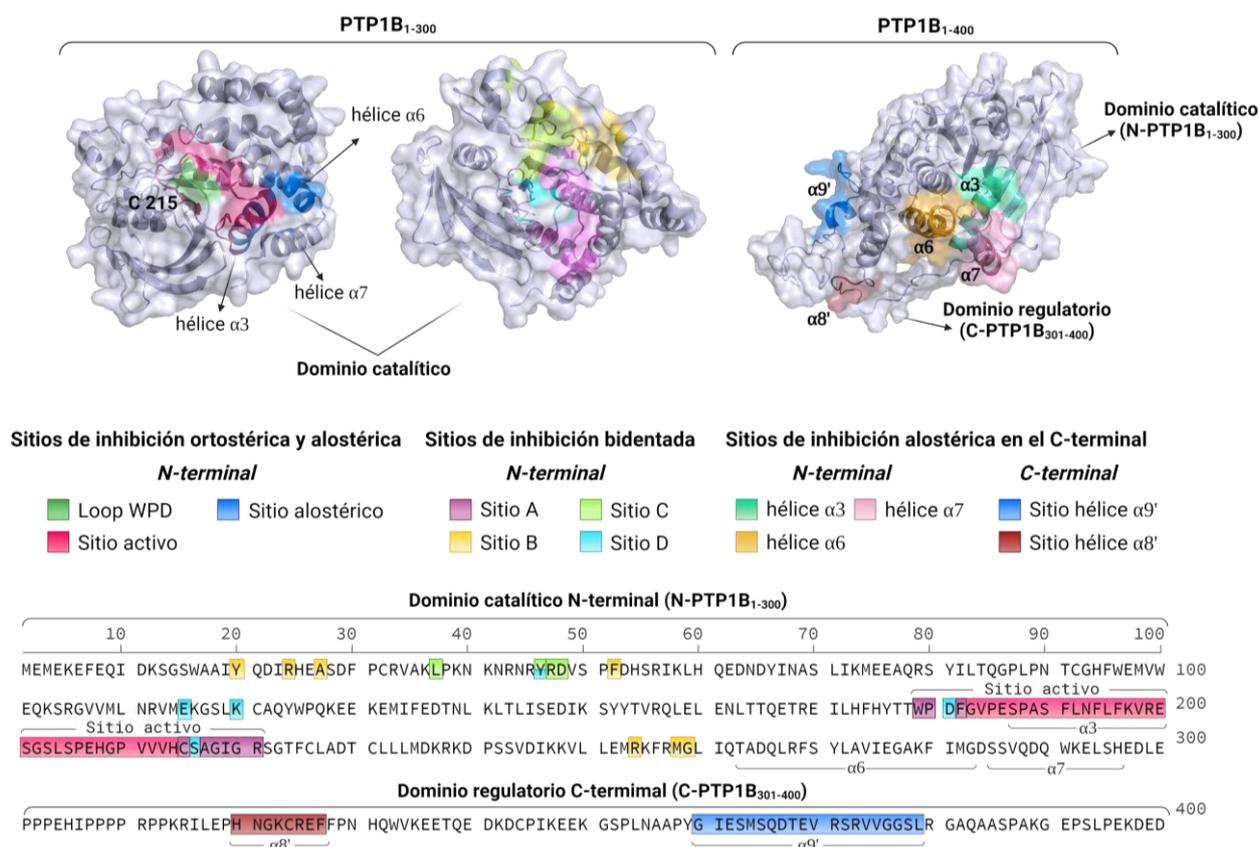


Figura 8. Sitios estructurales de inhibición de la PTP1B. Las estrategias de inhibición de la PTP1B pueden involucrar la forma corta (PTP1B₁₋₃₀₀) o completa de la enzima (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀). Las estrategias de inhibición ortostérica y alostérica se dirigen respectivamente al sitio activo y alostérico del dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀). La otra modalidad de inhibición alostérica incluye las hélices α_8 and α_9 del dominio regulador C-terminal intrínsecamente desordenado (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀), el cual interactúa con las hélices α_3 , α_6 and α_7 del dominio catalítico [38,40,42,50]. Las imágenes de la estructura 3D de la PTP1B fueron realizadas en PyMOL versión 2.5.

2.5.6.3 Inhibición bidentada

Este tipo de inhibición reversible se propuso a partir de la identificación de un sitio secundario de unión a pTyr en la PTP1B⁶. En esta estrategia, algunos aminoácidos del sitio activo (sitio A) y otros sitios estructuralmente adyacentes no conservados dentro del dominio catalítico (sitios B; C y D), participan de manera conjunta en la inactivación de la PTP1B, aumentando así

⁶ El sitio secundario de unión a pTyr se identificó por primera vez en la PTP1B [42], y posterior a eso en otros miembros de la familia PTP, como la SHP-2 [28].

la potencia y selectividad de inhibición (especialmente sobre la TCPTP) [42,164]. Con base en los sitios de unión al ligando (co-cristalizados con la PTP1B y registrados en el PDB), se ha identificado cuatro tipos de inhibición bidentada: AB, AC, ABC y ADC [164]. Estos sitios de inhibición bidentada (A, B, C y D) están señalados en la Figura 8.

Con base en el trabajo de Montalibet & Kennedy [26], y más recientemente de Liu et al. [12], el Cuadro 3 resume el estado del arte de cada una de las estrategias de inhibición de la PTP1B, algunos de los compuestos que han mostrado inhibirla selectivamente, y la fase de investigación hasta donde avanzó el estudio de estos compuestos dentro del proceso de desarrollo farmacológico.

En el Cuadro 3 se resumen las principales estrategias de inhibición de la PTP1B, así como también se indican algunos de los inhibidores de la enzima que han sido patentados, y han avanzado hasta la fase clínica I y II de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Las razones por las cuales estos estudios han sido interrumpidos están relacionadas con características farmacocinéticas y efectos farmacodinámicos poco favorables de los compuestos evaluados. El ertiprotafib, por ejemplo, resultó poco eficaz, y generó efectos secundarios adversos no deseados (no reportados) asociados con la dosis administrada en varios de los participantes del estudio. Por otro lado, el oligonucleótido antisentido IONIS 113715 restablece parcialmente la sensibilidad a la insulina en ratones obesos [25], la dosis (400 mg) y la vía de administración (intravenosa) no son las ideales [165].

Cuadro 3. Estrategias de inhibición, inhibidores de la PTP1B y su estado de avance

Estrategia de inhibición	Ventajas	Desventajas	Últimos avances	Contribuyentes	Referencia
Inhibición competitiva	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición potente 	<ul style="list-style-type: none"> • Pobres propiedades farmacocinéticas (carga y tamaño) • Baja permeabilidad y biodisponibilidad • Difícil selectividad Vs. TCPTP 	No hay candidatos clínicos	Aventis, Ontogen, Abbott, Merck, Novo Nordisk, Wyeth, Einstein College of Medicine, etc.	[21,25,26]
		<ul style="list-style-type: none"> • Baja eficacia • Efectos secundarios 	Patente: 2003 (JTT-551) Fase clínica II	Japan Tobacco	[189–192]
Agregación	<ul style="list-style-type: none"> • Alta afinidad • Selectividad aceptable • Biodisponibilidad oral 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca eficacia • Efectos adversos 	Patente: 1998 (Ertiprotafib) Fase clínica II	Wyeth, Pfizer	[11,12,25,104,186]
Inhibición alostérica (sitio activo)	<ul style="list-style-type: none"> • Es posible superar limitaciones por selectividad y competencia de sustrato • Pueden alcanzar un buen perfil farmacocinético 	<ul style="list-style-type: none"> • Dirigida al dominio catalítico PTP 	No hay candidatos clínicos	Sunesis Pharmaceuticals	[38]
Inhibición alostérica C-terminal	<ul style="list-style-type: none"> • Alta Selectividad y eficacia preclínica • Buen perfil farmacocinético • Pocos efectos adversos 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja solubilidad en agua y biodisponibilidad oral 	Patente: 1999 (Trodusquemina) Fase clínica I	Genaera	[12,50,175,200–205]
Inhibición bidentada	<ul style="list-style-type: none"> • Alta potencia, selectividad y permeabilidad celular • Buena biodisponibilidad oral 	Algunos sitios secundarios están en otras PTPs	No Hay candidatos clínicos	Merck-Frosst, Abbott, Albert Einstein College of Medicine	[12,20,28,40–43,103,206]
Oligonucleótidos antisentido	<ul style="list-style-type: none"> • Alta selectividad y eficacia • Seguridad 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere inyección y altas dosis • Requiere ser acoplado a un transportador 	IONIS 113715 Fase clínica II	Ionis pharmaceuticals, Merck	[12,25,26,44–46,207–213]
			Más potente que ISIS 113715	No reportados	IONIS PTP1B _{RX} Inicio Fase clínica II
iRNA	<ul style="list-style-type: none"> • Puede ser más potente que los oligonucleótidos antisentido • Concentración efectiva más baja y más estable (para siRNA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Gran tamaño y carga • Requiere de diseño racional de un sistema de transporte • Efectos "Off-target" 	Primera patente: 2003 Segunda patente: 2008 Ensayos preclínicos	Ceptyr Inc. Sirna Therapeutics	[215] [26,48,215–218]

2.5.7 Inhibidores de la PTP1B

Actualmente se ha identificado y patentado diversos compuestos probados *in vitro*, *in vivo* y/o *in silico* que han demostrado tener efecto inhibitorio sobre la actividad catalítica de la PTP1B, y que tienen potencial uso farmacológico para el manejo de la DMT2, obesidad y cáncer [11,24,36,40,50,73,76,94,111,135,141,143–148,165–189]. Estos compuestos en su mayoría son de origen biológico, e intentan imitar al sustrato endógeno de la enzima (pTyr).

En general, los inhibidores de la PTP1B pueden ser clasificados con base en su estructura, propiedades químicas, el sitio de inhibición de la enzima, y fuente a partir de la cual son obtenidos. Con base en el sitio o mecanismo de inhibición, pueden ser competitivos, alostéricos y bidentados [28]. Con base en la fuente de obtención, los inhibidores de la PTP1B y sus derivados pueden ser de origen natural, sintético, y semisintético [190].

En la Figura 9 se muestra la estructura química de algunas de las moléculas con efecto antidiabético que han sido utilizadas como control positivo en los ensayos de inhibición enzimática de la PTP1B, como por ejemplo, el ácido clorogénico (AC) (inhibidor natural alostérico/competitivo) [82,84,191,192] y el ácido ursólico (AU) (inhibidor natural competitivo/mixto) [32,84,140,192–195]. Otros compuestos como la trodusquemina/MSI-1436 (inhibidor natural alostérico) [50], y ertiprotafib (inhibidor sintético inductor de agregación enzimática) [11], entre otros, han alcanzado la fase clínica I y II, respectivamente. Sin embargo, los ensayos clínicos han sido suspendidos debido a la falta de eficacia, especificidad, y efectos adversos de estos y otros compuestos [11,12].

Existen otro tipo de fármacos sintéticos de medicación oral comercialmente disponibles como la metformina, nateglinida, glibenclamida y pioglitazona, entre otros, que modulan la función del IR inhibiendo la actividad de PTP1B. No obstante, de modo similar a lo que se ha observado con los compuestos antes mencionados, el uso prolongado de estos medicamentos está asociado con efectos secundarios y complicaciones serias de salud [59].

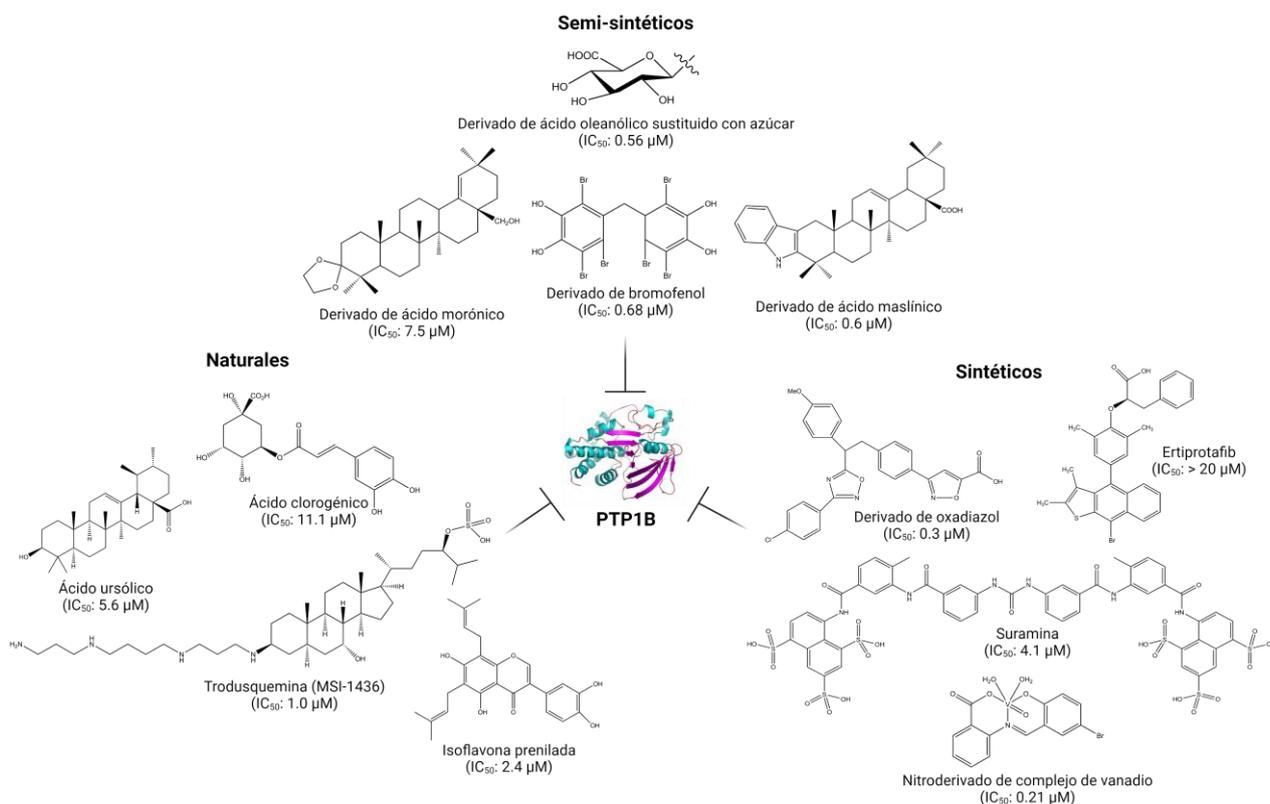


Figura 9. Estructura química y fuente de obtención de algunos inhibidores de la PTP1B. Diversos compuestos de origen natural y sintético han sido utilizados como inhibidores de la PTP1B. Algunos como el ácido clorogénico y ursólico, se han empleado como control positivo de inhibición en ensayos de actividad enzimática. Otros, como trodusquemina y ertiprotafib, han alcanzado la fase clínica I y II de desarrollo farmacológico.

2.5.8 Retos en el desarrollo de inhibidores de la PTP1B

El diseño de un inhibidor de la PTP1B con un perfil farmacológico clínicamente aceptable es un reto persistente por la exigencia de balance entre la selectividad, potencia, eficacia, permeabilidad, y biodisponibilidad del potencial inhibidor [11,21,28,190]. Las limitaciones que subyacen a este balance se deben a la localización intracelular de la enzima, carga positiva de los aminoácidos del sitio catalítico, y al nivel altamente conservado del dominio catalítico N-terminal en todos los miembros de la familia PTP; en especial, aquellos que se encuentran cercanamente relacionados, como PTP α , SHP1/2, and TCPTP [36,38,68,165]. Esta cercanía se hace aún estrecha al comparar el dominio catalítico de la PTP1B con el de la TCPTP. Ambas proteínas comparten una similitud estructural y de secuencia de RMSD (raíz de la desviación cuadrática media) $< 0.5 \text{ \AA}$ y 72 % (residuos 1-300), respectivamente [21,24,36,164]. Esta similitud entre PTP1B y TCPTP repercute en la selectividad y efecto de inhibición *off target*, puesto que la inhibición de la TCPTP se asocia con alteraciones fisiológicas importantes (destrucción de la médula ósea, alteraciones en la generación y función de células B y T) [10, 14].

Es importante tener en cuenta que la mayoría de los estudios de inhibición *in vitro*, *in vivo* e *in silico* se han llevado a cabo con el dominio catalítico de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀), conocido también como la forma o versión corta de la enzima. Por esta razón, con base en las limitaciones inherentes a dirigir la inactivación de la PTP1B a través del dominio catalítico, es necesario considerar sitios alternos que promuevan la interacción de posibles inhibidores con los residuos hidrofóbicos no conservados de la enzima. De ahí que la inclusión de la región reguladora de la PTP1B (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) es importante, ya que esta región hace parte de la forma fisiológica de la enzima, es decir, la forma que se encuentra *in vivo* (PTP1B₁₋₄₀₀). Además, se puede identificar posibles inhibidores que se unan en esta región de la enzima, lo cual podría favorecer su eficacia y capacidad de inhibición.

2.6 Actividad enzimática

Los ensayos enzimáticos son procedimientos experimentales diseñados para caracterizar la actividad de las enzimas en sistemas bioquímicos o celulares, lo cual incluye el estudio de la cinética e inhibición enzimática. Las mediciones en este tipo de ensayos se obtienen a través de lecturas biofísicas de señales fluorescentes, luminiscentes o espectrofotométricas [196]. Estos ensayos son importantes porque permiten medir la actividad celular, monitorear la actividad de una enzima durante su purificación, e identificar y/o caracterizar agentes terapéuticos. De ahí que sus aplicaciones se extiendan, además de la caracterización enzimática, en el diagnóstico clínico, y diseño de fármacos [196,197].

En farmacología, los ensayos de actividad enzimática brindan información sobre la actividad biológica de muchos fármacos o candidatos a fármacos, cinética de unión y mecanismo de acción de un inhibidor. Se estima que alrededor de la mitad de todos los fármacos comercialmente disponibles son inhibidores enzimáticos [198,199]. Los dos valores de referencia más utilizados para la identificación del mecanismo de acción de ciertos compuestos con efecto inhibidor, son: la concentración de inhibición media (IC₅₀) y la constante de inhibición (K_i). Siendo la medida más informativa y empleada en el estudio de la eficacia de un fármaco, la IC₅₀ que indica la concentración de inhibidor que produce el 50 % de inhibición de una enzima. La K_i corresponde a la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor [200–202].

2.6.1 Actividad enzimática de la PTP1B

La actividad enzimática de la PTP1B es comúnmente evaluada por ensayos colorimétricos; midiendo el cambio de color generado por el producto (p-nitrofenolato, pNP) de la hidrólisis de pNPP (p-nitrofenil fosfato), que es el sustrato ampliamente utilizado para cuantificar la actividad fosfatasa de otras enzimas de la misma familia (fosfatasas de tirosina). Durante el monitoreo de la hidrólisis de pNPP causada por la actividad enzimática de PTP1B, se mide la absorbancia de pNP a 405 nm [203]. A partir de estos valores se determina la concentración óptima de sustrato y enzima a utilizar en ensayos subsecuentes. Además, se determina la IC_{50} cuando se evalúa la actividad fosfatasa en presencia de un inhibidor [204]. A continuación, en la Figura 10 se ilustra la reacción química catalizada por la PTP1B, en donde a partir del pNPP, que es un mimético de fosfotirosina (sustrato fisiológico de la PTP1B), se produce pNP (de color amarillo) cuantificable por espectrofotometría a 405 nm.

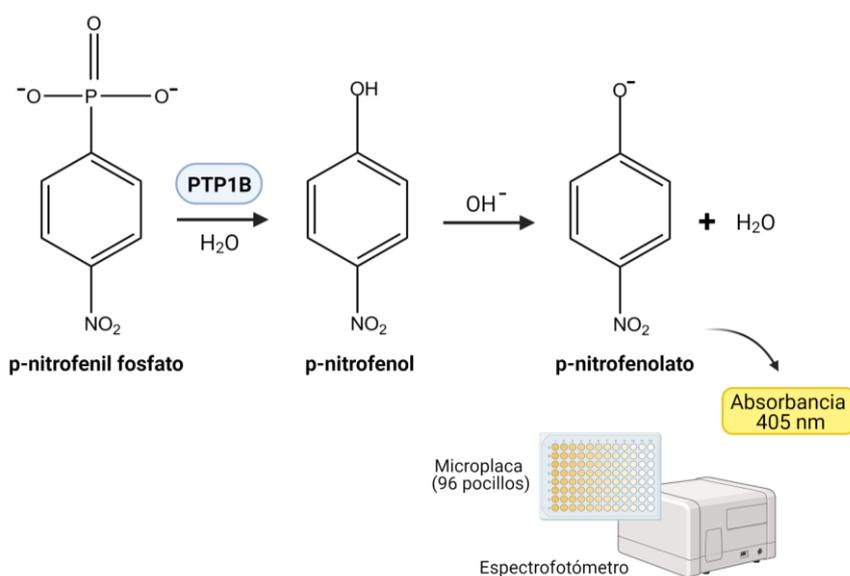


Figura 10. Reacción de hidrólisis del pNPP catalizada por la PTP1B. El grupo fosfato (PO_4) del p-nitrofenil fosfato (pNPP) es hidrolizado por la PTP1B. El producto final de la reacción es p-nitrofenolato (pNP), el cual produce un color amarillo cuantificable a 405 nm de absorbancia en un espectrofotómetro. Adaptado de: Martin et al., 2012. Identification of small molecule inhibitors of PTP σ through an integrative virtual and biochemical approach [205].

Los ensayos de cinética enzimática conducidos con la PTP1B han contribuido al estudio y desarrollo de inhibidores que han avanzado a la fase I y II de ensayos clínicos. El resultado de este esfuerzo es el mejor entendimiento de los sitios de unión y mecanismo de acción de los inhibidores de la PTP1B. En general, la mayoría de los estudios de actividad enzimática de la PTP1B se han ejecutado con la forma corta de la enzima, que corresponde al dominio cristalizable. Sin embargo, los estudios comparativos de cinética enzimática que han incluido la forma corta (PTP1B₁₋₃₀₀) y la forma larga de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀), son clave en la identificación de diferencias en la actividad enzimática (K_m y k_{cat}) entre el dominio catalítico N-terminal y el dominio regulador C-terminal intrínsecamente desordenado.

2.7 Cribado virtual en el estudio y desarrollo de fármacos

La dimensión del espacio químico, cuyo número aproximado de compuestos con efecto farmacológico conocido y aún por conocerse, es de 10^{63} moléculas [206,207]. El tener una idea del número de compuestos que por su actividad biológica pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades, ha impulsado el desarrollo de herramientas computacionales que permiten explorar dichas moléculas e identificar aquellas que cumplan con un perfil farmacológico clínicamente aceptable. Idealmente en las primeras fases del desarrollo y descubrimiento de fármacos. El cribado virtual es una de las herramientas computacionales que se utilizan para hacer el proceso de búsqueda de compuestos con potencial efecto terapéutico más eficiente [207,208].

El cribado virtual ofrece diversas ventajas en el diseño y desarrollo de fármacos asistidos computacionalmente. Una de ellas es que reduce el costo y tiempo de búsqueda de compuestos en comparación con lo que podría tomar experimentalmente, como en la técnica de detección de alto rendimiento (conocida como *high-throughput screening* o HTS, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, con base en los criterios de búsqueda, es posible reducir y adecuar el espacio químico al blanco molecular de interés y a la posibilidad de acceder o sintetizar los compuestos disponibles en las bibliotecas virtuales. Los pasos metodológicos del cribado virtual incluyen en primer lugar, el acoplamiento molecular de una proteína (que puede ser un receptor o una enzima), en este caso la PTP1B, con una biblioteca virtual de compuestos. Esta biblioteca virtual se construye bajo los criterios de inclusión de interés (e.g. toxicidad, aprobación por la FDA, disponibilidad comercial, etc.). Como resultado del acoplamiento se obtiene una lista de compuestos, cada uno con la afinidad de unión por el blanco molecular de interés (calculada en kcal/mol) y su código dentro de la biblioteca virtual. Este código facilita la búsqueda de estos compuestos en diferentes bases de datos (e.g. Drugbank, Pubchem, Zinc, etc.) en las que se puede obtener información experimental o predicha sobre sus parámetros farmacocinéticos, fase clínica de desarrollo, interacciones medicamentosas, etc. Finalmente, se seleccionan los compuestos con mayor afinidad de unión al blanco molecular de interés y que pueden ser evaluados experimentalmente [208].

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis general

La inhibición de la actividad enzimática de la *h*PTP1B evaluada *in vitro* varía según la región estructural de la enzima que interactúa con el inhibidor. Esta región puede estar constituida por el dominio catalítico N-terminal (*h*PTP1B₋₁₋₃₀₀) o incluir el dominio regulador C-terminal intrínsecamente desordenado (*h*PTP1B₁₋₄₀₀) de la *h*PTP1B.

3.2 Hipótesis específica

La inhibición de la actividad enzimática de la *h*PTP1B (expresada en valores de IC₅₀ y porcentaje de inhibición) evaluada *in vitro*, es mayor en la forma de la enzima que incluye la región reguladora C-terminal (*h*PTP1B₁₋₄₀₀), en comparación con la forma de la enzima que comprende únicamente su dominio catalítico N-terminal (*h*PTP1B₋₁₋₃₀₀).

4. OBJETIVOS

4.1 *Objetivo general*

Identificar nuevos inhibidores de la PTP1B mediante ensayos colorimétricos de actividad enzimática y acoplamiento molecular.

4.2 *Objetivos específicos*

- 4.2.1 Construir el sistema de expresión y desarrollar el método de purificación de la proteína PTP1B de humano.
- 4.2.2 Estandarizar el ensayo de actividad enzimática de la *h*PTP1B.
- 4.2.3 Realizar un cribado virtual basado en estructura de moléculas disponibles en bases de datos.
- 4.2.4 Llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular con los compuestos elegidos a partir del cribado virtual, antecedentes farmacológicos y disponibilidad comercial.
- 4.2.5 Comparar la actividad enzimática del dominio catalítico de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₂₈₅) y la forma de la enzima que incluye la región reguladora (*h*PTP1B₁₋₄₀₀).
- 4.2.6 Identificar el mecanismo de inhibición de diferentes compuestos con potencial efecto inhibidor y otros reportados como inhibidores de la *h*PTP1B, mediante ensayos de cinética enzimática.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

5.1 Sección experimental

5.1.1 Construcción de los sistemas de expresión de las tres formas de hPTP1B: hPTP1B₁₋₂₈₅, hPTP1B₁₋₃₂₁ y hPTP1B₁₋₄₀₀

5.1.1.1 Diseño de oligonucleótidos para la obtención de los sistemas de expresión para las tres formas de hPTP1B

Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos (F: forward y R: reverse) para construir los tres sistemas de expresión de cada forma de hPTP1B. Así, las secuencias de *pET-28a-PTPN1*₁₋₂₈₅, *pET-28a-PTPN1*₁₋₃₂₁ y *pET-28a-PTPN1*₁₋₄₀₀, corresponden a las formas hPTP1B₁₋₂₈₅, hPTP1B₁₋₃₂₁ y hPTP1B₁₋₄₀₀ de la proteína PTP1B de humano. Los oligonucleótidos se indican en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Oligonucleótidos de amplificación para los tres sistemas de expresión del gen *PTPN1*

Oligonucleótido	Longitud	Secuencia (5'-3')
F-PTP1B ₁₋₂₈₅	31	TCATGGGTGATAGTTAAGTTCAGGACCAATG
R-PTP1B ₁₋₂₈₅	31	CATTGGTCCTGAACTTAACCTATCACCCATGA
F-PTP1B ₁₋₃₂₁	33	CTGGAACCGCATAATTGAAAGTGCCGTGAATTT
R-PTP1B ₁₋₃₂₁	33	AAATTCACGGCACTTTCAATTATGCGGTTCCAG
F-PTP1B ₁₋₄₀₀	23	TGGTCATATGGAAATGGAAAAAG
R-PTP1B ₁₋₄₀₀	26	TGCAAGCTTAGTCTTCATCTTTTTC

5.1.1.2 Amplificación por PCR de las secuencias codificantes para la expresión de las tres formas de hPTP1B

Los componentes utilizados en la reacción de PCR para la amplificación de los tres sistemas de expresión (*pET-28a-PTPN1*₁₋₂₈₅, *pET-28a-PTPN1*₁₋₃₂₁ y *pET-28a-PTPN1*₁₋₄₀₀) se describen en el Cuadro 5. Toda la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, por duplicado. Este volumen total (50 µL) corresponde a la suma del volumen de todos los componentes de la reacción de PCR, como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Componentes de la reacción de PCR para la obtención de las tres secuencias de expresión del gen *PTPN1*

Componente de reacción	Concentración	Sistema de expresión		
		pET-28a- <i>PTPN1</i> ₁₋₂₈₅ (μL)	pET-28a- <i>PTPN1</i> ₁₋₃₂₁ (μL)	pET-28a- <i>PTPN1</i> ₁₋₄₀₀ (μL)
Buffer	5X	10	10	10
dNTPs	10 mM	1	1	1
DNA _{molde}	2.0 ng/μL	1.47	1.47	1.47
Primer F	2.5 ng/μL	3	3.33	2.32
Primer R	2.5 ng/μL	2.4	3.4	2.71
Agua	-	31.63	30.3	32
DNA _{pol}	0.5 unidades/μL	0.5	0.5	0.5

La cadena de DNA molde a partir de la cual se amplificaron las tres secuencias del gen *PTPN1* (con los oligonucleótidos indicados en el Cuadro 4) corresponde a la secuencia completa del gen *PTPN1* (*PTPN1*₁₋₄₃₅). Esta última, hace parte de la construcción *pET-28a(+)-PTPN1* optimizada para *Escherichia coli* (*E. coli*). Las condiciones de la reacción en el termociclador se resumen en el Cuadro 6. El empalme se realizó en un método de escalera, es decir, se escaneó de 55 a 80°C, y el alineamiento previo al inicio de la polimerización ocurrió a los 3 minutos.

Cuadro 6. Condiciones de PCR para obtener las tres secuencias del gen *PTPN1*

Paso	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	1 minuto	34
Desnaturalización	98°C	15 segundos	
Alineamiento	55-80°C (T _m 71-80)	3 minutos	
Extensión	72°C	10 minutos (6000 bases)	
Extensión final	72°C	10 minutos	

5.1.1.3 Transformación de células competentes de *E. coli* con los productos de PCR

Para la transformación de células competentes se utilizaron células de *E. coli* DH5α. A partir de las células transformadas con las tres construcciones de los sistemas de expresión, se realizaron doce cultivos en medio LB sólido con antibiótico (30 mg/mL kanamicina). En total, se sembraron tres cultivos por sistema de expresión, y se incubaron por 12 horas a 37 °C. Posteriormente, se seleccionaron colonias individuales para su crecimiento en medio líquido. Estos últimos se dejaron en agitación a 37 °C durante 12 horas. Pasado este tiempo, se procedió con la extracción de DNA.

5.1.1.4 Aislamiento de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo con el Kit Miniprep QIAGEN (250, Cat. No. 27106). En total, se obtuvieron tres muestras de 50 μL de DNA de cada sistema de expresión (Cuadro 7). Su concentración fue cuantificada por espectrofotometría UV-vis en el equipo NanoDrop™ 2000/2000c ThermoFisher. El Cuadro 7, muestran las concentraciones de cada muestra de DNA y su respectiva relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

5.1.1.5 Secuenciación de las construcciones de los sistemas de expresión de la hPTP1B

Todas las muestras de DNA de cada sistema de construcción fueron secuenciadas en el laboratorio de la Unidad de Biología Molecular (IFC, UNAM). Los resultados de la secuenciación fueron comparados con la secuencia completa optimizada del gen *PTPN1*. Esto, con el fin de corroborar que las construcciones obtenidas correspondían a las secuencias de los genes *PTPN1*₁₋₂₈₅, *PTPN1*₁₋₃₂₁ y *PTPN1*₁₋₄₀₀. La Figura 11 muestra las partes de uno de los tres alineamientos realizados entre la secuencia del gen completo (*PTPN1*₁₋₄₃₅) y la secuencia amplificada de *PTPN1*₁₋₂₈₅, resaltando el codón de inicio y codón de terminación. Finalmente, para los pasos siguientes de expresión de las proteínas correspondientes a cada construcción, se escogieron las muestras de DNA cuya secuenciación había sido completa (marcadas con asterisco en el Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración y pureza del DNA de las construcciones del sistema de expresión pET-28a-PTPN1

Secuencia DNA	Muestra	Concentración ($^{\text{ng}}/\mu\text{L}$)	Relación 260/280
<i>PTPN1</i> ₁₋₂₈₅	1	118.1	1.84
	2*	98.6	1.88
	3	99.7	1.88
<i>PTPN1</i> ₁₋₃₂₁	1	144.3	1.89
	2	106.9	1.93
	3*	132.0	1.96
<i>PTPN1</i> ₁₋₄₀₀	1	122.2	1.88
	2	94.1	2.03
	3	122.0	1.93

* Secuencias a partir de las cuales se realizó la expresión de las tres formas de hPTP1B recombinantes.

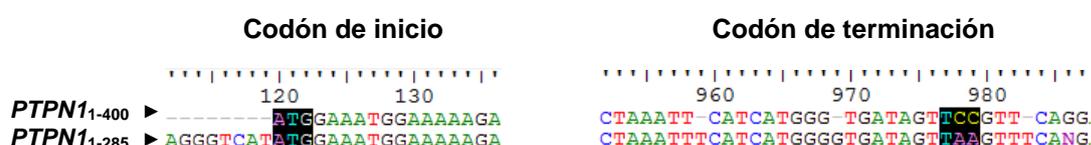


Figura 11. Alineamiento entre la secuencia completa (*PTPN1*₁₋₄₃₅) y una de las tres construcciones del gen *PTPN1* (*PTPN1*₁₋₂₈₅).

5.1.2 Expresión de las proteínas PTP1B recombinantes de humano: *hPTP1B*₁₋₂₈₅, *hPTP1B*₁₋₃₂₁ y *hPTP1B*₁₋₄₀₀

5.1.2.1 Transformación de células de *E. coli* con las construcciones de los sistemas de expresión del gen *PTPN1*

Después de comprobar que los productos de PCR correspondían a las secuencias de los sistemas de expresión codificantes para las proteínas *hPTP1B*₁₋₂₈₅, *hPTP1B*₁₋₃₂₁ y *hPTP1B*₁₋₄₀₀, se llevó a cabo el mismo procedimiento de transformación celular descrito anteriormente (ver en la sección de transformación celular de los productos de PCR); esta vez utilizando células de *E. coli* BL21 pLysS.

5.1.2.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Se transfirieron 500 μ L del cultivo de bacterias transformadas (e incubadas durante 12 horas a 37 °C) en 500 mL de medio LB líquido suplementado con 30 μ g/mL de kanamicina. Luego de incubar los cultivos a 37 °C en agitación a 250 rpm, se indujeron con IPTG (1 mM) una vez que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm y se incubaron nuevamente por 6 horas en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 8000 rpm (centrífuga Thermo Scientific™ Sorvall™ LYNX 4000, rotor de ángulo fijo A-621) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido en amortiguador Tris 50 mM (pH 6.8) y sonicado (10 ciclos, intervalos de 30 segundos). Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm (centrífuga Thermo Scientific™ Sorvall™ LYNX 4000, rotor de ángulo fijo AM 50.14) durante 10 minutos. Después de centrifugar y separar el sobrenadante del producto de la sonicación, este fue filtrado y fraccionado por cromatografía de afinidad a iones Ni(II). Finalmente, se colectaron las fracciones activas de cada proteína (*hPTP1B*₁₋₂₈₅, *hPTP1B*₁₋₃₂₁ y *hPTP1B*₁₋₄₀₀). La actividad de cada fracción fue evaluada mediante el ensayo enzimático de fosfatasa con pNPP como sustrato. Por último, se realizó una electroforesis en geles de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para identificar las fracciones obtenidas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de cada una de las tres formas de la proteína (*hPTP1B*₁₋₂₈₅, *hPTP1B*₁₋₃₂₁ y *hPTP1B*₁₋₄₀₀).

5.1.3 Ensayos de actividad enzimática

Todos los ensayos enzimáticos (evaluación cualitativa de los derivados del AG, determinación de IC₅₀, cinética y competencia enzimática) realizados con las tres formas de las proteínas recombinantes purificadas (*hPTP1B*₁₋₂₈₅, *hPTP1B*₁₋₃₂₁ y *hPTP1B*₁₋₄₀₀), se llevaron a cabo en un volumen total de 100 μ L con amortiguador Tris 50 mM, pH 6.8, a una temperatura y tiempo de incubación de 37 °C y 15 minutos, respectivamente. Para establecer las concentraciones óptimas de enzima y sustrato (pNPP), se realizaron ensayos previos con distintas concentraciones de enzima y pNPP. A continuación, se indican las concentraciones ensayadas y óptimas de cada uno de ellos.

5.1.3.1 Definición de la concentración de enzima

Con base en las concentraciones de PTP1B y pNPP empleadas en estudios anteriores que evalúan la actividad enzimática de la PTP1B *in vitro* con diferentes formas de la enzima (PTP1B₁₋₂₉₈, PTP1B₁₋₃₂₁, PTP1B₁₋₄₀₅, PTP1B₁₋₄₁₁) [27,38,50,203,204,209], se evaluaron tres concentraciones distintas de enzima: 22 nM, 44 nM y 66 nM. Cada una de ellas con cinco concentraciones de pNPP: 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM y 0.5 mM. Después de determinar la velocidad a la cual, la formación del producto de la reacción (pNP) es proporcional al consumo de sustrato (pNPP), se eligió la concentración de PTP1B a utilizar en los ensayos siguientes de actividad y cinética enzimática. La concentración óptima de enzima purificada para los ensayos de actividad fue de 66 nM.

5.1.3.2 Determinación de la concentración de sustrato

Una vez determinada la concentración de enzima, se evaluaron ocho concentraciones distintas de sustrato (pNPP) entre 0.1 mM y 0.8 mM en incrementos de 0.1 mM. Todo en tiempos de 15, 20, 25 y 30 minutos. Al igual que las concentraciones de enzima, las concentraciones de pNPP se definieron con base en las concentraciones utilizadas en estudios anteriores [38,203,204,209]. La concentración óptima de sustrato fue de 0.25 mM en un tiempo de 15 minutos. Esta concentración corresponde a la concentración de pNPP en donde aún se conserva la linealidad entre la formación de producto y consumo de sustrato (hasta 0.35 mM de pNPP), antes de alcanzar la velocidad máxima de la reacción (alcanzada a partir de 0.55 mM de pNPP).

5.1.3.3 Compuestos evaluados en los ensayos de inhibición enzimática

Los ensayos de inhibición enzimática se llevaron a cabo con dos grupos de compuestos. El primer grupo incluye algunos de los compuestos con efecto inhibitorio conocido sobre la PTP1B. Estos son: ácido ursólico (AU), ácido clorogénico (AC), y suramina (SUR). El segundo grupo de compuestos está conformado por el ácido glicirretínico (AG) o ácido 18 β -glicirretínico (16), y 16 compuestos de indol y pirazol derivados de este ⁷. El AG a partir del cual se sintetizaron sus derivados se obtuvo comercialmente (Sigma–Aldrich). La síntesis de los compuestos derivados del AG se hizo con base en el procedimiento descrito por De-la Cruz-Martínez et al. [166]. El nombre de cada compuesto (indicado en el Cuadro 8) corresponde al nombre asignado por quien los sintetizó, el Dr. Francisco Cortés-Benítez del Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Xochimilco, Ciudad de México, México [166]. Por convención y referencia metodológica general, los derivados del ácido glicirretínico, incluyendo la carbenoxolona, fueron numerados del 1 al 17 (AG₁₋₁₇), exceptuando el AG, que fue asignado como el compuesto número 16. El Cuadro 8, indica el número asignado y el nombre de cada uno de los compuestos derivados del ácido glicirretínico. La estructura de todos los compuestos evaluados (AU, AC, SUR, AG y sus derivados) se muestra más adelante en la Figura 16 (en la sección de resultados y discusión).

⁷ El nombre oficial del ácido glicirretínico (AG) según la IUPAC es ácido (2S,4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aS,12bR,14bR)-10-hidroxi-2,4a,6a,6b,9,9, 12a -Heptametil-13-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-icosahidropiceno- 2 -carboxilo. Los compuestos derivados del AG contienen anillos de indol sustituidos o grupos N-fenil-pirazol fusionados a su anillo A.

Cuadro 8. Nombre y número asignado a los compuestos derivados del AG₁₋₁₇

Número asignado	Nombre del compuesto
1	FC-1-47
2	CDB-2-24
3	CDB-2-30
4	FC-1-113
5	FC-1-109
6	FC-1-121
7	FC-1-114
8	DLC-3-7
9	FC-1-122
10	FC-1-124
11	FC-1-115
12	FC-1-119
13	FC-1-116
14	FC-1-118
15	FC-1-123
16	Ácido glicirretínico (AG)
17	Carbenoxolona

5.1.3.4 Determinación de IC₅₀

Los ensayos de determinación de IC₅₀ fueron realizados con los dos grupos de compuestos mencionados anteriormente, es decir, aquellos con efecto inhibitorio conocido (AU, AC y SUR) y aquellos con efecto inhibitorio desconocido (derivados del AG). Cada compuesto fue añadido en concentraciones crecientes en las condiciones óptimas previamente establecidas de volumen, pH, concentración de enzima y sustrato, temperatura y tiempo de incubación. Las concentraciones de AU (diez concentraciones entre 5.0 µM y 50 µM, en incrementos de 5.0 µM), AC (diez concentraciones entre 0.4 mM y 4.0 mM, en incrementos de 0.4 mM) y SUR (diez concentraciones entre 1.0 µM y 10 µM, en incrementos de 1.0 µM), fueron definidas con base en los valores de IC₅₀ reportados para cada uno de ellos en estudios anteriores [29,32,82,140,143,192,210–212]. Las concentraciones de los derivados del AG para determinar su IC₅₀, fueron probadas con base en los resultados del ensayo cualitativo preliminar. Inicialmente, la determinación de la IC₅₀ se realizó con AU, AC, SUR, y las tres formas de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅, *h*PTP1B₁₋₃₂₁ y *h*PTP1B₁₋₄₀₀). Posteriormente, la IC₅₀ de los derivados del AG se definió con la *h*PTP1B₁₋₄₀₀, que fue la única forma de la enzima inhibida por estos compuestos en la evaluación cualitativa preliminar.

5.1.3.5 Cinética enzimática

Los experimentos de cinética enzimática se llevaron a cabo en las mismas condiciones óptimas de ensayo descritas anteriormente (pNPP 0.25 mM, PTP1B 66 nM, amortiguador Tris 50 mM, pH 6.8; incubación a 37 °C por 15 minutos). Inicialmente, se definieron los parámetros cinéticos para el AU, AC, SUR, y la forma larga de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₄₀₀). Con el fin de identificar diferencias en el mecanismo de inhibición asociadas con la región estructural de la PTP1B, se realizó un último ensayo de cinética enzimática con la forma corta (*h*PTP1B₁₋₂₈₅) y larga (*h*PTP1B₁₋₄₀₀) de la enzima, con AC. Los ensayos de cinética enzimática con los derivados del AG se llevaron a cabo con la *h*PTP1B₁₋₄₀₀. La determinación de los parámetros cinéticos de

los derivados del AG se realizó con aquellos derivados que mostraron mayor efecto inhibitorio en la determinación de la IC₅₀. Estos son: compuesto 2, 4, 5, 7, y 8.

En todos los ensayos de cinética enzimática, realizados por triplicado, se emplearon diferentes concentraciones de inhibidor (μM) y sustrato (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM de pNPP). Las distintas concentraciones de inhibidor fueron seleccionadas con base en los valores de IC₅₀ previamente determinados. El control negativo fue preparado con enzima y sustrato en ausencia de inhibidor. Las curvas de saturación fueron construidas con concentraciones fijas de inhibidor. Los análisis de los resultados fueron analizados con diferentes modelos matemáticos con la versión OriginPro 2018 (64-bit) SR1 (Northampton, MA, USA, <https://www.originlab.com>) utilizando las ecuaciones que se encuentran a continuación:

Inhibición competitiva

$$y = \frac{V_{max} (x)}{K_m \left(1 + \left(\frac{I}{K_i} \right) \right) + x}$$

En donde;

V_{max} = velocidad máxima

x = concentración de sustrato

I = concentración de inhibidor

K_m = constante de Michaelis-Menten

K_i = constante de inhibición

Inhibición no competitiva

$$y = \frac{V_{max} (x)}{\left(1 + \left(\frac{I}{K_i} \right) \right) \times (K_m + x)}$$

Las variables se describen en el modelo anterior (inhibición competitiva).

Inhibición acompetitiva

$$y = \frac{V_{max} (x)}{x + (K_m / (1 + I / K_i))}$$

Las variables se describen en el modelo anterior (inhibición competitiva).

Inhibición mixta

$$y = \frac{V_{max} (x) / ((1 + I) / (\alpha K_i))}{x + K_m ((1 + I) / K_i) / (1 + I) / (\alpha K_i)}$$

En donde;

α = es el cociente que resulta de V_{max} sin inhibidor/ V_{max} con inhibidor

5.1.3.6 Ensayos preliminares de competencia enzimática

Con base en los valores de IC_{50} de los compuestos evaluados, se realizaron ensayos de competencia enzimática con la forma de la enzima que incluye la región intrínsecamente desordenada ($hPTP1B_{1-400}$). Esto, para determinar si el efecto inhibitorio observado en los ensayos cinéticos anteriores está influenciado por la unión del inhibidor con el sitio activo y/o la región reguladora de la enzima. Se seleccionaron diferentes compuestos por cada tipo de inhibición (determinado en los ensayos de cinética enzimática), y fueron contrastados así: (i) inhibidor mixto (AU) – inhibidor competitivo (AC); (ii) inhibidor mixto (AU) – inhibidor acompetitivo (compuesto 7). Las concentraciones de inhibidor fueron definidas a partir de su IC_{50} . Así, el 100 % de la concentración de un inhibidor equivalía a su IC_{50} (control positivo), y el 0 % de concentración del segundo inhibidor correspondía a la ausencia de este (control negativo). A partir del valor de IC_{50} , se hicieron 10 diluciones del inhibidor: 10 concentraciones en orden creciente para un inhibidor, y 10 concentraciones en orden decreciente del segundo inhibidor. De esta manera, a la concentración 0 % de un inhibidor, le correspondía el 100 % del segundo inhibidor.

El siguiente esquema (Figura 12) resume el proceso experimental *in vitro* desarrollado a partir de la construcción del sistema de expresión hasta los ensayos enzimáticos realizados con las tres formas de la $hPTP1B$ ($hPTP1B_{1-285}$, $hPTP1B_{1-321}$, y $hPTP1B_{1-400}$):

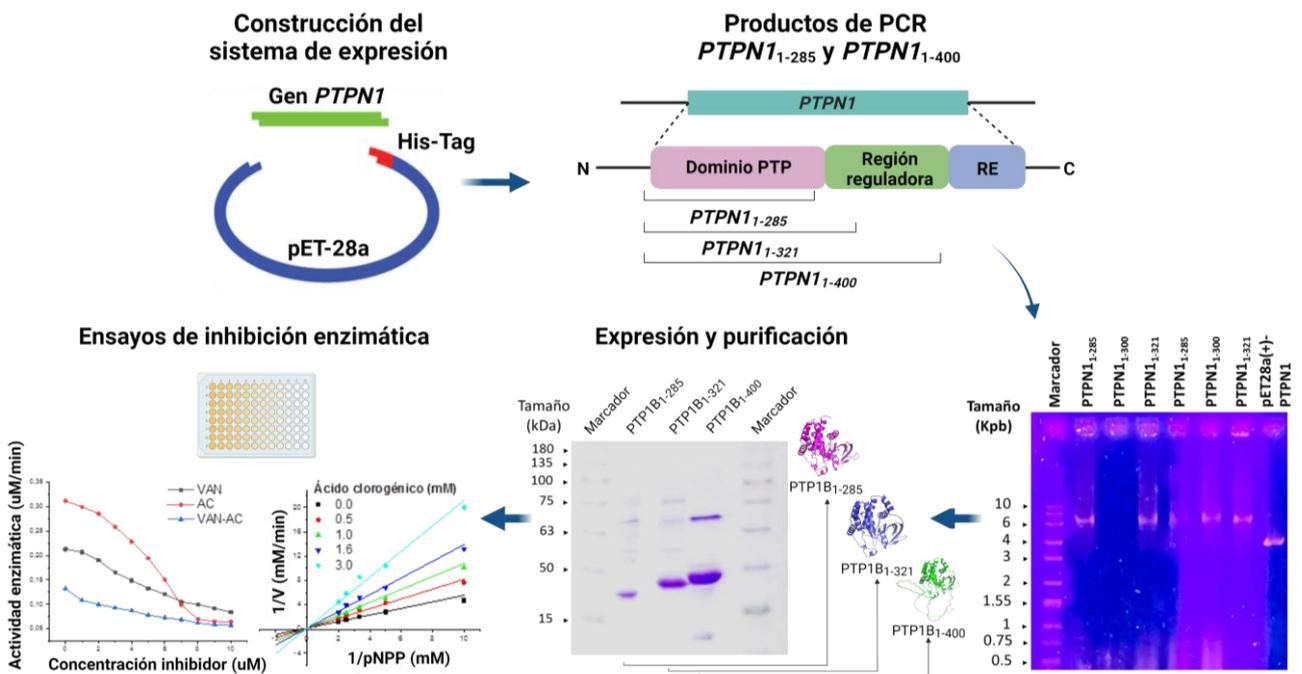


Figura 12. Esquema del diseño experimental de los ensayos *in vitro*. Una vez construidos los sistemas de expresión de los genes codificantes para las tres formas de la $hPTP1B$ ($hPTP1B_{1-285}$, $hPTP1B_{1-321}$ y $hPTP1B_{1-400}$), éstos fueron amplificados por PCR y secuenciados. La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se hizo con las muestras de DNA secuenciadas completamente. Los ensayos de inhibición enzimática se realizaron en principio, con las tres proteínas recombinantes purificadas, y luego, únicamente con la forma larga ($hPTP1B_{1-400}$).

5.2 Estudio in silico

5.2.1 Cribado virtual basado en estructura

Con el fin de identificar potenciales inhibidores de la PTP1B y predecir el sitio de interacción proteína-ligando de mayor afinidad, se realizó un cribado virtual basado en estructura definiendo el espacio de búsqueda al sitio alostérico del dominio catalítico de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀). En principio, se creó una biblioteca de compuestos para acoplarlos con la forma holo del dominio catalítico de la enzima. Cabe mencionar que la forma holo de la PTP1B₁₋₃₀₀ utilizada para el cribado virtual y acoplamiento molecular, corresponde a una de las estructuras que han sido resueltas (y depositadas en la base de datos del PDB; <https://www.rcsb.org/>) a partir de la cocrystalización de la enzima con ligandos interactuantes con el sitio alostérico de la misma (PDB ID: 1T49) [38].

Los compuestos con potencial efecto inhibitor sobre la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀) fueron elegidos de la base de datos Zinc (<http://zinc15.docking.org>), con base en cinco criterios de inclusión: 1. Origen biogénico, 2. Aprobación por la FDA, 3. Haber alcanzado la etapa de ensayos clínicos, 4. Disponibilidad comercial, y 5. Cumplimiento con el estándar de reactividad. El acoplamiento molecular, cuyo procedimiento se detallará en la sección siguiente, se realizó con el programa idock versión 2.2.3, extendiendo el espacio de búsqueda sobre el sitio alostérico. La Figura 13 resume los pasos metodológicos utilizados para el cribado virtual y acoplamiento molecular.

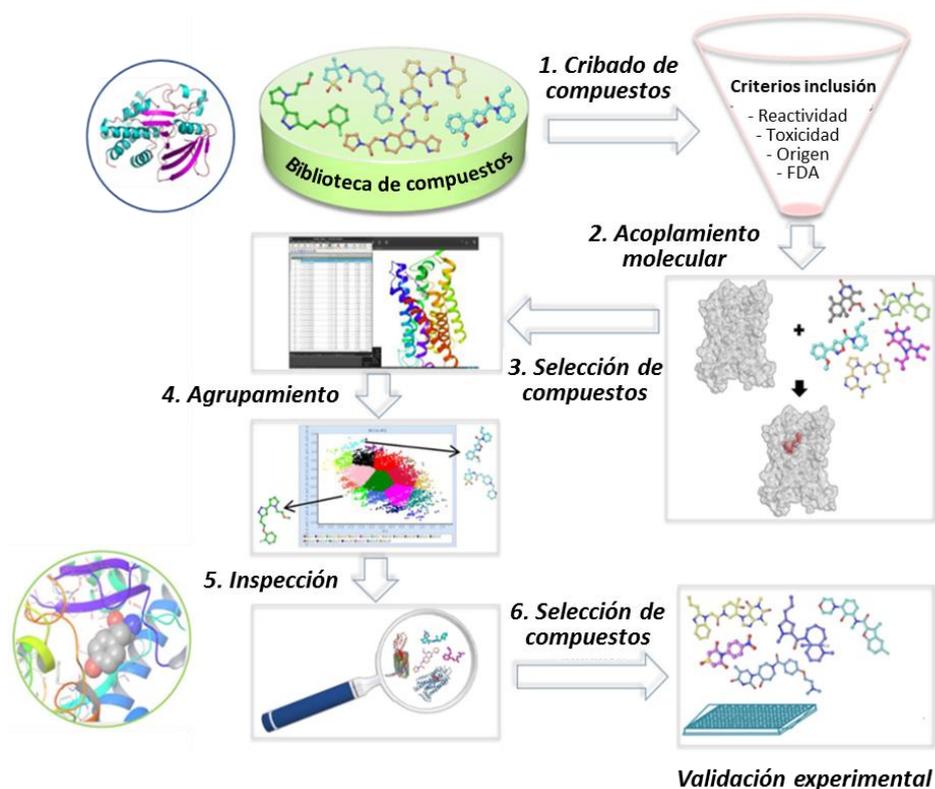


Figura 13. Proceso del cribado virtual basado en estructura y acoplamiento molecular. Modificado de: Basith et al., 2018. Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design [213].

5.2.2 Modelado de la región C-terminal intrínsecamente desordenada de la PTP1B (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀)

El modelado de la región C-terminal intrínsecamente desordenada de la PTP1B (C-PTP1B) se hizo, en primer lugar, para predecir la disposición espacial de la estructura completa de la enzima en su forma apo (sin ligando), conformada por el dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀); o N-PTP1B, y la región reguladora C-terminal intrínsecamente desordenada (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀); o C-PTP1B. En segundo lugar, con base en la conformación estructural predicha de la proteína completa (PTP1B₁₋₄₀₀) a partir del modelamiento de la región C-PTP1B, se realizó acoplamiento molecular con la forma apo de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados en los ensayos *in vitro* de determinación de IC₅₀. De esta manera, fue posible predecir la conformación estructural de la enzima completa (PTP1B₁₋₄₀₀) en su forma holo. Así como también, calcular el valor teórico de la energía de unión (kcal/mol) de cada uno de los ligandos ensayados *in vitro*. El modelo estructural completo de la enzima (PTP1B₁₋₄₀₀) que incluye la región intrínsecamente desordenada (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀) se obtuvo de la base de datos de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18031>) [214,215].

5.2.3 Dinámica molecular de la forma larga de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀)

La simulación de dinámica molecular (SDM) se hizo a partir del modelo de la forma larga de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀) que incluye la región intrínsecamente desordenada (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀). Esto, con el fin de estimar el comportamiento global de la forma más cercana a la forma fisiológica de la enzima en su estructura apo (sin ligando), y evaluar su estabilidad en el tiempo (200 ns).

Para la simulación de dinámica molecular de la PTP1B₁₋₄₀₀, se utilizó el programa AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*, por sus siglas en inglés) [216,217], el cual ha sido diseñado para simulaciones en sistemas de cómputo de alto desempeño. Por esta razón, las simulaciones de dinámica molecular se procesaron en el nuevo equipo de supercómputo (NES) de la UNAM, Mitzli. El programa AMBER integra las ecuaciones de movimiento de Newton bajo un campo de potencial empírico, permitiendo la vibración y desplazamiento de todos los átomos de un sistema por un periodo de tiempo definido. Este campo de potencial aproxima las energías de los sistemas moleculares representando los átomos como esferas cargadas y los enlaces como resortes con propiedades especiales. Dentro del programa AMBER, los sistemas se han parametrizado para predecir propiedades estadísticas de los sistemas fisicoquímicos a evaluar, así como también, para brindar información detallada de las interacciones del sistema objeto de estudio, y estimar la contribución energética de los parámetros o factores definidos para el sistema, mismos que pueden ser comparados con datos experimentales. En general, la parametrización aporta información sobre la conformación y estabilidad de los sistemas en solución; en este caso, de la PTP1B.

Las coordenadas del modelo estructural de la PTP1B₁₋₄₀₀ generado por AlphaFold fueron procesadas con la *suite* o conjunto de programas de AMBER. El procedimiento para llevar a cabo la SDM de la PTP1B₁₋₄₀₀ (que corresponde a nuestro sistema) incluyó los siguientes pasos: 1) preparación del archivo pdb para hacerlo compatible con AMBER, específicamente con el módulo LEaP de AmberTools22. Para esto se utilizó el programa *pdb4amber* [217–221]; 2) neutralización del sistema, añadiendo contraiones de sodio (Na⁺); y 3) solvatación con moléculas de agua explícitas empleando el modelo hídrico TIP3P [222]. La caja de solvatación (octaédrica) fue

construida a 12 Å de distancia de la superficie de la proteína. La SDM se llevó a cabo a 1 atm de presión y 298 K de temperatura, mantenidas con el barostato y termostato Berendsen, utilizando condiciones de frontera periódicas y suma de Ewald de malla de partículas (espaciado de cuadrícula de 1 Å) para tratar interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de 10 Å para calcular interacciones directas. Se utilizó el algoritmo SHAKE (comúnmente utilizado en simulaciones moleculares para imponer restricciones holonómicas generales) [223] para satisfacer las restricciones de enlace, permitiendo un paso de tiempo de 2 fs. Esto permite integrar las ecuaciones de Newton, tal como se recomienda en AMBER [217,220,224,225]. El campo de fuerza empleado fue Amber f99SB [221,226,227]. Todos los cálculos se realizaron en AMBER (pmemd.cuda) con aceleración de unidad de procesamiento gráfico (GPU, Tesla V100) [224,228].

El procedimiento general de la SDM comprendió los siguientes pasos: minimización de la estructura inicial, calentamiento a 298 K durante 50 ps, equilibrio a volumen constante durante 50 ps, y equilibrio a presión constante durante 500 ps. Se realizaron tres SDM independientes de 200 ns. Los *frames* fueron guardados a intervalos de 100 ps para su posterior análisis.

5.2.4 Acoplamiento y reconocimiento molecular (*docking*)

El acoplamiento molecular se realizó con el modelo la forma apo de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados en los ensayos *in vitro* de determinación de IC₅₀. El procedimiento general del acoplamiento o *docking* molecular consiste en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomos que participa en la interacción proteína-ligando. El espacio de análisis se delimitó en una caja de 150 x 150 x 150 Å³. Esta caja, localizada en el sitio alostérico de la enzima, fue construida en el programa idock versión 2.2.3 [229], el cual fue empleado para el proceso de acoplamiento, su análisis, y fue ejecutado sobre el sistema operativo UNIX en el equipo de supercómputo de la UNAM (Miztli). El proceso de *docking* se realizó con el algoritmo genético Lamarckiano (LGA), utilizando los parámetros que sugiere el programa, a excepción de los siguientes: número de corridas, el cual se aumentó a 100; tamaño de población de 150; número máximo de evaluaciones de 2500,000; y número máximo de generaciones de 27,000.

La Figura 14 resume los pasos del estudio *in silico* que comprenden el modelamiento, la dinámica y el acoplamiento molecular de la región C-terminal de la PTP1B.

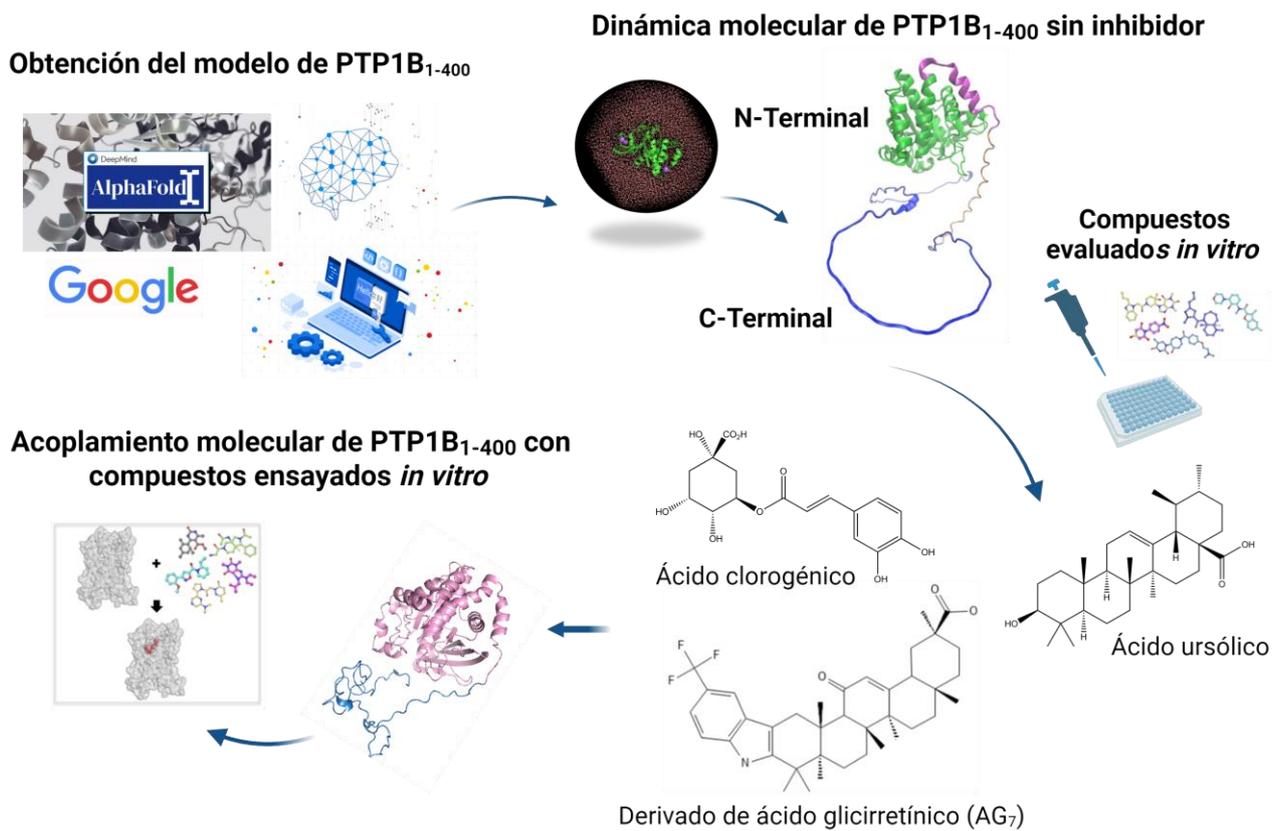


Figura 14. Procedimiento *in silico* realizado a partir del modelamiento de la región C-PTP1B. Después de obtener el modelo completo de la PTP1B que incluye la región C-terminal intrínsecamente desordenada, se hizo una simulación de dinámica molecular con la forma apo de la enzima, y finalmente el acoplamiento molecular con la forma PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados *in vitro* en los ensayos de IC₅₀.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Sección experimental

6.1.1 Amplificación por PCR de las construcciones que codifican para las tres formas de la hPTP1B

Para observar el resultado de la amplificación por PCR de las tres copias del gen *PTPN1* (por duplicado), se realizó un gel de agarosa y las muestras se separaron por electroforesis. La Figura 15, muestra el resultado de la amplificación y el tamaño de cada una de estas.

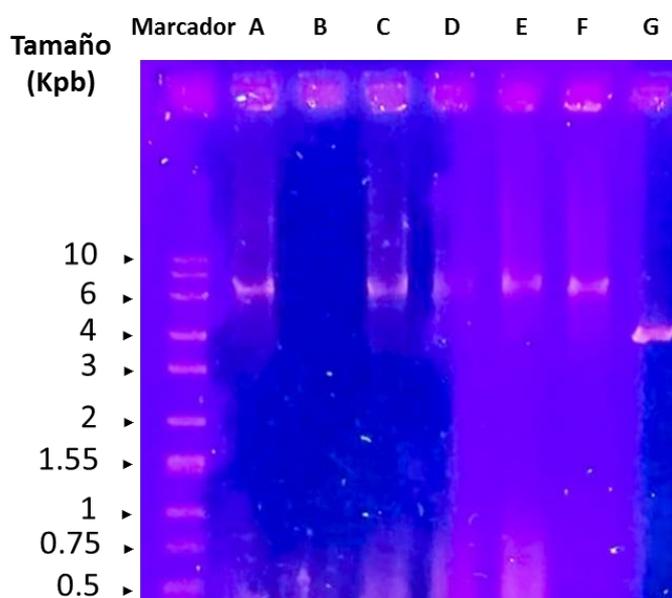


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. Bandas A y D: *PTPN1*₁₋₂₈₅. Bandas B y E: *PTPN1*₁₋₃₀₀. Bandas C y F: *PTPN1*₁₋₃₂₁. Banda G: control positivo: plásmido pET-28a(+)-*PTPN1*.

El tamaño de las copias del gen de la hPTP1B corresponde aproximadamente a 6 kpb. Esto, teniendo en cuenta el patrón de bandas, y que el tamaño del plásmido pET-28a(+)-*PTPN1* es de 6569 pb (pET-28a(+): 5369 pb; *PTPN1*: 1200 pb). Para corroborar la presencia e integridad del plásmido (pET-28a(+)-*PTPN1*) y de la secuencia completa del gen *PTPN1*, y al mismo tiempo determinar que la diferencia de tamaño entre la construcción completa (pET-28a(+)-*PTPN1*) (Figura 15, banda G) y las demás copias del gen (Figura 15, bandas A-F) se debía a la forma del DNA (circular y lineal, respectivamente), se realizó una segunda electroforesis. Esta vez empleando enzimas de restricción (*Bam*HI, *Hind*III) para linealizar el plásmido. Después de la digestión del plásmido, el patrón de bandas del gel de electroforesis evidencia que su tamaño es el mismo que el de los productos de PCR, es decir, 6 kDa.

6.1.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

El rendimiento de las tres formas purificadas de la *h*PTP1B fue de 32, 40, y 56 mg/L de medio de cultivo para *h*PTP1B₁₋₂₈₅, *h*PTP1B₁₋₃₂₁ y *h*PTP1B₁₋₄₀₀, respectivamente. La Figura 16, muestra las bandas correspondientes a cada una de las proteínas purificadas. El patrón de bandas estima que el peso molecular de cada una de las proteínas fue de ~33 kDa para *h*PTP1B₁₋₂₈₅, ~37 kDa para *h*PTP1B₁₋₃₂₁, y ~45 kDa para *h*PTP1B₁₋₄₀₀. Estos pesos moleculares coinciden con los pesos moleculares teóricos esperados para las tres construcciones de la enzima, puesto que el peso molecular teórico de *h*PTP1B₁₋₂₈₅ es 33.1 kDa, de *h*PTP1B₁₋₃₂₁ es 37.3 kDa, y de *h*PTP1B₁₋₄₀₀ es 45.9 kDa.

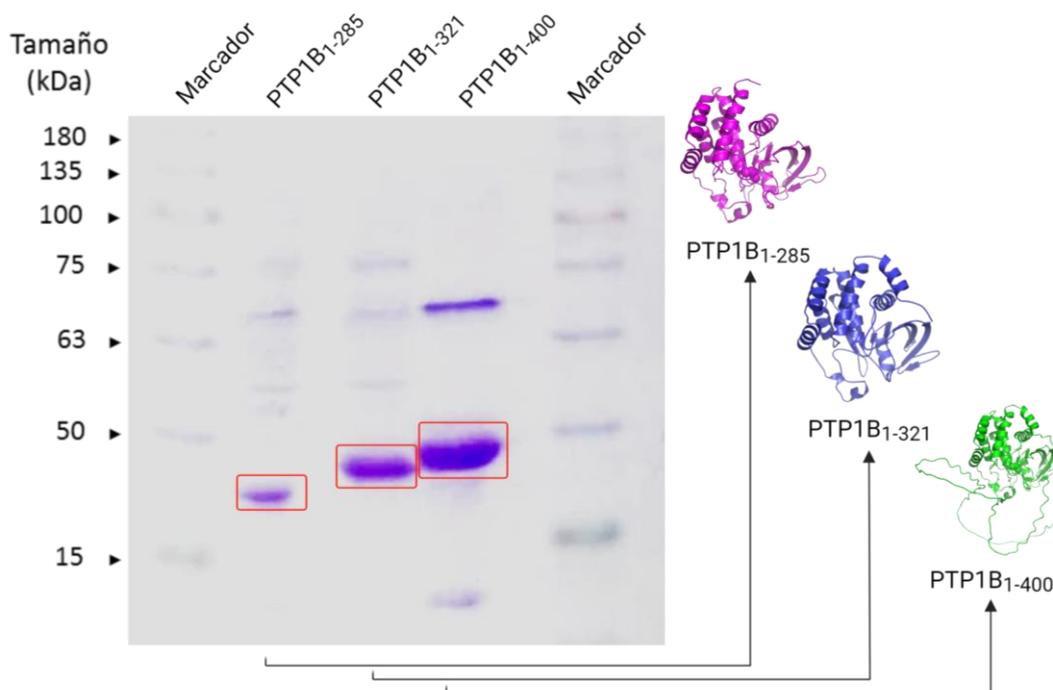


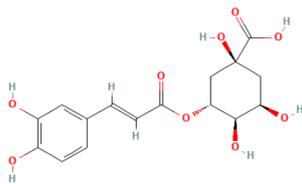
Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas *h*PTP1B recombinantes. Los carriles de los extremos corresponden al patrón de bandas del marcador de peso molecular. Las bandas correspondientes a las tres construcciones de *h*PTP1B: *h*PTP1B₁₋₂₈₅ (~33 kDa), *h*PTP1B₁₋₃₂₁ (~37 kDa), y *h*PTP1B₁₋₄₀₀ (~45 kDa), se indican en recuadros en el segundo, tercer y cuarto carril, respectivamente. A la derecha del gel se muestran las representaciones de la estructura 3D de cada una de las construcciones de *h*PTP1B.

6.1.3 Actividad enzimática

6.1.3.1 Compuestos evaluados

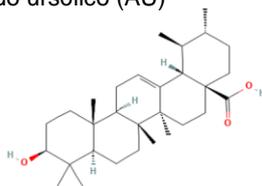
En la Figura 17 se muestra la estructura y peso molecular de todos los compuestos evaluados. Esto incluye los compuestos con efecto inhibitorio conocido (AC, AU y SUR) y los derivados del AG₁₋₁₇, ensayados por primera vez. Los compuestos derivados del ácido glicirretínico fueron sintetizados con base en el procedimiento descrito por De-la Cruz-Martínez et al. [166]. El nombre y número asignado a cada derivado del AG (AG₁₋₁₇) se muestra en el Cuadro 8 (en la sección de estrategia experimental y métodos).

Ácido clorogénico (AC)



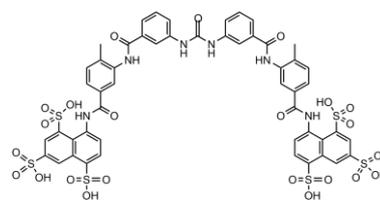
M = 354.3 g/mol

Ácido ursólico (AU)



M = 456.7 g/mol

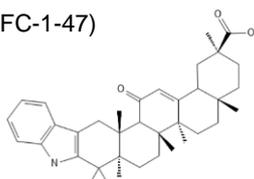
Suramina (SUR)



M = 1297.3 g/mol

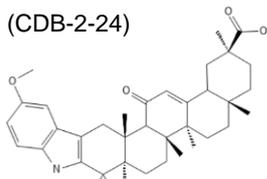
a)

1 (FC-1-47)



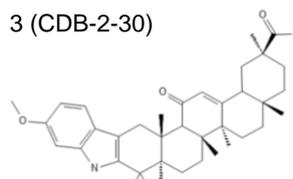
M = 541.4 g/mol

2 (CDB-2-24)



M = 571.37 g/mol

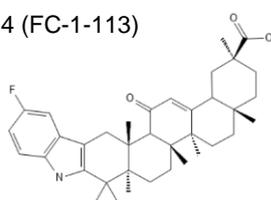
3 (CDB-2-30)



M = 571.37 g/mol

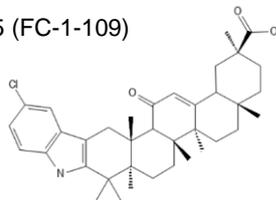
b)

4 (FC-1-113)



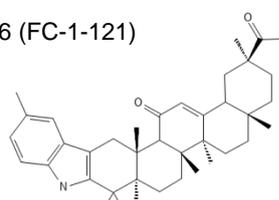
M = 559.35 g/mol

5 (FC-1-109)



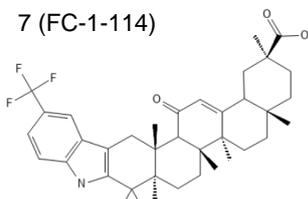
M = 575.32 g/mol

6 (FC-1-121)



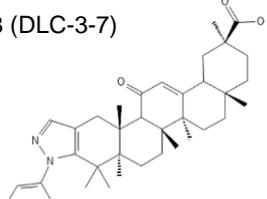
M = 555.37 g/mol

7 (FC-1-114)



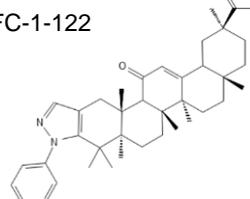
M = 609.34 g/mol

8 (DLC-3-7)



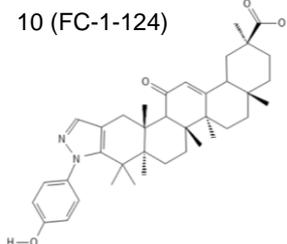
M = 568.4 g/mol

9 FC-1-122



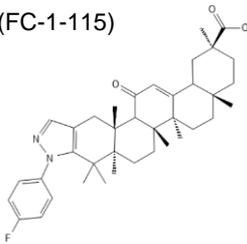
M = 598.4 g/mol

10 (FC-1-124)



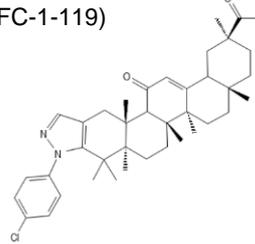
M = 584.4 g/mol

11 (FC-1-115)



M = 586.4 g/mol

12 (FC-1-119)



M = 602.3 g/mol

Figura 17. Compuestos evaluados en ensayos de inhibición enzimática. a) Primer grupo de compuestos con efecto inhibitorio conocido. b) Segundo grupo de compuestos derivados del AG₁₋₁₇ con efecto inhibitorio desconocido.

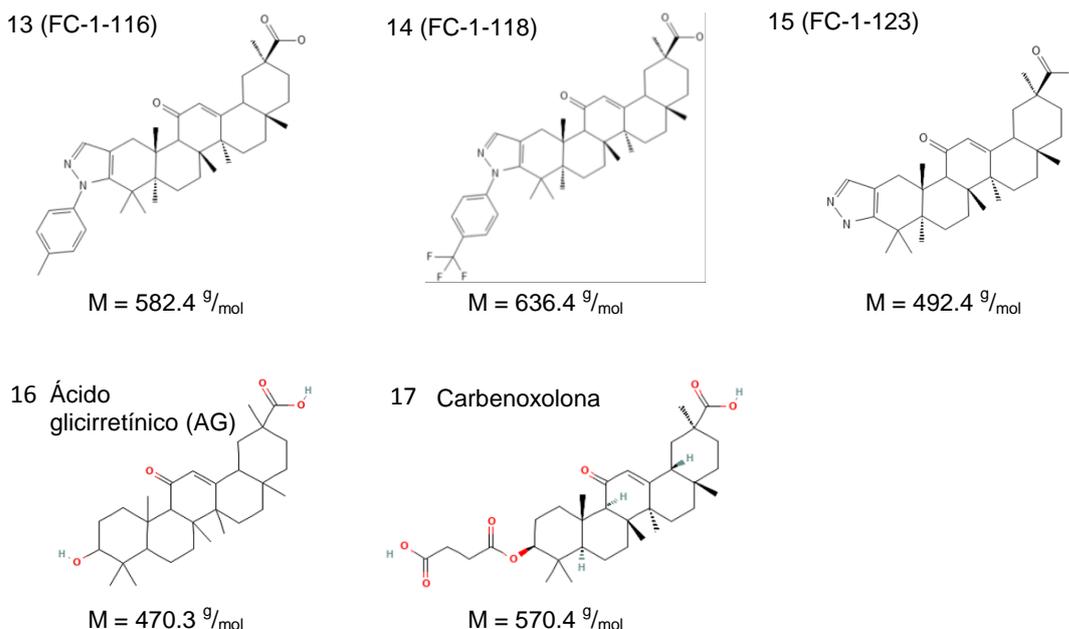


Figura 17. Compuestos evaluados en ensayos de inhibición enzimática (continuación).

6.1.4 Evaluación cualitativa de la actividad inhibitoria de los compuestos derivados del ácido glicirretínico

La actividad inhibitoria de los derivados del ácido glicirretínico (AG) fue evaluada de forma preliminar para identificar el efecto inhibitorio de estos compuestos sobre las tres formas de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₂₈₅, *h*PTP1B₁₋₃₂₁ y *h*PTP1B₁₋₄₀₀). Esto, teniendo en cuenta que el efecto de la mayoría de los derivados del AG sobre la actividad de la enzima era desconocido. Después de evaluar el efecto inhibitorio de los derivados del AG sobre las tres formas de la *h*PTP1B, los siguientes ensayos de IC₅₀ se realizaron con la *h*PTP1B₁₋₄₀₀, que fue la única forma de la enzima cuya actividad fue inhibida por estos compuestos (Figuras 18 y 19). El efecto inhibitorio de los derivados del AG fue cuantificado en términos de porcentaje de actividad de la enzima. La evaluación de los derivados del AG y los siguientes ensayos de actividad enzimática se realizaron en las condiciones óptimas establecidas previamente, esto es: volumen total de 100 μL, amortiguador Tris 50 mM, pH 6.8, temperatura y tiempo de incubación de 37 °C y 15 minutos, respectivamente

Inicialmente, se realizó un ensayo preliminar único con todos los compuestos derivados del ácido glicirretínico (AG₁₋₁₇) y las tres formas de la enzima. La Figura 18, muestra el efecto inhibitorio de los compuestos AG₁₋₁₇ sobre el porcentaje de actividad de las proteínas recombinantes *h*PTP1B₁₋₂₈₅, *h*PTP1B₁₋₃₂₁, y *h*PTP1B₁₋₄₀₀. La evaluación preliminar y los ensayos siguientes de IC₅₀ y cinética enzimática con los derivados del AG y *h*PTP1B₁₋₃₂₁ fueron discontinuados por dos razones. La primera razón está asociada con la similitud del efecto inhibitorio de los derivados del AG sobre las formas *h*PTP1B₁₋₂₈₅ y *h*PTP1B₁₋₃₂₁. De un lado, ninguna de las dos formas de la enzima fue inhibida considerablemente por estos compuestos. El mayor efecto inhibitorio fue producido por el compuesto 11 (AG₁₁) en *h*PTP1B₁₋₂₈₅ (Figura 18a) y *h*PTP1B₁₋₃₂₁ (Figura 18b), con un porcentaje de inhibición de 24% y 22%, respectivamente. En menor proporción, el compuesto AG₅ inhibió la *h*PTP1B₁₋₂₈₅ en un 6 % (Figura 18a), y el compuesto 13 inhibió la *h*PTP1B₁₋₃₂₁ en un 3 % (Figura 18b). La mayoría de los compuestos (2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 17) presentaron efecto inhibitorio nulo (0 %) para las dos formas. De otro

lado, las formas $hPTP1B_{1-285}$ y $hPTP1B_{1-321}$ responden de manera muy similar al efecto de los derivados del AG. Con un coeficiente de correlación $r = 0.8$, la máxima diferencia del porcentaje de inhibición entre $hPTP1B_{1-285}$ y $hPTP1B_{1-321}$ fue de 8% (producida por los compuestos 3 y 13). Para la mayoría de los compuestos (2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 17) la diferencia en el porcentaje de inhibición entre ambas formas de la enzima fue nula (igual a cero) ($r = 0.87$) (Figura 18a y 18b). La segunda razón por la cual se descontinuaron los ensayos con la forma $hPTP1B_{1-321}$, está relacionada con la inestabilidad en solución de esta forma de la proteína, puesto que pierde actividad rápidamente.

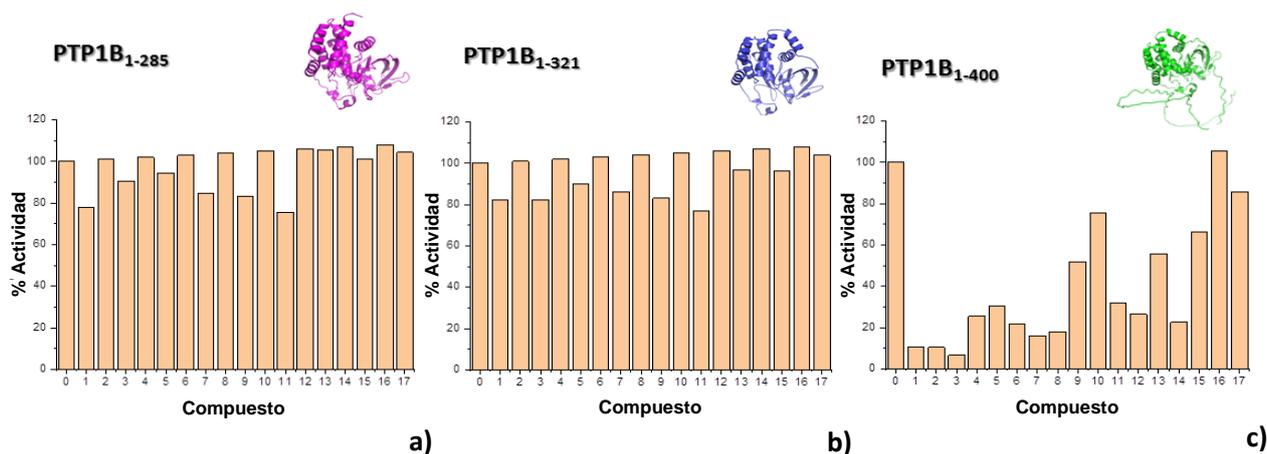


Figura 18. Efecto inhibitorio de los compuestos derivados del ácido glicirretínico sobre el porcentaje de actividad de $hPTP1B_{1-285}$, $hPTP1B_{1-321}$ y $hPTP1B_{1-400}$. Evaluación cualitativa de los 17 compuestos derivados del ácido glicirretínico y las tres construcciones de $hPTP1B$: **a)** $hPTP1B_{1-285}$, **b)** $hPTP1B_{1-321}$, y **c)** $hPTP1B_{1-400}$. El “compuesto 0” corresponde al control negativo, para el cual se midió la actividad enzimática en ausencia de los derivados del AG. Los resultados de este ensayo preliminar fueron obtenidos de un experimento único.

Con base en la similitud de la respuesta observada en $hPTP1B_{1-285}$ y $hPTP1B_{1-321}$ (Figura 18a y 18b) por efecto de los compuestos evaluados (AG₁₋₁₇), y teniendo en cuenta que la forma $hPTP1B_{1-321}$ fue descartada por las razones antes descritas; se realizó un último ensayo cualitativo (por triplicado) con las formas $hPTP1B_{1-285}$ y $hPTP1B_{1-400}$, para corroborar la diferencia del efecto inhibitorio observado entre estas dos formas de la enzima.

La Figura 19 muestra la diferencia del efecto de los 17 compuestos evaluados sobre el porcentaje de actividad de la $hPTP1B_{1-285}$ y $hPTP1B_{1-400}$. La actividad de la $hPTP1B_{1-285}$ se mantuvo entre 84% - 97%, lo cual sugiere que el efecto inhibitorio de los compuestos sobre esta forma de la enzima es poco o casi nulo. En promedio, la mayoría de los compuestos (2, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17) inhibieron la $hPTP1B_{1-285}$ en un 3%. El mayor efecto inhibitorio de esta forma de la enzima fue producido por el compuesto 1, con un porcentaje de inhibición de 16%. En contraste con lo observado con la $hPTP1B_{1-285}$, la inhibición de la $hPTP1B_{1-400}$ por efecto de los 17 compuestos es bastante evidente. Los compuestos con mayor efecto inhibitorio sobre esta forma de la enzima fueron los compuestos 1, 2 y 3, con un 92%, 93% y 96%, respectivamente. A estos le siguen los compuestos 7, 8, 14 o 6, 4, 12 y 5, que inhibieron la actividad de la enzima en un 87%, 84%, 82%, 79%, 77% y 74%, respectivamente.

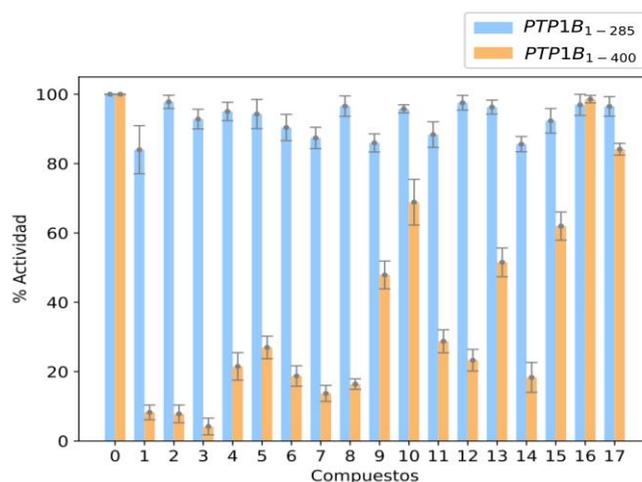


Figura 19. Efecto inhibitorio de los compuestos derivados del ácido glicirretínico sobre el porcentaje de actividad de hPTP1B₁₋₂₈₅ y hPTP1B₁₋₄₀₀. En promedio, la mayoría de los compuestos (2, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17) inhibieron la hPTP1B₁₋₂₈₅ en un 3 %, mientras que la hPTP1B₁₋₄₀₀ alcanzó porcentajes de inhibición mayores al 90 % por efecto de los compuestos 1, 2 y 3. La evaluación con las formas hPTP1B₁₋₂₈₅ y hPTP1B₁₋₄₀₀ fue realizada en tres experimentos independientes. El “compuesto 0” corresponde al control negativo, para el cual se midió la actividad enzimática en ausencia de los derivados del AG.

La diferencia observada en el porcentaje de inhibición por efecto de los compuestos evaluados en ambas formas de la proteína, sugiere que la región reguladora no catalítica de la enzima desempeña una función importante en su actividad inhibitoria. Con base en esta evidencia, es posible sugerir que la pérdida de actividad de la hPTP1B₁₋₄₀₀ por efecto de los compuestos derivados del ácido glicirretínico, responde a un mecanismo de inhibición alostérica que involucra la región C-terminal intrínsecamente desestructurada de la enzima.

6.1.5 Determinación de IC₅₀

Inicialmente, los ensayos de IC₅₀ se realizaron para identificar diferencias en la actividad de las tres formas de la hPTP1B (hPTP1B₁₋₂₈₅, hPTP1B₁₋₃₂₁, y hPTP1B₁₋₄₀₀) por acción de los compuestos con efecto inhibitorio conocido sobre la enzima. Estos compuestos son: ácido ursólico (AU), ácido clorogénico (AC), y suramina (SUR). A continuación, la Figura 20 y el Cuadro 9 presentan el efecto inhibitorio del AU, AC, y SUR sobre las tres construcciones de la hPTP1B (hPTP1B₁₋₂₈₅, hPTP1B₁₋₃₂₁, y hPTP1B₁₋₄₀₀). La inhibición enzimática fue cuantificada en términos de porcentaje de inhibición (Figura 20) e IC₅₀ (Cuadro 9) para cada una de las formas de la enzima.

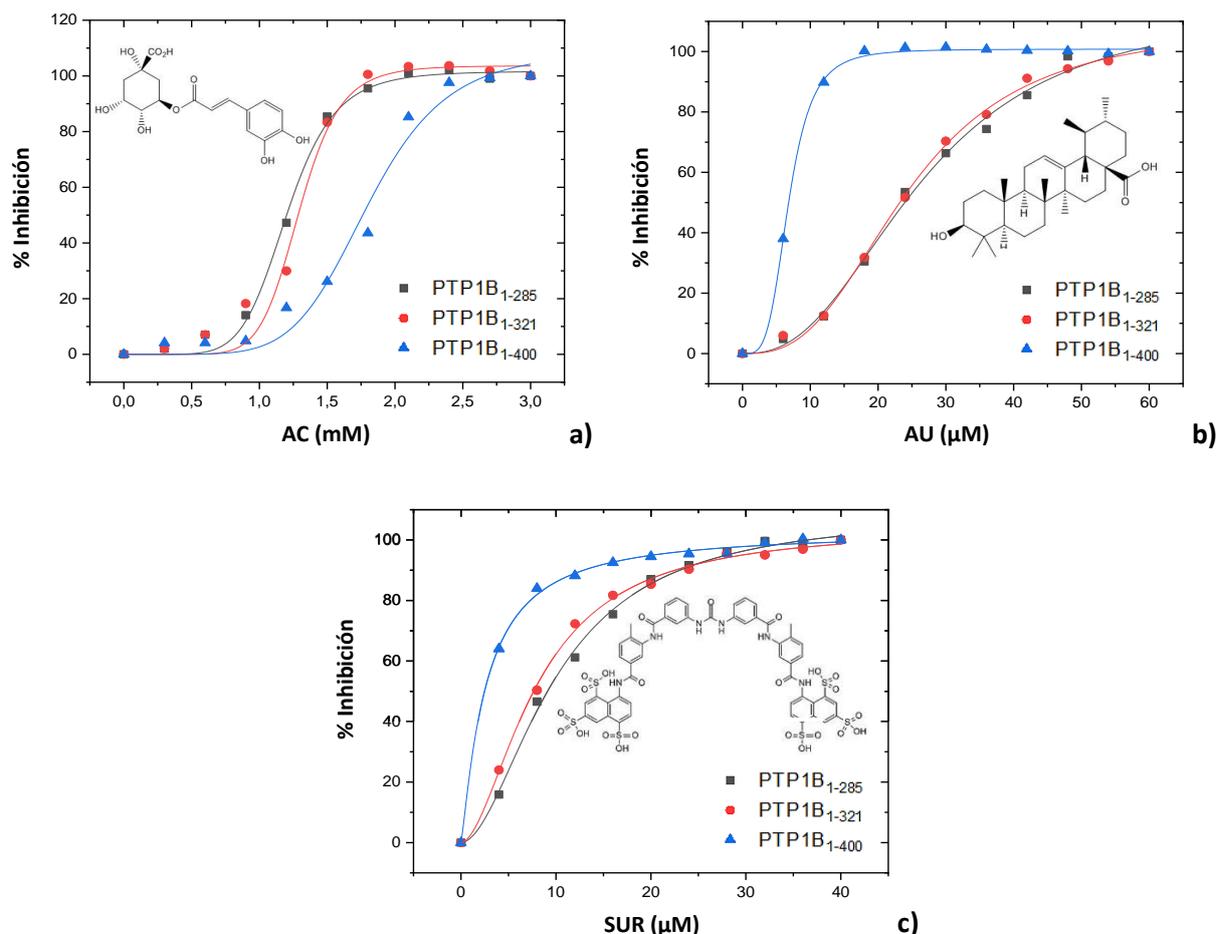


Figura 20. Efecto inhibitorio del AC, AU y SUR sobre las tres construcciones de la hPTP1B. Porcentaje de inhibición de los compuestos con efecto inhibitorio conocido sobre la PTP1B. **a)** Ácido clorogénico. **b)** Ácido ursólico. **c)** Suramina. La evaluación del efecto inhibitorio de cada compuesto sobre las tres formas de la enzima se realizó en dos experimentos independientes.

Cuadro 9. IC₅₀ de distintos inhibidores en las tres construcciones de hPTP1B

Enzima	IC ₅₀ ± Error estándar *		
	Inhibidor		
	AC (μM)	AU (μM)	SUR (μM)
<i>hPTP1B</i> ₁₋₂₈₅	1200 ± 10	26.59 ± 1.46	9.95 ± 0.39
<i>hPTP1B</i> ₁₋₃₂₁	1290 ± 30	24.57 ± 0.66	8.00 ± 0.24
<i>hPTP1B</i> ₁₋₄₀₀	1800 ± 70	6.83 ± 0.07	2.59 ± 0.15

* Los valores de IC₅₀ y su error estándar fueron obtenidos de los experimentos de la Figura 20.

Los compuestos evaluados (AC, AU y SUR) en las tres formas de la enzima (*hPTP1B*₁₋₂₈₅, *hPTP1B*₁₋₃₂₁, y *hPTP1B*₁₋₄₀₀) han sido ampliamente utilizados como control positivo en diversos estudios de inhibición de la PTP1B [29,32,82,140,143,192,210–212]. El AU [32,166,230,231] y la SUR [29,166,210] han sido evaluados en la forma corta (*PTP1B*₁₋₃₂₁) y larga (*hPTP1B*₁₋₄₀₀) de la

enzima, mientras que el AC [83,191] ha sido ensayado únicamente en la forma corta (PTP1B₁₋₃₀₁ and PTP1B₁₋₃₂₁). En general, los datos del Cuadro 9 indican que la IC₅₀ de cada compuesto para las dos construcciones que representan la forma corta de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅ o *h*PTP1B₁₋₃₂₁) es semejante. Por ejemplo, la IC₅₀ del AU es de ~27 μM para la *h*PTP1B₁₋₂₈₅ y ~25 μM para la *h*PTP1B₁₋₃₂₁. Asimismo, la IC₅₀ de la SUR es de ~10 μM para la *h*PTP1B₁₋₂₈₅ y ~8 μM para la *h*PTP1B₁₋₃₂₁. En contraste, los valores de IC₅₀ de los tres compuestos evidencian diferencias entre la forma corta (*h*PTP1B₁₋₂₈₅ o *h*PTP1B₁₋₃₂₁) y larga de la enzima (*h*PTP1B₁₋₄₀₀). Exceptuando los valores de IC₅₀ del AC, que son similares para las tres formas de la enzima, los valores de IC₅₀ del AU y la SUR para la forma larga de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₄₀₀) son aproximadamente cuatro y tres veces más bajos que los valores de IC₅₀ de los mismos compuestos evaluados con la forma corta de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅ o *h*PTP1B₁₋₃₂₁).

Las diferencias de los valores de IC₅₀ entre la forma corta (*h*PTP1B₁₋₂₈₅ o *h*PTP1B₁₋₃₂₁) y larga (*h*PTP1B₁₋₄₀₀) de la *h*PTP1B para los tres compuestos ensayados (AC, AU y SUR), indican que la inhibición de la enzima está influenciada por la región estructural con la que el inhibidor interactúa. De este modo, la inhibición aumenta cuando se ensaya con la forma larga de la enzima (*h*PTP1B₁₋₄₀₀), que incluye el dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀) y la región reguladora C-terminal (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀). Por el contrario, la inhibición disminuye cuando se utiliza la forma corta de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅ o *h*PTP1B₁₋₃₂₁), que comprende únicamente el dominio catalítico. De modo similar a los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de los compuestos derivados del AG₁₋₁₇, el ensayo para determinar la IC₅₀ sugiere que la inhibición de la *h*PTP1B puede ocurrir en respuesta a un mecanismo de inhibición alostérica que implica la participación de la región reguladora C-terminal comprendida únicamente en la forma fisiológica de la enzima (*h*PTP1B₁₋₄₀₀).

Teniendo en cuenta los resultados de las evaluaciones preliminares con las tres formas de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅, *h*PTP1B₁₋₃₂₁, y *h*PTP1B₁₋₄₀₀), la determinación de la IC₅₀ de los 17 compuestos derivados del ácido glicirretínico (AG₁₋₁₇) se realizó únicamente con la forma de la proteína *h*PTP1B₁₋₄₀₀. A continuación, en la Figura 21 se muestran las curvas de IC₅₀ de cada uno de los compuestos AG₁₋₁₇ evaluados con *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

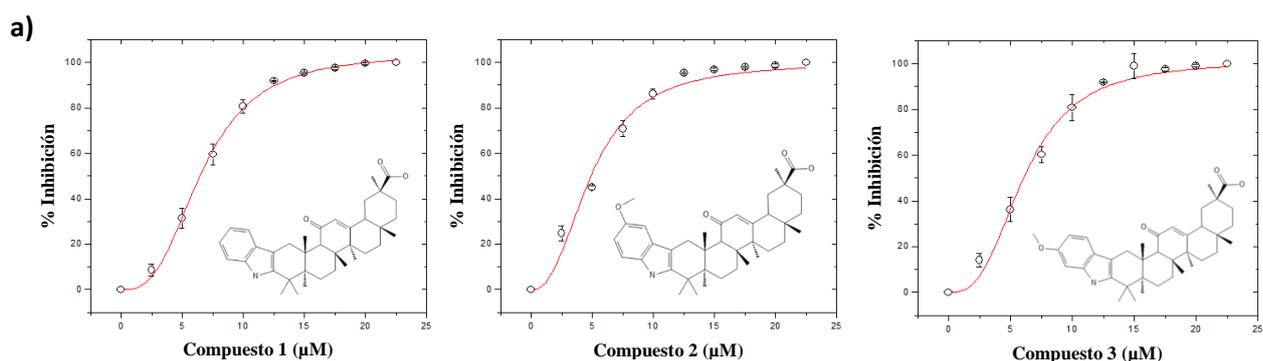


Figura 21. Curvas de IC₅₀ de los compuestos evaluados. a) De los 17 derivados del ácido glicirretínico (AG₁₋₁₇) y *h*PTP1B₁₋₄₀₀. **b)** Del ácido clorogénico (AC) y *h*PTP1B₁₋₂₈₅. Todos los ensayos con cada compuesto fueron realizados en tres experimentos independientes.

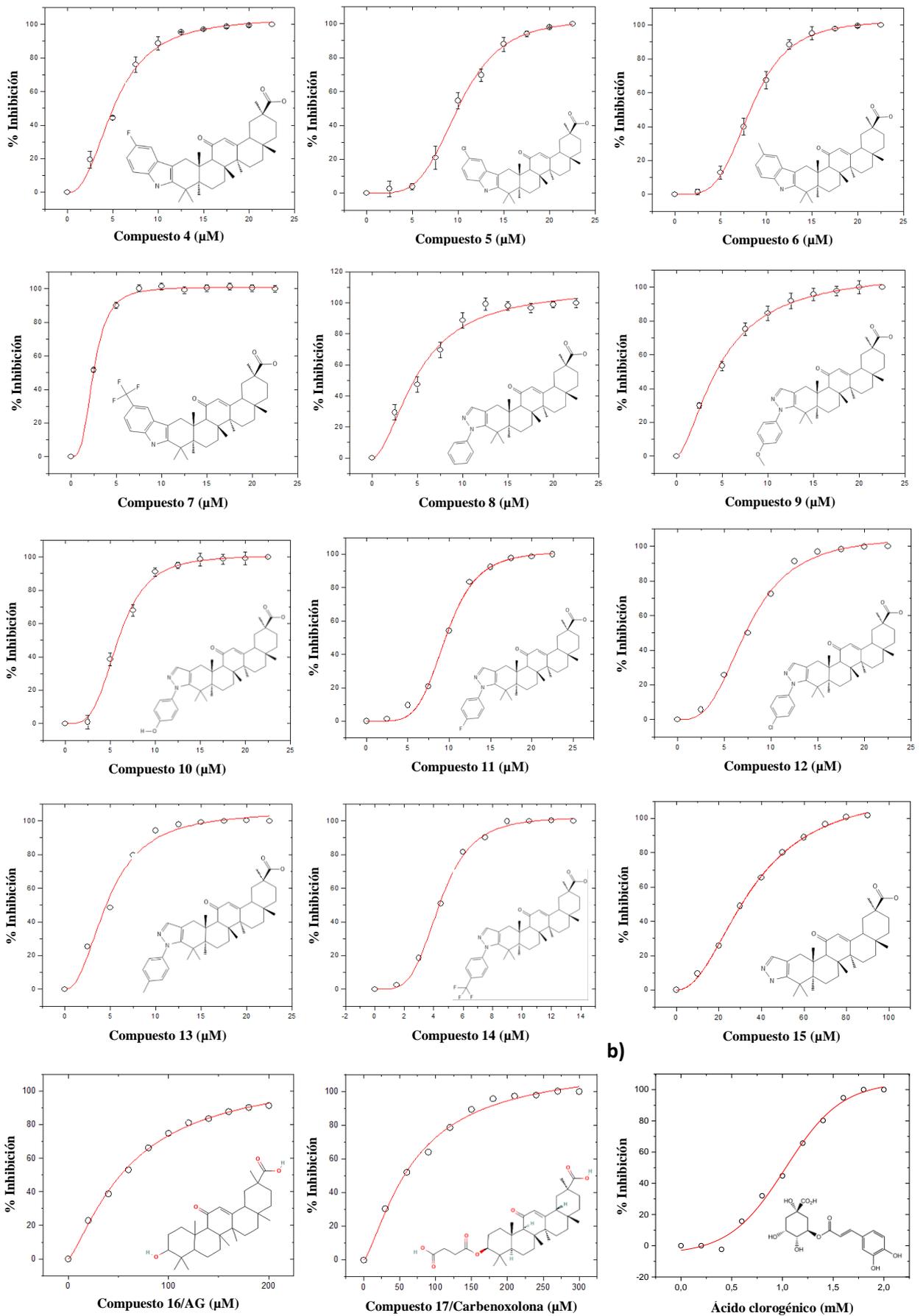


Figura 21. Curvas de IC_{50} de los compuestos evaluados (continuación).

El Cuadro 10 que se muestra a continuación, resume los valores de IC₅₀ (µM) obtenidos para los compuestos derivados del ácido glicirretínico (AG₁₋₁₇) con la forma hPTP1B₁₋₄₀₀. Entre los cinco compuestos señalados con asterisco (AG_{2, 4, 5, 7, 8}), AG₇ corresponde al compuesto con menor IC₅₀ (2.47 µM). Los demás compuestos (AG_{2, 4, 5, 8}) presentaron algunos de los valores de IC₅₀ más bajos. Estos cinco compuestos fueron evaluados en los ensayos de cinética enzimática con el objetivo de elucidar su posible mecanismo de inhibición. Los valores de IC₅₀ de los compuestos 9 (IC₅₀ = 4.81 µM), 13 (IC₅₀ = 4.75 µM) y 14 (IC₅₀ = 4.43 µM) fueron menores que los valores de IC₅₀ de los compuestos marcados con asterisco. Sin embargo, los compuestos AG_{9, 13, 14} no fueron seleccionados para su evaluación en los ensayos de cinética enzimática por dos razones: 1) su masa molecular es mayor a la de los compuestos AG_{2, 4, 5, 8}. 2) su solubilidad era más baja, por lo que requerían de mayor volumen de diluyente (DMSO), lo cual alteraba la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro.

Cuadro 10. IC₅₀ de los derivados de ácido glicirretínico (AG₁₋₁₇) en la actividad de hPTP1B₁₋₄₀₀

Enzima	Compuestos	IC ₅₀ (µM) ± Error estándar
PTP1B ₁₋₄₀₀	1	6.62 ± 0.126
	2 *	4.89 ± 0.263
	3	6.10 ± 0.213
	4 *	5.20 ± 0.223
	5 *	10.08 ± 0.216
	6	8.36 ± 0.104
	7 *	2.47 ± 0.034
	8 *	5.12 ± 0.565
	9	4.81 ± 0.206
	10	5.87 ± 0.132
	11	9.63 ± 0.183
	12	7.52 ± 0.225
	13	4.75 ± 0.307
	14	4.43 ± 0.067
	15	35.35 ± 1.088
	16 (AG)	62.02 ± 5.047
	17 (Carbenoxolona)	69.68 ± 6.982

* Compuestos con algunos de los valores más bajos de IC₅₀. Mismos que fueron evaluados en los ensayos de cinética enzimática.

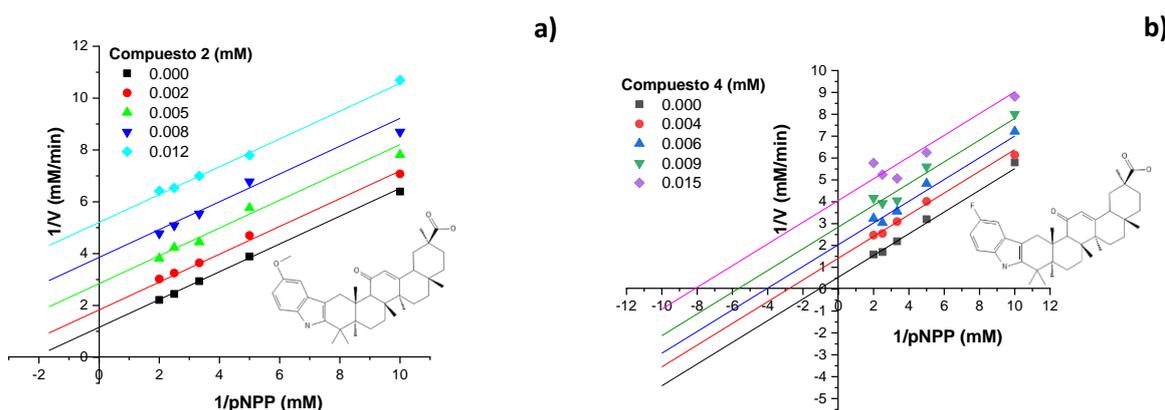
6.1.6 Cinética enzimática

Los parámetros de cinética enzimática son útiles en la determinación de la afinidad aparente de un inhibidor por una enzima, así como también permiten conocer su posible mecanismo de inhibición. Los datos experimentales obtenidos en los ensayos de cinética enzimática brindan información sobre la velocidad de la catálisis enzimática bajo ciertas concentraciones de sustrato e inhibidor. Esta información se representa en forma de gráficas. La

gráfica más sencilla, denominada curva hiperbólica de la cinética de Michaelis-Menten, muestra el comportamiento de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. A partir de la linealización de la curva hiperbólica de Michaelis-Menten, se obtiene la representación gráfica de Lineweaver-Burk, la cual expresa el valor inverso de la velocidad ($1/V$) en función del valor inverso de la concentración del sustrato ($1/[S]$) (Figura 22). Con base en el patrón de rectas de los gráficos de Lineweaver-Burk, se puede identificar el tipo o mecanismo de inhibición enzimática de un inhibidor. Así, para la inhibición competitiva, las pendientes de las líneas aumentan al aumentar la concentración de sustrato; para la inhibición no competitiva, las pendientes son independientes de la concentración de sustrato; para la inhibición acompetitiva, las pendientes de las líneas disminuyen al aumentar la concentración de sustrato [232].

Los ensayos de cinética enzimática para identificar el mecanismo de inhibición de los diferentes compuestos sobre la *h*PTP1B fueron realizados con ocho compuestos en total, tal como se describe a continuación: tres compuestos con efecto inhibitorio ya conocido, estos son: ácido clorogénico (AC), ácido ursólico (AU) y suramina (SUR); y cinco compuestos con potencial efecto inhibitorio, que son los derivados de indol y pirazol del ácido glicirretínico (AG). La determinación de los parámetros cinéticos de los derivados del AG se realizó con aquellos derivados que mostraron mayor efecto inhibitorio en la determinación de la IC_{50} . Estos son: compuestos 2, 4, 5, 7, y 8. Los compuestos con efecto inhibitorio ya conocido (AC, AU y SUR) y los derivados del AG ($AG_{2, 4, 5, 7, 8}$) fueron evaluados con la forma larga de la enzima (*h*PTP1B₁₋₄₀₀). El único compuesto ensayado con la forma corta de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅) fue el ácido clorogénico (AC).

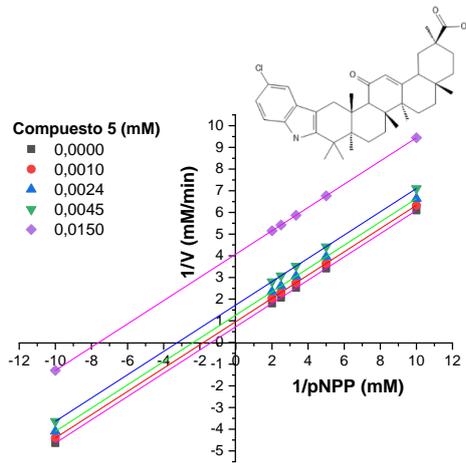
En la Figura 22 y el Cuadro 11, se presentan los resultados de los ensayos de cinética enzimática obtenidos con *h*PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados mencionados anteriormente. Los cinco compuestos derivados del ácido glicirretínico ($AG_{2, 4, 5, 7, 8}$) fueron seleccionados con base en su IC_{50} (ver Cuadro 10). De la misma manera, se presentan los resultados obtenidos con la *h*PTP1B₁₋₂₈₅ y el ácido clorogénico (AC). La Figura 22 muestra los gráficos de Lineweaver-Burk que indican el mecanismo de inhibición de cada uno de los compuestos ensayados con ambas formas de la enzima (*h*PTP1B₁₋₂₈₅ y *h*PTP1B₁₋₄₀₀).



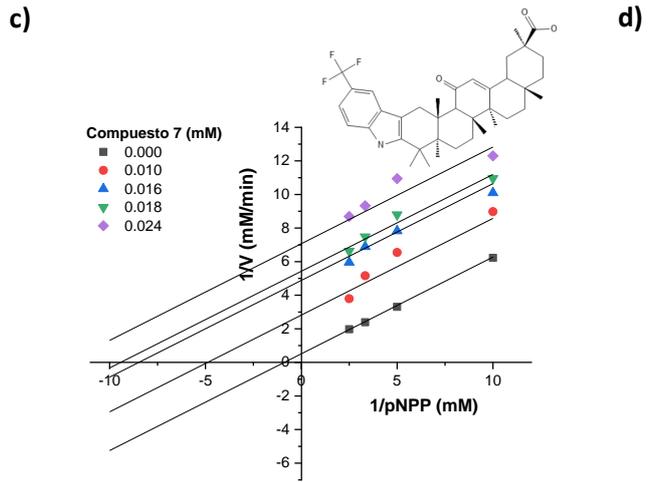
El comp. 2 inhibe acompetitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀

El comp. 4 inhibe acompetitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀

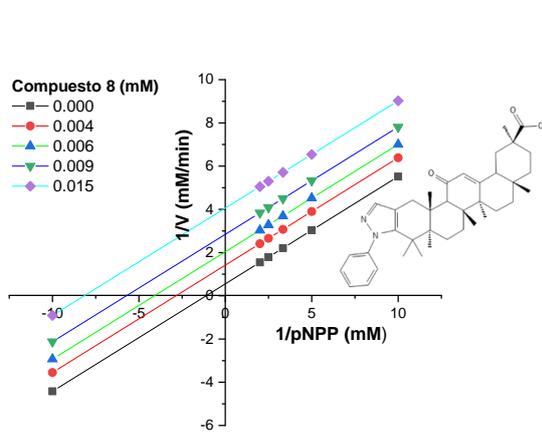
Figura 22. Gráficas de Lineweaver-Burk. Tipo de inhibición de los compuestos evaluados en la forma corta y larga de la *h*PTP1B. **a) – h)** Tipo de inhibición de los compuestos evaluados con *h*PTP1B₁₋₄₀₀. **a) – e)** Los derivados del ácido glicirretínico ($AG_{2, 4, 5, 7, 8}$) inhiben acompetitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀. **f) – h)** Entre los compuestos con efecto inhibitorio conocido, el AC y la SUR inhiben competitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀, mientras que el AU exhibe un tipo de inhibición mixto sobre esta forma de la enzima. **i)** El ácido clorogénico inhibe competitivamente la *h*PTP1B₁₋₂₈₅.



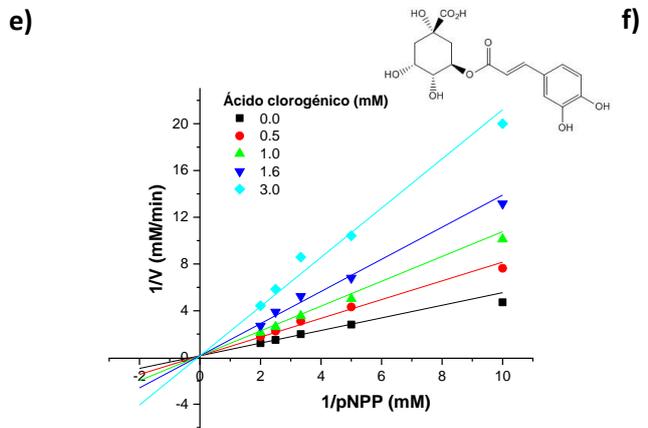
El comp. 5 inhibe acompetitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀



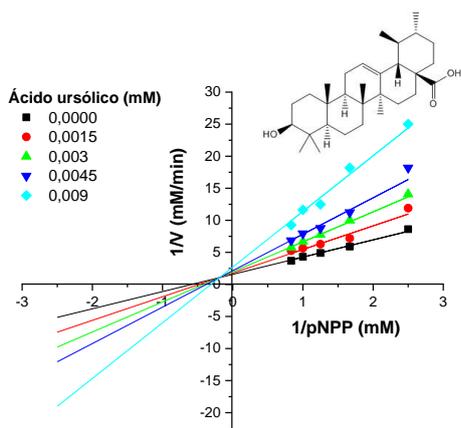
El comp. 7 inhibe acompetitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀



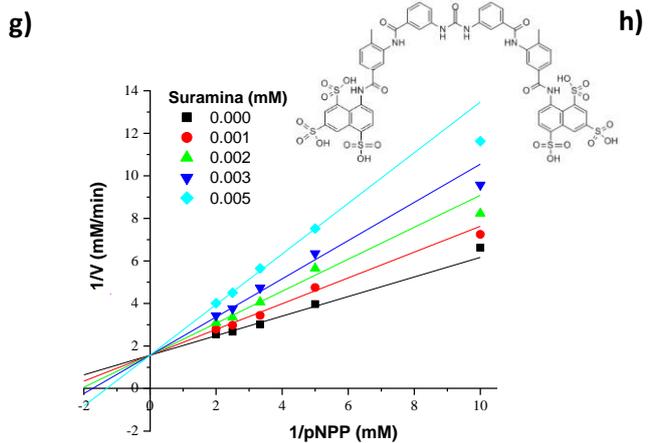
El comp. 8 inhibe acompetitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀



El AC inhibe competitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀

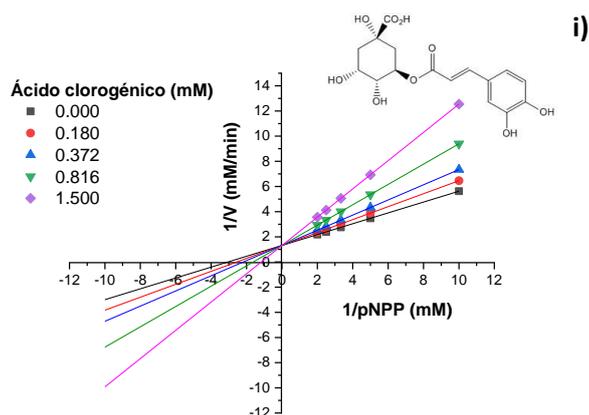


El AU inhibe de forma mixta la *h*PTP1B₁₋₄₀₀



La SUR inhibe competitivamente la *h*PTP1B₁₋₄₀₀

Figura 22. Gráficas de Lineweaver-Burk (continuación).



El AC inhibe competitivamente la $hPTP1B_{1-285}$

Figura 22. Gráficas de Lineweaver-Burk (continuación).

El Cuadro 11 resume los parámetros cinéticos obtenidos para los compuestos evaluados en los ensayos de cinética enzimática con las dos formas de la enzima $hPTP1B$ ($hPTP1B_{1-285}$ y $hPTP1B_{1-400}$). Para cada compuesto se indica el coeficiente de determinación (R^2) tenido en cuenta para la selección del mejor ajuste de los datos a cada tipo de inhibición.

Cuadro 11. Parámetros cinéticos de los compuestos evaluados en $hPTP1B_{1-400}$ y $hPTP1B_{1-285}$

Forma de $hPTP1B$	Compuesto	V_{max} ($\mu M/min$)	K_i (μM)	Tipo de inhibición	R^2
$hPTP1B_{1-400}$	2	0.87 ± 0.03	3.42 ± 0.2	Acompetitivo	0.996
	4	1.820 ± 0.2	0.002 ± 0.2	Acompetitivo	0.986
	5	1.373 ± 0.08	0.003 ± 0.003	Acompetitivo	0.994
	7	1.97 ± 0.4	0.002 ± 0.004	Acompetitivo	0.989
	8	2.731 ± 0.4	0.001 ± 0.002	Acompetitivo	0.994
	AC	$6.71 \times 10^3 \pm 3.13 \times 10^3$	$1.03 \times 10^3 \pm 7.0 \times 10$	Competitivo	0.992
	AU	0.63 ± 0.08	4.03 ± 0.8	Mixto	0.989
	SUR	0.64 ± 0.02	3.0 ± 0.2	Competitivo	0.997
$hPTP1B_{1-285}$	AC	0.760 ± 0.078	$0.933 \pm .0005$	Competitivo	0.952

Con base en el valor de R^2 para cada modelo de inhibición (Cuadro 11) y las gráficas de Lineweaver-Burk (Figura 22), el tipo de inhibición que exhiben los cinco compuestos derivados del ácido glicirretínico ($AG_{2, 4, 5, 7, 8}$) sobre la forma larga de la $hPTP1B$ ($hPTP1B_{1-400}$) es incompetitivo. Este resultado y el del ensayo cualitativo realizado con las tres formas de la proteína ($hPTP1B_{1-285}$, $hPTP1B_{1-321}$, y $hPTP1B_{1-400}$) (Figuras 18 y 19), nos sugiere que el mecanismo de inhibición de la PTP1B en respuesta al efecto de los compuestos derivados del AG ($AG_{2, 4, 5, 7, 8}$), está íntimamente ligada a la región reguladora C-terminal.

Los compuestos cuyo efecto inhibitorio sobre la PTP1B ya es conocido, han sido ampliamente utilizados como controles positivos en ensayos de inhibición con esta enzima. El ácido ursólico (AU) por ejemplo, es reportado comúnmente como inhibidor competitivo [32,140,192–195]. Sin embargo, con base en el tipo de inhibición exhibido con la forma larga de la enzima (PTP1B₁₋₄₀₀), el AU es un inhibidor de tipo mixto [84]. Este último tipo de inhibición es más coherente con la inhibición no competitiva identificada para el AU sobre la forma corta (PTP1B₁₋₂₉₈) y larga (PTP1B₁₋₄₀₀) de la PTP1B en los estudios realizados por Zhang et al. [230] y De-La-Cruz-Martínez et al. [166]. La diferencia entre el tipo de inhibición observada (mixta) y la reportada (competitiva) puede deberse a la forma de la enzima utilizada para el ensayo, puesto que la evidencia de inhibición competitiva para el AU está basada en ensayos donde se ha utilizado la forma corta de la enzima (PTP1B₁₋₃₂₁) [32,231]. La inhibición de tipo mixto obtenida para el AU con la forma larga (PTP1B₁₋₄₀₀) de la enzima, sumada a la evidencia obtenida en el acoplamiento molecular (Figura 30r, datos mostrados más adelante), sugiere que este tipo de inhibición puede responder a un efecto alostérico. Es posible que la presencia de la región reguladora de la PTP1B promueva un cambio conformacional que aumente la afinidad de la enzima por el inhibidor mediante sitios de unión que no involucran los aminoácidos del sitio activo de la enzima o que estos compuestos estén uniéndose en la región intrínsecamente desestructurada.

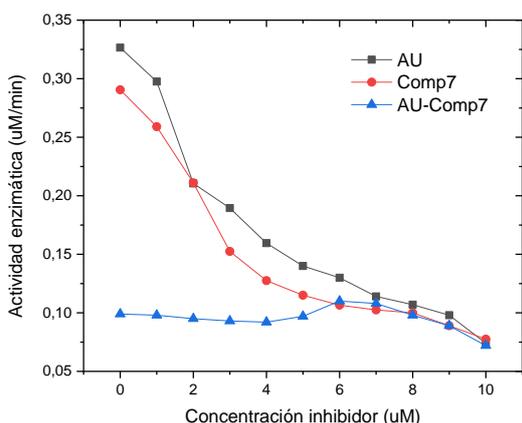
El valor de K_i del AU obtenido con la forma larga de la *h*PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀; $K_i = 4.00 \mu\text{M}$) (ver Cuadro 11), y los valores de K_i del mismo compuesto obtenidos en estudios realizados (que definen al AU como inhibidor no competitivo) con la forma corta (PTP1B₁₋₂₉₈; $K_i = 25.8 \mu\text{M}$) [230] y larga de la enzima (PTP1B₁₋₄₀₀; $K_i = 8.9 \mu\text{M}$) [166], indican que la afinidad de la enzima por el inhibidor es aproximadamente entre tres (PTP1B₁₋₄₀₀; $K_i = 8.9 \mu\text{M}$) y seis veces mayor (PTP1B₁₋₄₀₀; $K_i = 4.00 \mu\text{M}$) con la forma larga que con la forma corta de la PTP1B (PTP1B₁₋₂₉₈; $K_i = 25.8 \mu\text{M}$). Esta evidencia sugiere que la participación de la región reguladora C-terminal de la PTP1B es determinante en la actividad del enzima. En este caso, es crucial para aumentar la afinidad de la enzima por el inhibidor. En concordancia con lo reportado por Picha et al. [204], Montalibet et al. [39], Wiesmann et al. [38] y Krishnan et al. [50], es posible proponer que la región C-terminal de la PTP1B es susceptible de inhibición alostérica y puede participar en la regulación de la actividad catalítica de la enzima. Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de inhibición obtenido para el AU con la forma larga de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₄₀₀) es de tipo mixto (Cuadro 11), mientras que otros estudios que utilizan únicamente la forma corta de la enzima (PTP1B₁₋₃₂₁), señalan que el mecanismo de inhibición del AU es de tipo competitivo [32,231]. Esta diferencia sugiere que, además de influir en la afinidad de la enzima por el inhibidor, la región reguladora C-terminal de la enzima (*h*PTP1B₃₀₀₋₄₀₀) también puede influir en el mecanismo de inhibición de ciertos compuestos. De manera conjunta, estos resultados apoyan la evidencia que proponen a la región reguladora como pieza crucial en la regulación de la actividad catalítica de la PTP1B. Así como también, indican que la presencia de esta región intrínsecamente desordenada puede contener sitios de unión determinantes en la inhibición de la enzima y estabilización de su interacción con el inhibidor [38,39,50,204].

Aunque el ácido clorogénico (AC) es comúnmente utilizado como inhibidor no competitivo de la PTP1B [82,191,192]. Sin embargo, la evidencia experimental obtenida para el AC en nuestro trabajo sobre la forma corta (*h*PTP1B₁₋₂₈₅) y larga (*h*PTP1B₁₋₄₀₀) de la enzima, indica que el AC es un inhibidor competitivo, puesto que exhibe el mismo mecanismo de inhibición sobre ambas formas de la enzima. Adicionalmente, los valores de K_i del AC con ambas formas de la enzima fueron muy cercanos, esto es, 1.03 mM para *h*PTP1B₁₋₄₀₀ y 0.93 mM para *h*PTP1B₁₋₂₈₅. Esto último sugiere que la unión del AC al sitio activo de la PTP1B posiblemente no depende de la región reguladora de la enzima.

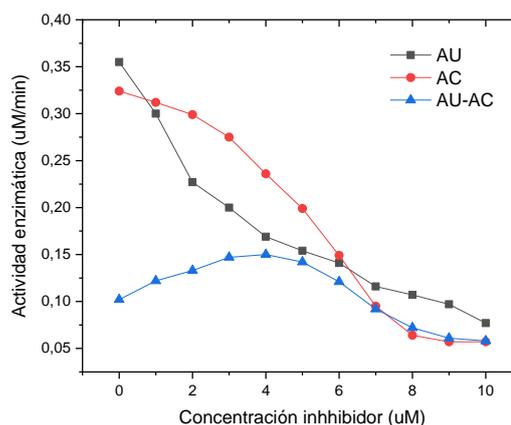
6.1.7 Ensayos preliminares de competencia enzimática

Los ensayos preliminares de competencia enzimática se llevaron a cabo para determinar si el efecto inhibitorio de los compuestos probados en los anteriores ensayos de inhibición y cinética enzimática está condicionado por la unión del inhibidor con el sitio activo y/o la región reguladora de la enzima. Lo anterior, teniendo en cuenta los resultados de los ensayos previos de inhibición enzimática realizados con la forma larga de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₄₀₀), y los valores de IC₅₀ de los compuestos evaluados con esta forma de la enzima. El diseño experimental de estos ensayos incluyó la forma larga de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₄₀₀), dos de los compuestos con efecto inhibitorio ya conocido (AU y AC), y uno de los derivados del AG (AG₇). Estos compuestos fueron seleccionados con base en su mecanismo de inhibición, y fueron contrastados de la siguiente forma: inhibidor mixto (AU) – inhibidor competitivo (AC); (ii) inhibidor mixto (AU) – inhibidor acompetitivo (AG₇).

A continuación, en la Figura 23 se muestran los gráficos obtenidos en los ensayos preliminares de competencia enzimática realizados con la forma larga de la *h*PTP1B (*h*PTP1B₁₋₄₀₀), AU, AC, y AG₇ o comp. 7).



AU (mixto) – AC (competitivo)



AU (mixto) – Comp. 7 (acompetitivo)

Figura 23. Gráficos de competencia enzimática de *h*PTP1B₁₋₄₀₀ y distintos inhibidores. Las concentraciones de cada inhibidor fueron definidas a partir de su IC₅₀. El 100% de la concentración del inhibidor empleado como control positivo corresponde a su IC₅₀. Por el contrario, el 0% de la concentración del inhibidor utilizado como control negativo, corresponde a la ausencia de este. A partir del valor de IC₅₀, se hicieron 10 diluciones del inhibidor: 10 concentraciones en orden creciente para un inhibidor, y 10 concentraciones en orden decreciente del segundo inhibidor. De esta manera, a la concentración 0 % de un inhibidor, le correspondía el 100 % del segundo inhibidor. Los resultados de este ensayo preliminar fueron obtenidos de un experimento único.

Los gráficos obtenidos en los ensayos preliminares de competencia enzimática que se ilustran en la Figura 23, coinciden con el efecto inhibitorio de los compuestos evaluados (AU, AC, y AG₇) sobre la actividad de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀. La tendencia de las gráficas indica que la actividad enzimática decrece a medida que aumenta la concentración del inhibidor, cuya concentración máxima equivale al valor de IC₅₀ calculado para cada compuesto (IC₅₀ AU = 6,8 μM; IC₅₀ AC = 1,8 mM; IC₅₀ AG₇ = 2,5 μM). En general, el comportamiento de la enzima por efecto aislado y conjunto de las combinaciones de inhibidores (mixto-competitivo y mixto-acometitivo), sugiere lo siguiente: (i) de forma aislada, cada compuesto inhibe la actividad de la PTP1B; (ii) parece no

haber interferencia del efecto inhibitorio por la acción conjunta de los inhibidores. Sin embargo, se deben implementar algunos cambios al diseño metodológico y desarrollar más estudios experimentales para determinar un efecto sinérgico entre los inhibidores de la enzima; (iii) en relación con la tendencia observada de cada inhibidor por separado, el no solapamiento de esta podría sugerir que los pares de inhibidores no compiten por el mismo sitio de unión.

En términos generales, la implementación de las diferentes metodologías exploradas con el fin de encontrar inhibidores de la PTP1B ha resultado en el descubrimiento de diversos compuestos que pueden bloquear eficazmente la actividad catalítica de la enzima [38,50,148,149,161,231,233–235]. Además, esos hallazgos no solo han proveído una base robusta sobre el conocimiento de las características moleculares de los compuestos con potencial efecto inhibitorio de la PTP1B, también han permitido implementar mejoras en el desarrollo, aún en progreso, de nuevas moléculas inhibitoras de la PTP1B. Como parte de las metodologías propuestas, los ensayos de cinética enzimática desarrollados con la PTP1B han logrado avanzar y profundizar en el estudio de los sitios de unión y el mecanismo de acción de los inhibidores [38,50,84,99,166,230].

La evidencia experimental obtenida a partir de los ensayos *in vitro* realizados con las tres formas de la hPTP1B (hPTP1B₁₋₂₈₅, hPTP1B₁₋₃₂₁, y hPTP1B₁₋₄₀₀), señalan la importancia de incluir la región reguladora C-terminal de la enzima (C-PTP1B) en los ensayos de actividad y cinética enzimática. En coherencia con estudios previos, las diferencias observadas entre la forma corta (hPTP1B₁₋₃₀₀) y la forma larga (hPTP1B₁₋₄₀₀) de la hPTP1B en la evaluación cualitativa de los derivados del AG₁₋₁₇, determinación de IC₅₀ y cinética enzimática, indican que la región reguladora C-terminal intrínsecamente desordenada de la PTP1B (C-PTP1B) es importante para la inhibición de la actividad catalítica de la enzima. De ahí que la actividad de las formas de la enzima que solo incluyen su dominio catalítico (hPTP1B₁₋₂₈₅ y hPTP1B₁₋₃₂₁) sea similar entre ellas, y diferente en comparación con la forma de la enzima que incluye su región reguladora (hPTP1B₁₋₄₀₀).

6.1.8 Efecto de la variabilidad estructural de los derivados del AG sobre la inhibición enzimática de la hPTP1B₁₋₄₀₀

Las características de los medicamentos están definidas por las propiedades inherentes a su estructura química, conocidas también como *drug-likeness*, por su término en inglés. Este conjunto de características *drug-likeness* comprenden las propiedades fisicoquímicas y los parámetros farmacocinéticos ADME/Tox (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) que determinan la actividad farmacológica de las moléculas bioactivas que pueden convertirse en medicamentos [239]. En general, los sistemas de anillos y grupos funcionales son componentes fundamentales de los fármacos. De hecho, estos componentes han sido el punto de partida para la identificación de estructuras privilegiadas, que por su patrón estructural confieren propiedades farmacológicas favorables a ciertos ligandos, como potencia, biodisponibilidad, permeabilidad celular y selectividad [240]. Con base en la estructura química, se han determinado algunos criterios de *drug-likeness* que favorecen el perfil farmacológico de ciertos ligandos. Entre estos criterios cabe resaltar los siguientes: 1) el número ideal de anillos aromáticos y no aromáticos debe ser idealmente menor o igual a 2 y 1, respectivamente; 2) los grupos funcionales incluyen preferiblemente –OH, –COOR y –COOH, y –F para los fármacos del sistema nervioso central. Por el contrario, se deben evitar los grupos –CONHOH, –SH, –CHO y –SO₃H; 3) el rango aceptable de la proporción de átomos pesados está entre 0.05-0.5, idealmente entre 0.1-0.35 [239].

Respecto a las características que pueden favorecer el perfil farmacológico de los inhibidores de la PTP1B, se ha propuesto que las moléculas pequeñas de origen natural satisfacen las características de inhibición potente de la enzima [153,241]. Adicionalmente, se ha demostrado que los triterpenos pentacíclicos de origen natural de tipo oleanano, inhiben potente y selectivamente la PTP1B [146]. El ácido glicirretínico es un triterpeno natural de tipo oleanano presente en la raíz de la planta de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*); y es conocido por sus propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias [242], y antidiabéticas. Las propiedades antidiabéticas del AG se han identificado a partir de su capacidad de revertir la resistencia a la insulina [243], y por su efecto antihiper glucémico y antihiperlipidémico evaluado en ratones con síndrome metabólico [244,245].

La diferencia observada en la inhibición de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ por efecto del AG ($IC_{50} = 62 \mu M$) y sus derivados (IC_{50} promedio = $5.8 \mu M$), sugiere que la modificación estructural del AG favorece el efecto inhibitorio sobre la enzima. Esto concuerda con otros estudios en los que se ha encontrado que los compuestos derivados de diversas moléculas de origen natural (e.g. ácido maslínico y ácido oleanólico) exhiben mayor actividad inhibitoria sobre la PTP1B que las moléculas a partir de las cuales han sido sintetizados. Por otro lado, se observaron diferencias en los valores de IC_{50} entre los derivados del AG. Con una $IC_{50} = 2.5 \mu M$, el mayor efecto inhibitorio sobre la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ fue exhibido por el compuesto 7 (AG₇), seguido del compuesto 14 (AG₁₄), con una $IC_{50} = 4.4 \mu M$, y casi todos los demás compuestos (AG_{1-4, 6, 8-13, 15}), que presentaron una IC_{50} promedio = $6.1 \mu M$. El compuesto con menor efecto inhibitorio fue el compuesto 5 (AG₅), con una $IC_{50} = 10.08 \mu M$.

Teniendo en cuenta la estructura química de los derivados del AG con mayor efecto inhibitorio, específicamente la de los compuestos que fueron evaluados en los ensayos de cinética enzimática (AG_{2, 4, 5, 7, 8}), es posible notar que en general, los anillos de indol sustituidos favorecen la inhibición de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀. Cabe mencionar que los anillos de indol hacen parte de las estructuras químicas privilegiadas para el desarrollo de fármacos [240]. Por el contrario, los compuestos que contienen grupos N-fenil-pirazol fusionados a su anillo A presentan menor efecto inhibitorio, como el compuesto 5 (AG₅), cuyo valor de IC_{50} ($10.08 \mu M$) fue el más alto entre todos los derivados del AG.

Por lo anterior, es posible sugerir que la presencia de los anillos de indol en la estructura química de los derivados del AG favorece su actividad inhibitoria sobre la *h*PTP1B₁₋₄₀₀. Adicionalmente, es posible que la presencia del átomo de flúor (F) contribuya también al aumento de la inhibición de la enzima. Se ha demostrado que algunos compuestos difluorados, como el difluorometil fosfonato, exhiben mayor potencia inhibitoria sobre la PTP1B que aquellos monofluorados [39]. Lo cual es consecuente con la evidencia obtenida con el compuesto 7 (AG₇), que además de contener un anillo de indol, tiene tres átomos de flúor. Esta evidencia sugiere que por sus características estructurales, los derivados del AG pueden ser considerados como potenciales inhibidores de la PTP1B.

6.2 Estudio in silico

6.2.1 Cribado virtual basado en estructura

El cribado virtual se llevó a cabo solo con el dominio catalítico de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀). La estructura 3D empleada para este procedimiento corresponde a una de las estructuras disponibles en el PDB, en este caso, se seleccionó una estructura de la enzima cocrystalizada con un ligando en el sitio alostérico (PDB ID: 1T49) [38]. La base de datos sobre la cual se realizó la búsqueda de compuestos con potencial efecto inhibitorio sobre la PTP1B corresponde a la base de datos del DrugBank de Pubchem (<https://go.drugbank.com/>). En total se analizaron 10,760 compuestos. La Figura 24, presenta los resultados obtenidos del cribado virtual basado en estructura realizado con el dominio catalítico de la PTP1B y 10,760 compuestos. La Figura 24a exhibe el comportamiento de los valores de energía de unión (kcal/mol) de todos los compuestos acoplados con la enzima. Los compuestos con mayor afinidad de unión a la enzima corresponden a aquellos que están más alejados del cero en el cuadrante negativo del eje “y”, cuyos valores de energía de unión es cercano a -20 kcal/mol. En el recuadro de la Figura 24b se enlistan los compuestos con mayor afinidad de unión ordenados con base en sus valores de energía.

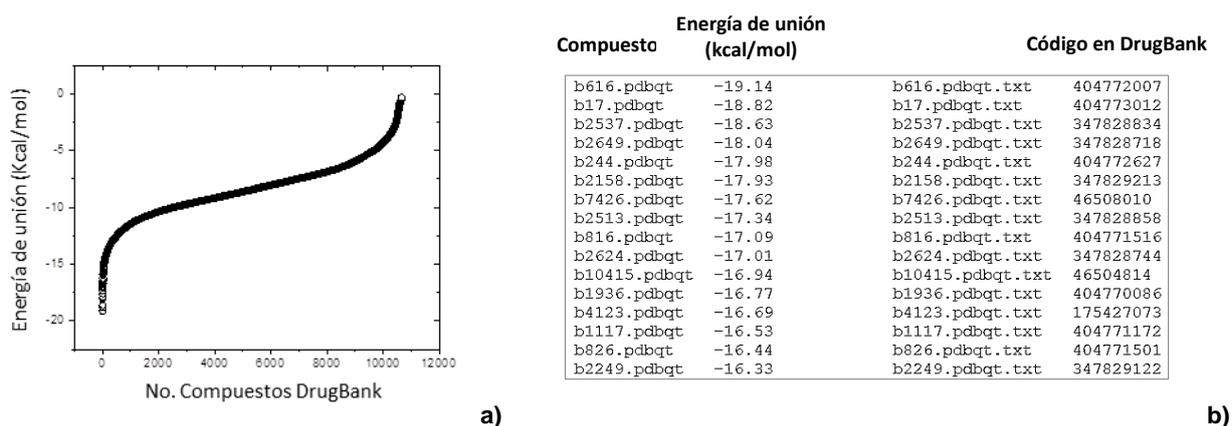


Figura 24. Cribado virtual dirigido al sitio alostérico de la PTP1B₁₋₃₀₀. a) Variación de energía de unión proteína-ligando (eje y) respecto al número de compuestos evaluados (eje x). b) Lista de compuestos ordenados por su afinidad de unión. La primera columna (de izquierda a derecha) corresponde al número de cada compuesto en el orden en que fue evaluado durante el acoplamiento molecular; la extensión .pdbqt indica la extensión de cada archivo. La segunda columna indica los valores de energía de unión de cada compuesto (kcal/mol) ordenados de mayor (-19.14 kcal/mol) a menor (-16.33 kcal/mol) con base en su afinidad de unión. La cuarta columna indica el código del compuesto dentro de la base de datos (<https://go.drugbank.com/>).

Entre los compuestos que se listan en la Figura 24b, el ursadiol (compuesto b616.pdbqt), que ocupa el primer lugar de la lista, corresponde al compuesto de menor energía, y por lo tanto, con mayor afinidad de unión (predicha) a la enzima (-19.14 kcal/mol). En segundo lugar, está el ácido ursólico (compuesto b17.pdbqt; -18.82 kcal/mol). Este último no se tuvo en cuenta para el análisis posterior al cribado virtual porque es uno de los compuestos con efecto inhibitorio ya conocido sobre la PTP1B, y adicionalmente, fue evaluado en los ensayos anteriores de IC₅₀ (realizados con las tres formas de la enzima: hPTP1B₁₋₂₈₅, hPTP1B₁₋₃₂₁, y hPTP1B₁₋₄₀₀) y cinética enzimática (realizados con la hPTP1B₁₋₄₀₀).

De acuerdo con los valores de energía de unión obtenidos en el cribado virtual, los cuatro compuestos (exceptuando el segundo, que corresponde al ácido ursólico) con mayor afinidad de unión al sitio alostérico de la PTP1B₁₋₃₀₀ fueron los siguientes: ursadiol (-19.14 kcal/mol), lupeol (-18.63 kcal/mol), ácido betulínico (-18.04 kcal/mol) y BMS-955176 (-17.98 kcal/mol). A partir de los valores de energía de unión y el número de átomos pesados (o número de átomos no hidrógenos) presentes en la estructura de cada una de estas cuatro moléculas, se calculó la eficiencia del ligando (LE, por sus siglas en inglés). LE indica el aporte de energía de cada átomo del ligando a la interacción enzima-ligando. Generalmente, LE aumenta a medida que disminuye el tamaño molecular del ligando (expresado en número de átomos pesados) [236]. Los valores de LE (expresados en kcal/mol/átomos pesados) para los cuatro compuestos seleccionados en el cribado virtual fueron los siguientes: $LE_{\text{ursadiol}} = -0.68$, $LE_{\text{lupeol}} = -0.6$, $LE_{\text{ácido betulínico}} = -0.55$, y $LE_{\text{BMS-955176}} = -0.37$. Con base en los valores de LE, el ursadiol es el compuesto con mayor eficiencia del ligando, lo cual es coherente con el tamaño molecular, y por tanto con el número de átomos pesados de este compuesto, que en comparación con los demás, corresponde al compuesto más pequeño, con una masa molecular de 392.6 g/mol y un número de átomos pesados de 28.

La Figura 25, muestra las estructuras moleculares del ursadiol, lupeol, ácido betulínico y BMS-955176. La estructura del compuesto 25a) corresponde a la estructura del ursadiol, que presenta el mayor score en el cribado virtual, la mayor afinidad de unión predicha a la enzima (-19.14 kcal/mol), y la eficiencia del ligando más favorable.

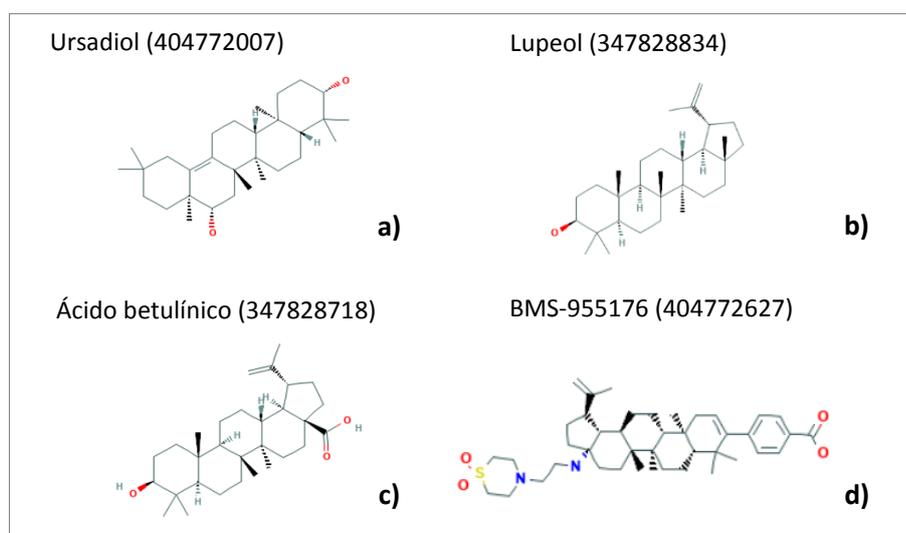


Figura 25. Estructura química de los compuestos con mayor afinidad de unión al sitio alostérico de la PTP1B₁₋₃₀₀ según el cribado virtual. a) Ursadiol (404772007), $LE = -0.68$ kcal/mol/átomos pesados. **b)** Lupeol (347828834), $LE = -0.6$ kcal/mol/átomos pesados. **c)** Ácido betulínico (347828718), $LE = -0.55$ kcal/mol/átomos pesados. **d)** BMS-955176 (404772627), $LE = -0.37$ kcal/mol/átomos pesados.

Se adquirieron comercialmente los tres primeros compuestos para su posterior evaluación. La Figura 26, ilustra la curva de inhibición del ursadiol ($IC_{50} = 94.8 \mu\text{M}$), el único compuesto que mostró actividad inhibitoria sobre la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ en el ensayo *in vitro*.

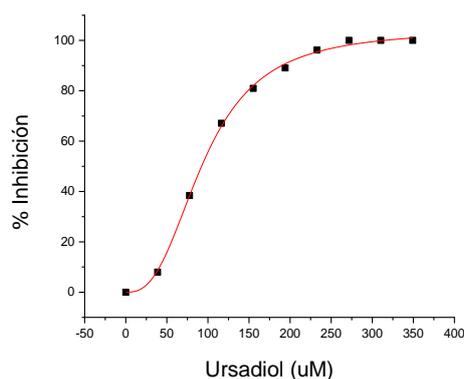


Figura 26. Curva de inhibición enzimática del ursadiol. Con base en el cribado virtual, el ursadiol fue el compuesto que presentó actividad inhibitoria a la *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

El cribado virtual basado en estructura es útil en la búsqueda de compuestos con potencial efecto farmacológico que pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, en este caso, la búsqueda de compuestos a partir de la estructura 3D de la forma larga de la enzima (PTP1B₁₋₄₀₀) que incluye la región intrínsecamente desordenada (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀), supone ciertas limitaciones computacionales. De ahí que la búsqueda realizada en el cribado virtual con la estructura 3D del dominio catalítico de la enzima (PTP1B₁₋₂₈₅) arrojará resultados que, evaluados experimentalmente *in vitro*, no resultaron exitosos. Es decir, los compuestos que en un principio tenían afinidad por la enzima con base en el análisis *in silico*, no presentaron efecto inhibitorio sobre la actividad de la *h*PTP1B evaluada experimentalmente *in vitro*. No obstante cabe mencionar que estas moléculas han sido estudiadas por sus efectos farmacológicos. El uso terapéutico del ursadiol previene la síntesis y absorción de colesterol y puede ayudar a disolver cálculos biliares. El lupeol ha sido estudiado por su potencial efecto anticancerígeno y antiinflamatorio, así como también para el tratamiento del acné. El ácido betulínico ha mostrado tener actividad antimalárica, antineoplásica y antiinflamatoria. El BMS-955176 se encuentra en fase de investigación clínica por su potencial efecto terapéutico en el tratamiento de pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH, por sus siglas en inglés) [237]

6.2.2 Modelado de la región C-terminal (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀)

El modelado del dominio C-terminal intrínsecamente desordenado de la PTP1B (C-PTP1B), comprendido entre el aminoácido 300 a 400 (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀), se hizo porque el único ensamble estructural tridimensional de la proteína completa realizado con el dominio C-PTP1B (resuelta por resonancia magnética nuclear-RMN) [50] no se encuentra disponible en la base de datos del *Protein Data Bank* (PDB). Teniendo en cuenta las limitaciones asociadas al modelado por homología de esta región (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀), es necesario recurrir a métodos de modelado *ab initio*, en donde, en términos generales, el modelo de un polipéptido se genera a partir de su secuencia, también denominada estructura primaria. AlphaFold, el programa, empleado para el modelamiento de la región PTP1B₃₀₀₋₄₀₀, es un sistema de inteligencia artificial desarrollado por Google, cuyas predicciones rápidas y precisas (a nivel atómico) para secuencias polipeptídicas con o sin estructura conocida, resultan del entrenamiento de redes neuronales. Dicho entrenamiento se basa en las limitaciones evolutivas, físicas y geométricas de las estructuras proteicas, y se hace a partir de la estructura tridimensional resuelta experimentalmente de aproximadamente 170 mil proteínas [214,238].

Con el objetivo de predecir la disposición espacial del ensamble que incluye la región intrínsecamente desordenada (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀) y el dominio catalítico de la PTP1B (PTP1B₁₋₃₀₀), el modelo generado por AlphaFold fue refinado por simulación de dinámica molecular (SDM) en un tiempo de 200 ns. A continuación, la Figura 27 muestra los pasos de la SDM (calentamiento, despresurización, equilibrio y producción) y la energía total del sistema durante el tiempo de simulación del modelo estructural de la PTP1B₁₋₄₀₀ generado por AlphaFold.

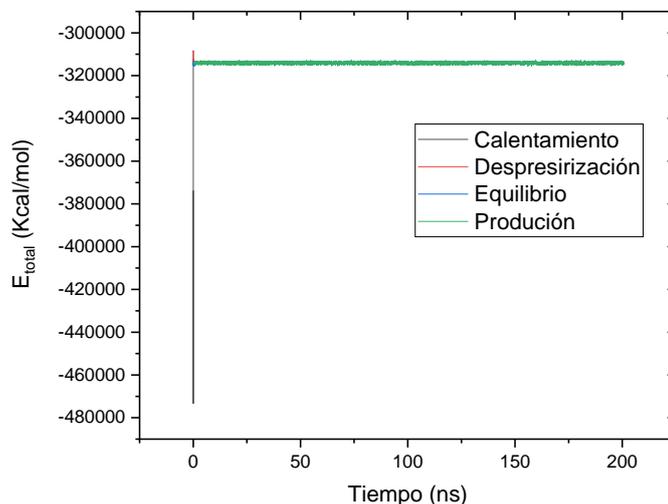


Figura 27. Pasos de la simulación de dinámica molecular del modelo estructural de la PTP1B₁₋₄₀₀ generado por AlphaFold.

Se realizaron tres réplicas de SDM. A partir del modelo estructural 3D de la forma completa de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀) generado por AlphaFold y refinado por SDM, se eligió la estructura correspondiente a los 200 ns de la réplica uno (SDM1) de la SDM (Figura 28). Esto, teniendo en cuenta que el RMSD se estabiliza aparentemente en un intervalo entre 160 y 200 ns. Además, de las tres réplicas de la SDM, la réplica SDM1 (representada de color negro en la Figura 28) es la que presenta menor RMSD.

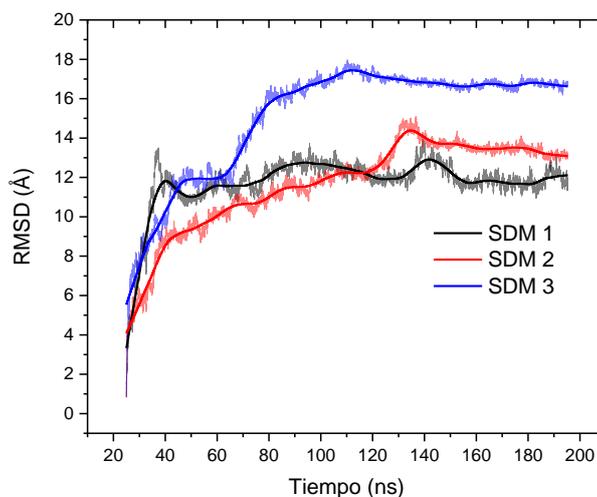


Figura 28. Réplicas de la simulación de dinámica molecular del modelo estructural de la PTP1B₁₋₄₀₀. Variación de RMSD (Å) en función del tiempo de simulación 200 ns. El menor valor de RMSD se obtuvo con la SDM1 (color negro), lo cual sugiere mayor estabilidad del sistema durante el tiempo de simulación.

La Figura 29, muestra el modelo estructural de la PTP1B al principio (0 ns) (Figura 29a) y al final (200 ns) (Figura 29b) de la simulación. Así como también, el gráfico de Ramachandran y el score de calidad, donde se observa que el modelo estructural mejora después de la SDM.

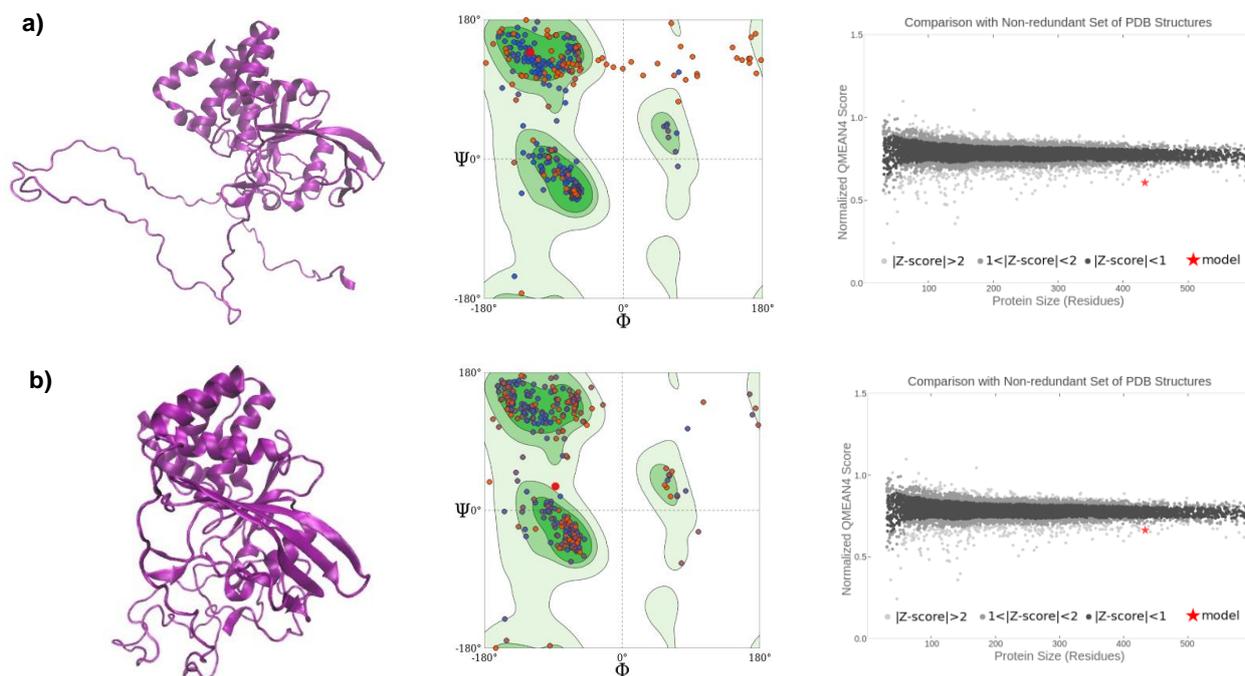


Figura 29. Modelo estructural de la PTP1B₁₋₄₀₀ generado por Alpha Fold, antes y después de la simulación de dinámica molecular. Disposición espacial **a)** al inicio (0 ns) y **b)** al final de la simulación (200 ns). Para cada uno de los modelos (inicial y final) se muestra el gráfico de Ramachandran y el score de calidad.

El proceso de afinamiento estructural con la SDM permite estimar con mayor precisión la estructura 3D de la forma larga de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀), y por tanto, contribuye a que las predicciones *in silico* basadas en el modelo refinado, sean más precisas. El modelo estructural de la PTP1B que incluye la región C-terminal intrínsecamente desordenada (PTP1B₁₋₄₀₀), representa la forma más cercana a la forma fisiológica de la enzima, es decir, aquella que se encuentra a nivel celular *in vivo*. De ahí la importancia de incluir la forma PTP1B₁₋₄₀₀ en los ensayos *in vitro*. Así como también, estimar con la mayor precisión posible, la conformación estructural 3D de la forma fisiológica de la enzima, lo cual puede constituir un buen punto de partida, no solo para los estudios computacionales, sino también para delimitar la búsqueda experimental de inhibidores de la PTP1B.

6.2.3 Acoplamiento molecular

A partir del modelo estructural 3D de la forma completa de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀) generado por AlphaFold y refinado por SDM, se realizaron acoplamientos moleculares para calcular la energía de unión teórica (kcal/mol) del complejo enzima-ligando formado por la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos ensayados experimentalmente *in vitro*. Estos compuestos abarcan aquellos con efecto inhibitorio ya conocido (AU, AC y SUR), y los 17 compuestos derivados del ácido glicirretínico evaluados en los ensayos de determinación de IC₅₀ (AG₁₋₁₇), incluyendo aquellos que fueron evaluados en los ensayos de cinética enzimática (AG_{2, 4, 5, 7, 8}). La Figura 30 y el Cuadro 12 presentan los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos antes mencionados ensayados *in vitro*.

A continuación, en la Figura 30 se ilustra la conformación probable del complejo enzima-ligando, la cual corresponde a aquella con el menor valor de energía de unión y por tanto la más estable entre las distintas conformaciones posibles generadas durante el acoplamiento molecular.

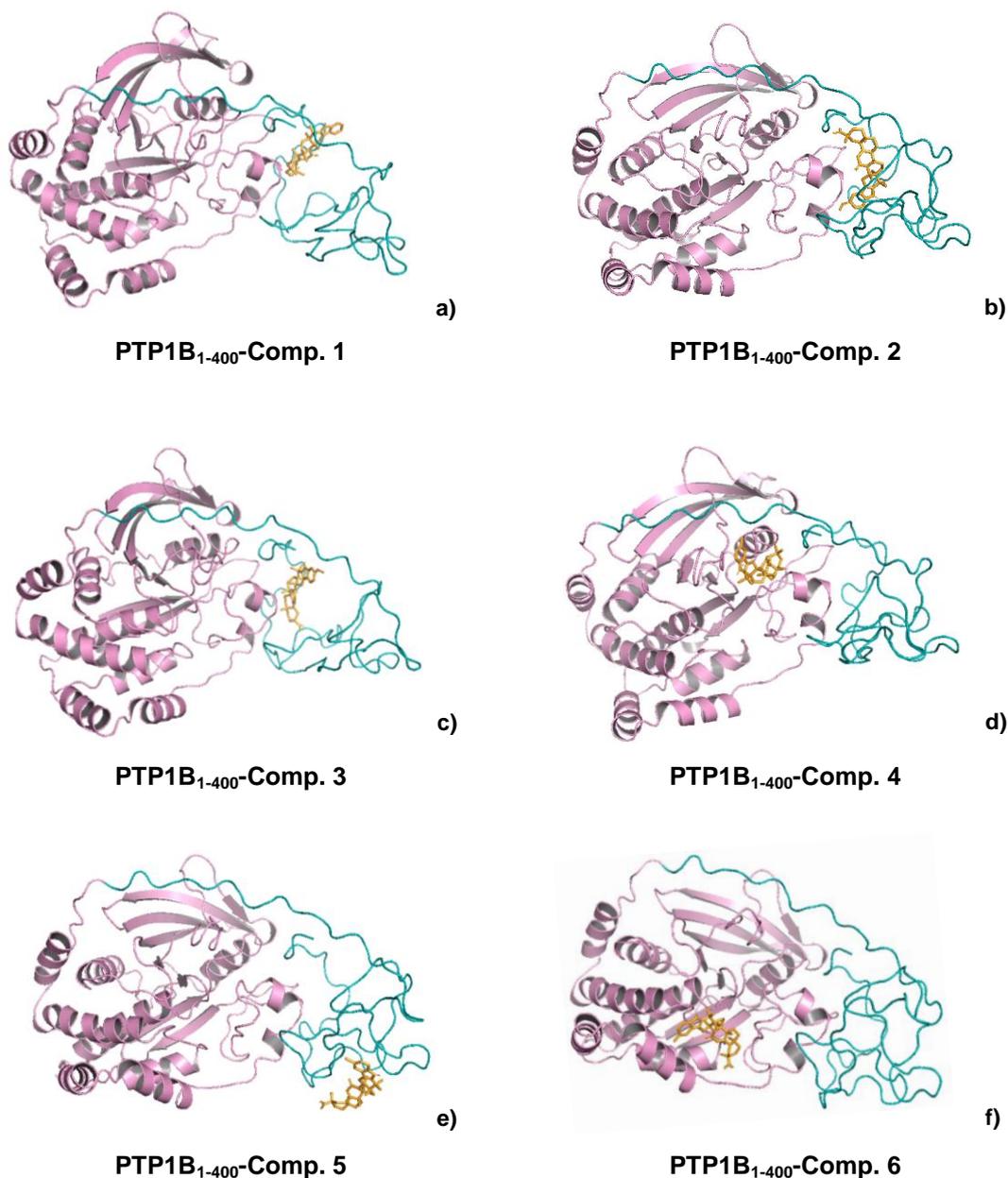
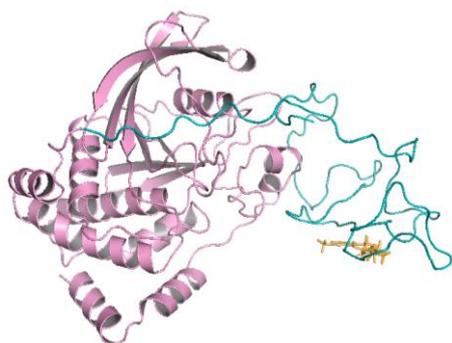
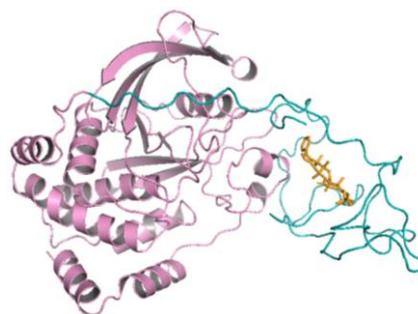


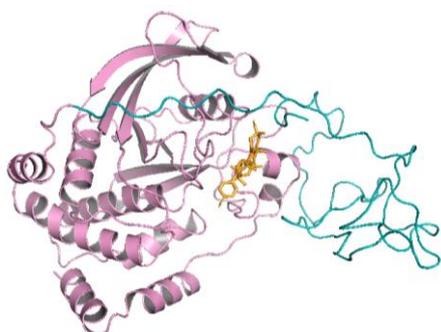
Figura 30. Acoplamiento molecular de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados *in vitro* en los ensayos de actividad y cinética enzimática. Cada una de las estructuras del complejo enzima-ligando exhibe la conformación más probable de acoplamiento molecular. El modelo de la estructura 3D de la PTP1B₁₋₄₀₀ comprende su dominio catalítico N-terminal (residuos 1-300, color rosa) y dominio C-terminal (residuos 300-400, color azul). Los compuestos acoplados con la PTP1B₁₋₄₀₀ están coloreados en amarillo, y están ordenados de la siguiente forma: a) – q) compuestos derivados del AG (AG₁₋₁₇). r) – t) compuestos con efecto inhibitorio conocido.



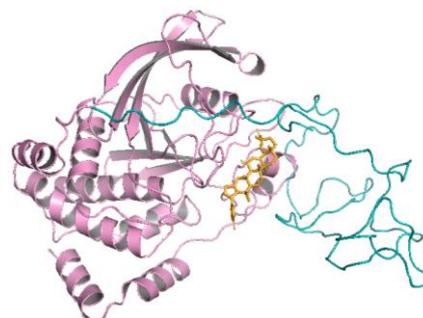
PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 7



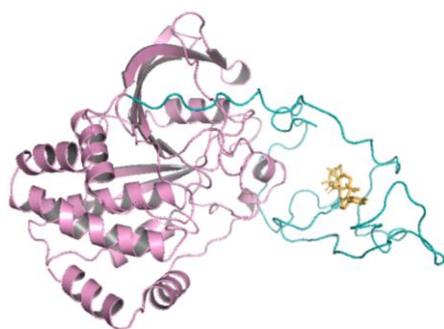
PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 8



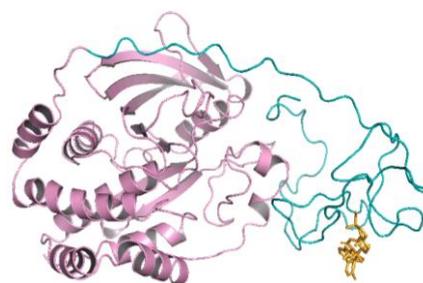
PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 9



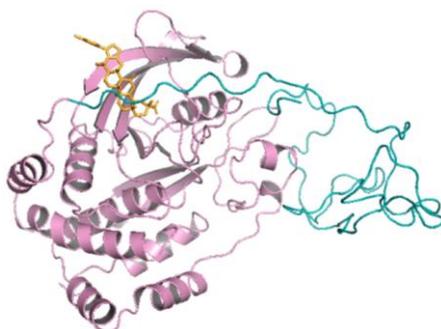
PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 10



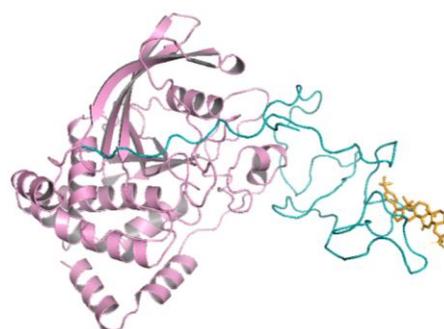
PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 11



PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 12



PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 13



PTP1B₁₋₄₀₀-Comp. 14

Figura 30. Acoplamiento molecular de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos ensayados *in vitro* (continuación).

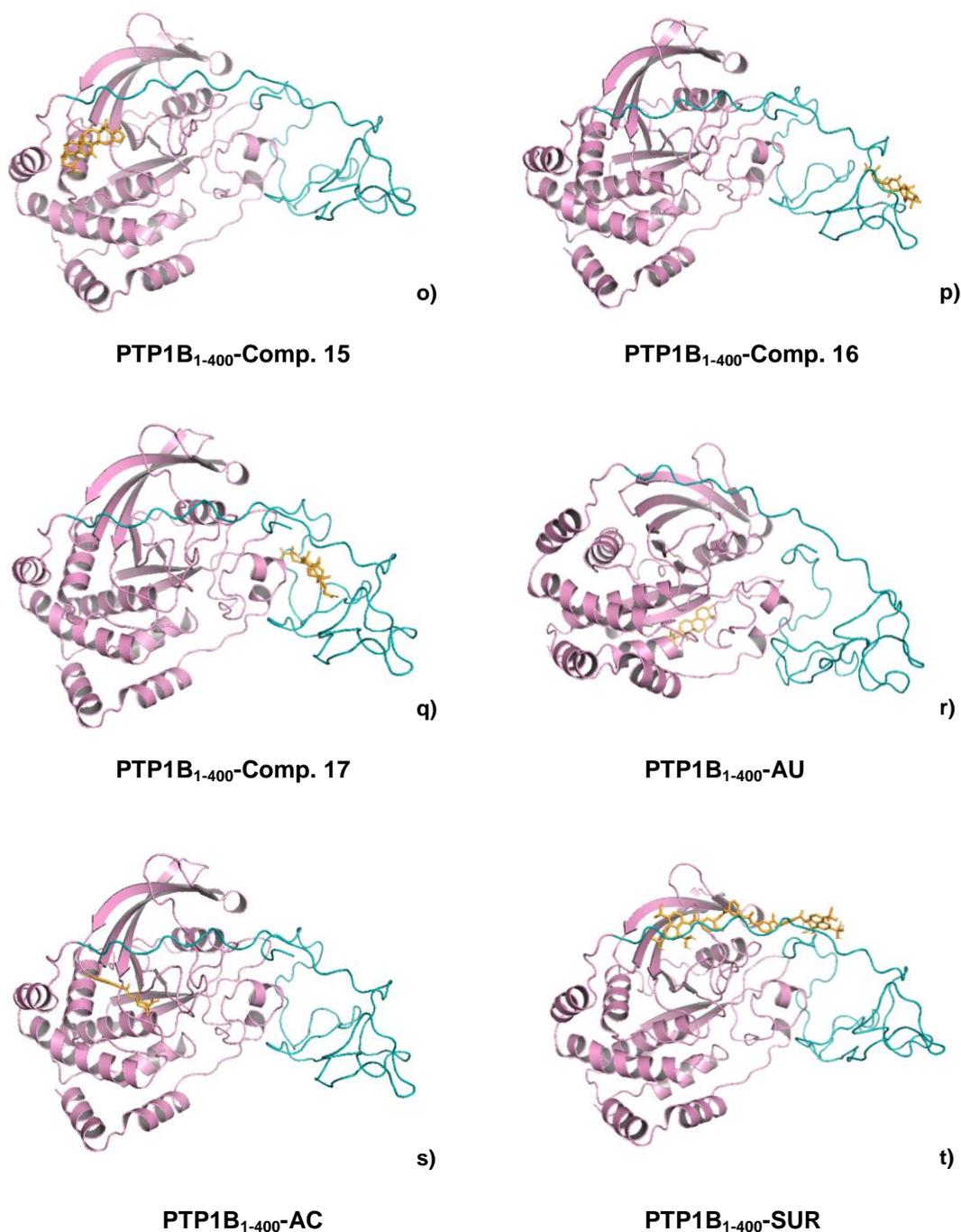


Figura 30. Acoplamiento molecular de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos ensayados *in vitro* (continuación).

En general, las conformaciones del acoplamiento molecular sugieren que el sitio de interacción enzima-ligando es preferiblemente aquel que implica la presencia de la región C-terminal. Esto puede observarse en el caso del ácido glicirretínico (compuesto 16) y la mayoría de sus derivados, los cuales incluyen los compuestos 1-3, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 17. El acoplamiento realizado con los compuestos 1-3, 8, 13 y 17, sugiere que la conformación más estable no se limita a la interacción del ligando con algunos sitios localizados en la región C-terminal, como se observa con los compuestos 5, 7, 11, 12, 14 y 16. Las conformaciones de los compuestos 1-3, 8, 13 y 17, también indican que algunos sitios de la región C-terminal acercan al ligando a otros sitios de inhibición alostérica localizados en el dominio catalítico N-terminal, lo cual puede conferir mayor estabilidad al sistema. Esto último también se observa con el ácido clorogénico (AC) y la

suramina (SUR). Sin embargo, el sitio de interacción de la SUR sugerido por el acoplamiento, no coincide con los sitios dentro del dominio catalítico (PTP1B₁₋₃₀₀) que participan en la inhibición competitiva de la enzima, que es la se ha reportado [29,166,210] y se corroboró en los ensayos *in vitro* de este estudio.

El Cuadro 12 que se muestra a continuación, presenta los valores de energía de unión (kcal/mol) del complejo enzima-ligando analizados en el acoplamiento molecular. Cada complejo está conformado por el modelo estructural de la PTP1B₁₋₄₀₀ y los compuestos evaluados en los ensayos *in vitro*.

Cuadro 12. Energía de unión de diferentes complejos enzima-ligando analizados por acoplamiento molecular

Complejo enzima-ligando	Energía de unión (kcal/mol)
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁	-7.55
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₂	-9.13
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₃	-8.11
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₄	-8.68
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₅	-7.14
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₆	-8.84
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₇	-8.52
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₈	-8.22
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₉	-8.18
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₀	-8.42
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₁	-8.94
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₂	-8.12
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₃	-8.75
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₄	-9.12
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₅	-8.25
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₆	-7.95
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AG ₁₇	-7.10
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AU	-7.32
PTP1B ₁₋₄₀₀ -AC	-6.63
PTP1B ₁₋₄₀₀ -SUR	-8.75

Algunos de los valores de energía de unión (kcal/mol) obtenidos en el acoplamiento molecular con ciertos compuestos, y sus valores correspondientes de IC₅₀ determinados en los ensayos de actividad enzimática con la PTP1B₁₋₄₀₀, sugieren concordancia entre algunos de los resultados experimentales generados *in vitro* y los resultados teóricos *in silico*. Por ejemplo, en los ensayos de IC₅₀, el compuesto AG₂ presentó el segundo valor más bajo de IC₅₀ (IC₅₀= 4.9 µM), después del compuesto 7 (IC₅₀= 2.5 µM), que fue el compuesto con menor IC₅₀ de todos los compuestos derivados del AG evaluados *in vitro* con la PTP1B₁₋₄₀₀ (Cuadro 10). En el acoplamiento molecular, este mismo compuesto AG₂ mostro el valor más bajo de energía de

unión (-9.13 kcal/mol) (Cuadro 12). De modo similar, el compuesto AG₄ presentó el cuarto valor más bajo de IC₅₀ (IC₅₀= 5.2 μM) en los ensayos *in vitro* (Cuadro 10), y el sexto valor más bajo de energía de unión en el acoplamiento molecular (-8.68 kcal/mol) (Cuadro 12). Esta correspondencia entre los resultados experimentales generados *in vitro* y los resultados teóricos arrojados *in silico*, no solo indica que el acoplamiento molecular es un buen acercamiento teórico inicial que puede ser validado experimentalmente, sino que también puede ser útil para guiar futuros estudios *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, cabe resaltar que los resultados del acoplamiento consideran el modelo estructural de la forma de la PTP1B completa (PTP1B₁₋₄₀₀), lo cual es comparable con la forma que se evaluó experimentalmente en los ensayos de actividad enzimática.

7. APORTES CIENTÍFICOS

1. Obtención del sistema de expresión del dominio catalítico (PTP1B₁₋₂₈₅) y la forma larga de la *h*PTP1B que incluye la región reguladora (PTP1B₁₋₄₀₀).
2. Estandarización de los ensayos de actividad enzimática con ambas formas de la enzima: PTP1B₁₋₂₈₅ y PTP1B₁₋₄₀₀.
3. Los derivados del ácido glicirretínico son nuevos compuestos de origen semisintético ensayados por primera vez, con potencial efecto inhibitor sobre la forma fisiológica de la *h*PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀). Adicionalmente, estos compuestos se encuentran en proceso de patentamiento (Folio MX/E/2022/027746).

8. CONCLUSIONES

1. Los 17 compuestos derivados del ácido glicirretínico mostraron efecto inhibitorio únicamente con la forma larga de la enzima (PTP1B₁₋₄₀₀). Por esta razón, se sugiere que los derivados del ácido glicirretínico posiblemente se unen en la región reguladora intrínsecamente desestructurada de la enzima o requieren esta región para ejercer su efecto.
2. El ácido clorogénico inhibe competitivamente la forma corta (PTP1B₁₋₂₈₅) y larga (PTP1B₁₋₄₀₀) de la PTP1B, lo cual propone que su mecanismo de inhibición no requiere de la presencia de la región reguladora de la enzima.
3. Es relevante contar con la forma larga de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀) tanto para los ensayos enzimáticos *in vitro* como para los análisis *in silico*, puesto que la forma de la PTP1B que incluye su región reguladora C-terminal (PTP1B₃₀₀₋₄₀₀) corresponde a la forma estructural fisiológica que se encuentra a nivel celular *in vivo*.
4. La región reguladora de la PTP1B influye en su actividad enzimática, incrementado la inactivación de la enzima por efecto de algunas moléculas inhibitorias, posiblemente aumentando la afinidad por el inhibidor, estabilizando su interacción con él, y por lo tanto, condicionando el mecanismo de inhibición de los compuestos que requieren de la participación de ciertos sitios de la región C-terminal.
5. A pesar de las limitaciones computacionales que supone hacer análisis *in silico* con proteínas o regiones de proteínas intrínsecamente desestructuradas, incluir la forma completa de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀) puede brindar un panorama molecular más cercano al real. Además de arrojar resultados más confiables en la búsqueda de compuestos potencialmente inhibidores a través del cribado virtual.
6. Los parámetros cinéticos obtenidos *in vitro* son importantes en sí mismos porque con ellos, además de inferir el mecanismo de inhibición de un compuesto, es posible delimitar y direccionar la búsqueda y análisis *in silico*. A su vez, estos últimos permiten corroborar y soportar la evidencia experimental.
7. Los análisis comparativos de cinética enzimática que incluyen la forma corta (PTP1B₁₋₂₈₅) y larga de la PTP1B (PTP1B₁₋₄₀₀) aportan evidencia del mecanismo de inhibición enzimática. Así como también nos acerca a los cambios de actividad enzimática que pueden ocurrir en el contexto fisiológico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Pan American Health Organization *Plan of Action for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases in the Americas 2013-2019*; Washington, D.C., 2014;
2. WHO *Global Report On Diabetes: Executive Summary*; 2016;
3. Cho, N.H.; Shaw, J.E.; Karuranga, S.; Huang, Y.; da Rocha Fernandes, J.D.; Ohlrogge, A.W.; Malanda, B. IDF Diabetes Atlas: Global Estimates of Diabetes Prevalence for 2017 and Projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2018**, *138*, 271–281, doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023.
4. World Health Organization (WHO) *Classification of Diabetes Mellitus 2019*; 2019;
5. World Health Organization (WHO) Diabetes Available online: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes> (accessed on 10 May 2023).
6. IDF *IDF Diabetes Atlas Ninth Edition 2019: 463 Million People Living with Diabetes*; 2019;
7. American Diabetes Association 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* **2021**, *44*, S15–S33, doi:10.2337/DC21-S002.
8. Kerru, N.; Singh-Pillay, A.; Awolade, P.; Singh, P. Current Anti-Diabetic Agents and Their Molecular Targets: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *152*, 436–488, doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.061.
9. Bastarrachea, R.A.; Montero, J.C.; Saavedra-Gajardo, V.; Cerda-Flores, R.; Machado-Domínguez, A.; Comuzzie, A.G. Objetivos Moleculares Para Diseñar Nuevos Fármacos Para El Tratamiento de La Diabetes Tipo 2 y La Obesidad. *Rev. Med. Chil.* **2008**, *136*, 107–117, doi:10.4067/s0034-98872008000100014.
10. Khan, Z.A.; Farhangkhoe, H.; Chakrabarti, S. Towards Newer Molecular Targets for Chronic Diabetic Complications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2006**, *4*, 45–57.
11. Kumar, G.S.; Page, R.; Peti, W. The Mode of Action of the Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor Ertiprotafib. *PLoS One* **2020**, *15*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0240044.
12. Liu, R.; Mathieu, C.; Berthelet, J.; Zhang, W.; Dupret, J.-M.; Lima, F.R. Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): From Structure to Clinical Inhibitor Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7027, doi:10.3390/IJMS23137027.
13. Rath, P.; Ranjan, A.; Ghosh, A.; Chauhan, A.; Gurnani, M.; Tuli, H.S.; Habeeballah, H.; Alkhanani, M.F.; Haque, S.; Dhama, K.; et al. Potential Therapeutic Target Protein Tyrosine Phosphatase-1B for Modulation of Insulin Resistance with Polyphenols and Its Quantitative Structure–Activity Relationship. *Mol.* **2022**, *Vol. 27*, Page 2212 **2022**, *27*, 2212, doi:10.3390/MOLECULES27072212.
14. Li, X.; Xu, Q.; Li, C.; Luo, J.; Li, X.; Wang, L.; Jiang, B.; Shi, D. Toward a Treatment of Diabetes: In Vitro and in Vivo Evaluation of Uncharged Bromophenol Derivatives as a New Series of PTP1B Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 178–185, doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.057.
15. Tsou, R.C.; Zimmer, D.J.; De Jonghe, B.C.; Bence, K.K. Deficiency of PTP1B in Leptin Receptor-Expressing Neurons Leads to Decreased Body Weight and Adiposity in Mice. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4227, doi:10.1210/EN.2012-1548.
16. Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A.L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C.C.; et al. Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science* (80-.). **1999**, *283*, 1544–1548, doi:10.1126/science.283.5407.1544.
17. Abdelsalam, S.S.; Korashy, H.M.; Zeidan, A.; Agouni, A. The Role of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)-1B in Cardiovascular Disease and Its Interplay with Insulin Resistance. *Biomol.* **2019**, *Vol. 9*, Page 286 **2019**, *9*, 286, doi:10.3390/Biom9070286.
18. Pandey, S.K.; Yu, X.X.; Watts, L.M.; Michael, M.D.; Sloop, K.W.; Rivard, A.R.; Leedom, T.A.; Mancham, V.P.; Samadzadeh, L.; McKay, R.A.; et al. Reduction of Low Molecular Weight Protein-Tyrosine Phosphatase Expression Improves Hyperglycemia and Insulin Sensitivity in Obese Mice. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14291–14299, doi:10.1074/JBC.M609626200.
19. Ancel, C.M.; Evans, M.C.; Kerbus, R.I.; Wallace, E.G.; Anderson, G.M. Deletion of PTP1B From Brain Neurons Partly Protects Mice From Diet-Induced Obesity and Minimally Improves Fertility. *Endocrinology* **2022**, *163*, 1–8, doi:10.1210/ENDOCR/BQAB266.
20. Zhang, Z.-Y. Protein Tyrosine Phosphatases: Structure and Function, Substrate Specificity, and Inhibitor Development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 209–234, doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.083001.144616.
21. Maheshwari, N.; Karthikeyan, C.; Trivedi, P.; Moorthy, N.S.H.N. Recent Advances in Protein Tyrosine Phosphatase 1B Targeted Drug Discovery for Type II Diabetes and Obesity. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 551–575, doi:10.2174/1389450118666170222143739.
22. Thiebaut, P.-A.; Besnier, M.; Gomez, E.; Richard, V. Role of Protein Tyrosine Phosphatase 1B in Cardiovascular Diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *101*, 50–57, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.09.002.
23. van Huijsduijnen, R.H.; Wälchli, S.; Ibberson, M.; Harrenga, A. Protein Tyrosine Phosphatases as Drug Targets: PTP1B and Beyond. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.6.6.637> **2005**, *6*, 637–647, doi:10.1517/14728222.6.6.637.
24. Singh, S.; Singh Grewal, A.; Grover, R.; Sharma, N.; Chopra, B.; Kumar Dhingra, A.; Arora, S.; Redhu, S.; Lather, V. Recent Updates on Development of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Treatment of Diabetes, Obesity and Related Disorders. *Bioorg. Chem.* **2022**, *121*, 105626, doi:10.1016/J.BIOORG.2022.105626.
25. Van Huijsduijnen, R.H.; Bombrun, A.; Swinnen, D. Selecting Protein Tyrosine Phosphatases as Drug Targets. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 1013–1019, doi:10.1016/S1359-6446(02)02438-8.

26. Montalibet, J.; Kennedy, B.P. Therapeutic Strategies for Targeting PTP1B in Diabetes. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2005**, *2*, 129–135, doi:10.1016/j.ddstr.2005.05.002.
27. Krishnan, N.; Bonham, C.A.; Rus, I.A.; Shrestha, O.K.; Gauss, C.M.; Haque, A.; Tocilj, A.; Joshua-Tor, L.; Tonks, N.K. Harnessing Insulin-and Leptin-Induced Oxidation of PTP1B for Therapeutic Development. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41467-017-02252-2.
28. Stanford, S.M.; Bottini, N. Targeting Tyrosine Phosphatases: Time to End the Stigma. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 524–540, doi:10.1016/j.tips.2017.03.004.
29. Zhang, Y.L.; Keng, Y.F.; Zhao, Y.; Wu, L.; Zhang, Z.Y. Suramin Is an Active Site-Directed, Reversible, and Tight-Binding Inhibitor of Protein-Tyrosine Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12281–12287, doi:10.1074/JBC.273.20.12281.
30. Ding, H.; Zhang, Y.; Xu, C.; Hou, D.; Li, J.; Zhang, Y.; Peng, W.; Zen, K.; Zhang, C.Y.; Jiang, X. Norathyriol Reverses Obesity- and High-Fat-Diet-Induced Insulin Resistance in Mice through Inhibition of PTP1B. *Diabetologia* **2014**, *57*, 2145–2154, doi:10.1007/s00125-014-3315-8.
31. Peters, K.G.; Davis, M.G.; Howard, B.W.; Pokross, M.; Rastogi, V.; Diven, C.; Greis, K.D.; Eby-Wilkens, E.; Maier, M.; Evdokimov, A.; et al. Mechanism of Insulin Sensitization by BMOV (Bis Maltolato Oxo Vanadium); Unliganded Vanadium (VO₄) as the Active Component. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 321–330, doi:10.1016/S0162-0134(03)00236-8.
32. Zhang, W.; Hong, D.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Shen, Q.; Li, J. ya; Hu, L. hong; Li, J. Ursolic Acid and Its Derivative Inhibit Protein Tyrosine Phosphatase 1B, Enhancing Insulin Receptor Phosphorylation and Stimulating Glucose Uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1505–1512, doi:10.1016/J.BBAGEN.2006.05.009.
33. Andersen, H.S.; Iversen, L.F.; Jeppesen, C.B.; Branner, S.; Norris, K.; Rasmussen, H.B.; Møller, K.B.; Møller, N.P.H. 2-(Oxalylamino)-Benzoic Acid Is a General, Competitive Inhibitor of Protein-Tyrosine Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7101–7108, doi:10.1074/JBC.275.10.7101.
34. Combs, A.P. Recent Advances in the Discovery of Competitive Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for the Treatment of Diabetes, Obesity, and Cancer. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2333–2344.
35. Shi, L.; Yu, H.P.; Zhou, Y.Y.; Du, J.Q.; Shen, Q.; Li, J.Y.; Li, J. Discovery of a Novel Competitive Inhibitor of PTP1B by High-Throughput Screening. *Acta Pharmacol. Sin.* **2008**, *29*, 278–284, doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00737.x.
36. Shinde, R.N.; Siva Kumar, G.; Eqbal, S.; Elizabeth Sobhia, M. Screening and Identification of Potential PTP1B Allosteric Inhibitors Using in Silico and in Vitro Approaches. *PLoS One* **2018**, *13*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0199020.
37. Shinde, R.N.; Sobhia, M.E. Binding and Discerning Interactions of PTP1B Allosteric Inhibitors: Novel Insights from Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *45*, 98–110, doi:10.1016/j.jmglm.2013.08.001.
38. Wiesmann, C.; Barr, K.J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D.A.; Shen, W.; Fahr, B.J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randall, M.; et al. Allosteric Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 730–737, doi:10.1038/nsmb803.
39. Montalibet, J.; Skorey, K.; McKay, D.; Scapin, G.; Asante-Appiah, E.; Kennedy, B.P. Residues Distant from the Active Site Influence Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor Binding *. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5258–5266, doi:10.1074/JBC.M511546200.
40. Sharma, B.; Xie, L.; Yang, F.; Wang, W.; Zhou, Q.; Xiang, M.; Zhou, S.; Lv, W.; Jia, Y.; Pokhrel, L.; et al. Recent Advance on PTP1B Inhibitors and Their Biomedical Applications. **2020**, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112376.
41. Meng, G.; Zheng, M.; Wang, M.; Tong, J.; Ge, W.; Zhang, J.; Zheng, A.; Li, J.; Gao, L.; Li, J. Design and Synthesis of New Potent PTP1B Inhibitors with the Skeleton of 2-Substituted Imino-3-Substituted-5-Heteroarylidene-1,3-Thiazolidine-4-One: Part I. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 756–769, doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.060.
42. Low, J.L.; Chai, C.L.L.; Yao, S.Q. Bidentate Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Antioxidants Redox Signal.* **2014**, *20*, 2225–2250, doi:10.1089/ars.2013.5710.
43. Haftchenary, S.; Jouk, A.O.; Aubry, I.; Lewis, A.M.; Landry, M.; Ball, D.P.; Shouksmith, A.E.; Collins, C. V.; Tremblay, M.L.; Gunning, P.T. Identification of Bidentate Salicylic Acid Inhibitors of PTP1B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 982–986, doi:10.1021/ACSMEDCHEMLETT.5B00171/SUPPL_FILE/ML5B00171_SI_001.PDF.
44. Chen, S.; Sbu, N.; Veedu, R.N. Antisense Oligonucleotides as Potential Therapeutics for Type 2 Diabetes. <https://home.liebertpub.com/nat> **2021**, *31*, 39–57, doi:10.1089/NAT.2020.0891.
45. Zinker, B.A.; Rondinone, C.M.; Trevillyan, J.M.; Gum, R.J.; Clampit, J.E.; Waring, J.F.; Xie, N.; Wilcox, D.; Jacobson, P.; Frost, L.; et al. PTP1B Antisense Oligonucleotide Lowers PTP1B Protein, Normalizes Blood Glucose, and Improves Insulin Sensitivity in Diabetic Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11357, doi:10.1073/PNAS.142298199.
46. Swarbrick, M.M.; Havel, P.J.; Levin, A.A.; Bremer, A.A.; Stanhope, K.L.; Butler, M.; Booten, S.L.; Graham, J.L.; McKay, R.A.; Murray, S.F.; et al. Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase-1B with Antisense Oligonucleotides Improves Insulin Sensitivity and Increases Adiponectin Concentrations in Monkeys. *Endocrinology* **2009**, *150*, 1670, doi:10.1210/EN.2008-0885.
47. Digenio, A.; Pham, N.C.; Watts, L.M.; Morgan, E.S.; Jung, S.W.; Baker, B.F.; Geary, R.S.; Bhanot, S. Antisense Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B with IONIS-PTP-1BRx Improves Insulin Sensitivity and Reduces Weight in Overweight Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 807–814, doi:10.2337/DC17-2132.
48. Khvorova, A.; Reynolds, A.; Leake, D.; Marshall, W.; Read, S.; Scaringe, S. siRNA Targeting Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP1B) 2007.
49. Singh, J.P.; Li, Y.; Chen, Y.Y.; Hsu, S.T.D.; Page, R.; Peti, W.; Meng, T.C. The Catalytic Activity of TCPTP Is Auto-Regulated by Its Intrinsically Disordered Tail and Activated by Integrin Alpha-1. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1–12, doi:10.1038/s41467-021-27633-6.

50. Krishnan, N.; Koveal, D.; Miller, D.H.; Xue, B.; Akshinthala, S.D.; Kragelj, J.; Jensen, M.R.; Gauss, C.M.; Page, R.; Blackledge, M.; et al. Targeting the Disordered C Terminus of PTP1B with an Allosteric Inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 558–566, doi:10.1038/nchembio.1528.
51. Secretaría de Salud; INSP; INEGI *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018: Presentación de Resultados*; 2018;
52. Metodología de La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2022 y Planeación y Diseño de La Ensanut Continua 2020-2024. *Salud Publica Mex* **2022**, *64*, 522–529, doi:10.21149/14186.
53. Gobierno de México Diabetes En México: Conoce Más de La Diabetes Para Proteger y Cuidar Tu Salud Available online: <https://www.gob.mx/promosalud/acciones-y-programas/diabetes-en-mexico-284509> (accessed on 11 May 2023).
54. Organización Mundial de la Salud (OMS) Las 10 Principales Causas de Defunción Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 12 May 2023).
55. IMCO Índice de Competitividad Internacional: Memorándum Para El Presidente (2018-2024) | ICI 2017 - IMCO Available online: <https://imco.org.mx/indices/memorandum-para-el-presidente-2018-2024/capitulos/lograr-una-sociedad-mas-sana-y-equitativa> (accessed on 9 June 2020).
56. IDF Diabetes Atlas Mexico Diabetes Report 2000 - 2045 Available online: <https://diabetesatlas.org/data/en/country/128/mx.html> (accessed on 11 May 2023).
57. Feudtner, C. Diabetes: The Sweet Irony of Modern Technology. *Bull. World Health Organ.* **2011**, *89*, 90–91, doi:10.2471/blt.11.040211.
58. Singh, J.; Cumming, E.; Manoharan, G.; Kalasz, H.; Adegate, E. Medicinal Chemistry of the Anti-Diabetic Effects of Momordica Charan-Tia: Active Constituents and Modes of Actions. *Open Med. Chem. J.* **2011**, *5*, 70–77.
59. Rath, P.; Ranjan, A.; Chauhan, A.; Verma, N.K.; Bhargava, A.; Prasad, R.; Jindal, T. A Critical Review on Role of Available Synthetic Drugs and Phytochemicals in Insulin Resistance Treatment by Targeting PTP1B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2022**, *194*, 4683–4701, doi:10.1007/S12010-022-04028-X.
60. Campbell, I.W. Antidiabetic Drugs Present and Future: Will Improving Insulin Resistance Benefit Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetes Mellitus? *Drugs* **2000**, *60*, 1017–1028, doi:10.2165/00003495-200060050-00004.
61. Guan, H.P.; Yang, X.; Lu, K.; Wang, S.P.; Castro-Perez, J.M.; Previs, S.; Wright, M.; Shah, V.; Herath, K.; Xie, D.; et al. Glucagon Receptor Antagonism Induces Increased Cholesterol Absorption. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2183, doi:10.1194/JLR.M060897.
62. Mathieu, C.; Dupret, J.M.; Rodrigues Lima, F. The Structure of Brain Glycogen Phosphorylase-from Allosteric Regulation Mechanisms to Clinical Perspectives. *FEBS J.* **2017**, *284*, 546–554, doi:10.1111/FEBS.13937.
63. Migocka-Patrzałek, M.; Elias, M. Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/CELLS10040883/S1.
64. Padda, I.S.; Mahtani, A.U.; Parmar, M. Sodium-Glucose Transport Protein 2 (SGLT2) Inhibitors. *StatPearls* **2022**.
65. Khoo, C.M. Diabetes Mellitus Treatment. *Int. Encycl. Public Heal.* **2017**, 288–293, doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00108-9.
66. Andersen, J.N.; Mortensen, O.H.; Peters, G.H.; Drake, P.G.; Iversen, L.F.; Olsen, O.H.; Jansen, P.G.; Andersen, H.S.; Tonks, N.K.; Møller, N.P.H. Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 7117–7136, doi:10.1128/mcb.21.21.7117-7136.2001.
67. Alonso, A.; Sasin, J.; Bottini, N.; Friedberg, I.; Friedberg, I.; Osterman, A.; Godzik, A.; Hunter, T.; Dixon, J.; Mustelin, T. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* **2004**, *117*, 699–711, doi:10.1016/j.cell.2004.05.018.
68. Barr, A.J.; Ugochukwu, E.; Lee, W.H.; King, O.N.F.; Filippakopoulos, P.; Alfano, I.; Savitsky, P.; Burgess-Brown, N.A.; Müller, S.; Knapp, S. Large-Scale Structural Analysis of the Classical Human Protein Tyrosine Phosphatome. *Cell* **2009**, *136*, 352, doi:10.1016/J.CELL.2008.11.038.
69. Uhrig, R.G.; Kerk, D.; Moorhead, G.B. Evolution of Bacterial-Like Phosphoprotein Phosphatases in Photosynthetic Eukaryotes Features Ancestral Mitochondrial or Archaeal Origin and Possible Lateral Gene Transfer. *Plant Physiol.* **2013**, *163*, 1829–1843, doi:10.1104/PP.113.224378.
70. Punthasee, P.; Laciak, A.R.; Cummings, A.H.; Ruddaraju, K.V.; Lewis, S.M.; Hillebrand, R.; Singh, H.; Tanner, J.J.; Gates, K.S. Covalent Allosteric Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) by an Inhibitor-Electrophile Conjugate. *Biochemistry* **2017**, *56*, doi:10.1021/acs.biochem.7b00151.
71. Chen, M.J.; Dixon, J.E.; Manning, G. *Genomics and Evolution of Protein Phosphatases*;
72. He, R.J.; Yu, Z.H.; Zhang, R.Y.; Zhang, Z.Y. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Therapeutic Targets. *Dev.* **2014**, *57*, 1227–1246, doi:10.1038/aps.2014.80.
73. Gulipalli, K.C.; Bodige, S.; Ravula, P.; Endoori, S.; Vanaja, G.R.; Suresh Babu, G.; Narendra Sharath Chandra, J.N.; Seelam, N. Design, Synthesis, in Silico and in Vitro Evaluation of Thiophene Derivatives: A Potent Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor and Anticancer Activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, doi:10.1016/j.bmcl.2017.05.047.
74. Lessard, L.; Stuiblé, M.; Tremblay, M.L. The Two Faces of PTP1B in Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 613–619, doi:10.1016/J.BBAPAP.2009.09.018.
75. Elson, A. Stepping out of the Shadows: Oncogenic and Tumor-Promoting Protein Tyrosine Phosphatases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *96*, 135–147, doi:10.1016/j.biocel.2017.09.013.
76. Kuban-Jankowska, A.; Kostrzewa, T.; Musiał, C.; Barone, G.; Lo-Bosco, G.; Lo-Celso, F.; Gorska-Ponikowska, M. Green Tea Catechins Induce Inhibition of Ptp1b Phosphatase in Breast Cancer Cells with Potent Anti-Cancer Properties: In Vitro Assay, Molecular Docking, and Dynamics Studies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–12, doi:10.3390/ANTIOX9121208.
77. Tonks, N.K. Protein Tyrosine Phosphatases: From Genes, to Function, to Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 833–846.

78. Alonso, A.; Pulido, R. The Extended Human PTPome: A Growing Tyrosine Phosphatase Family. *FEBS J.* **2016**, *283*, 1404–1429, doi:10.1111/febs.13600.
79. Modi, V.; Xu, Q.; Adhikari, S.; Dunbrack, R.L. Assessment of Template-Based Modeling of Protein Structure in CASP11. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2016**, *84*, 200–220, doi:10.1002/prot.25049.
80. Pulido, R.; Lang, R. Dual Specificity Phosphatases: From Molecular Mechanisms to Biological Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4372, doi:10.3390/IJMS20184372.
81. Pulido, R.; Stoker, A.W.; Hendriks, W.J.A.J. PTPs Emerge as PIPs: Protein Tyrosine Phosphatases with Lipid-Phosphatase Activities in Human Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, doi:10.1093/HMG/DDT347.
82. Baskaran, S.K.; Goswami, N.; Selvaraj, S.; Muthusamy, V.S.; Lakshmi, B.S. Molecular Dynamics Approach to Probe the Allosteric Inhibition of PTP1B by Chlorogenic and Cichoric Acid. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2004–2012, doi:10.1021/CI200581G/SUPPL_FILE/CI200581G_SI_001.PDF.
83. SarathKumar, B.; Lakshmi, B.S. In Silico Investigations on the Binding Efficacy and Allosteric Mechanism of Six Different Natural Product Compounds towards PTP1B Inhibition through Docking and Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Model.* **2019**, *25*, doi:10.1007/s00894-019-4172-7.
84. Coronell-Tovar, A.; Cortés-Benítez, F.; González-Andrade, M. The Importance of Including the C-Terminal Domain of PTP1B1-400 to Identify Potential Antidiabetic Inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38*, 2170369, doi:10.1080/14756366.2023.2170369.
85. Anderie, I.; Schulz, I.; Schmid, A. Characterization of the C-Terminal ER Membrane Anchor of PTP1B. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 3189–3197, doi:10.1016/J.YEXCR.2007.05.025.
86. Fueller, J.; Egorov, M. V.; Walther, K.A.; Sabet, O.; Mallah, J.; Grabenbauer, M.; Kinkhabwala, A. Subcellular Partitioning of Protein Tyrosine Phosphatase 1b to the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Dependssensitively on the Composition of Its Tail Anchor. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–31, doi:10.1371/journal.pone.0139429.
87. Shifrin, V.I.; Neel, B.G. Growth Factor-Inducible Alternative Splicing of Nontransmembrane Phosphotyrosine Phosphatase PTP-1B Pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25376–25384, doi:10.1016/S0021-9258(19)74402-0.
88. Frangioni, J. V.; Beahm, P.H.; Shifrin, V.; Jost, C.A.; Neel, B.G. The Nontransmembrane Tyrosine Phosphatase PTP-1B Localizes to the Endoplasmic Reticulum via Its 35 Amino Acid C-Terminal Sequence. *Cell* **1992**, *68*, 545–560, doi:10.1016/0092-8674(92)90190-N.
89. Chernoff, J.; Schievella, A.R.; Jostf, C.A.; Erikson, R.L.; Neeli, B.G.; Charbonneau, H.; Tonks, N.K.; Kumar, S.; Diltz, C.D.; Krebs, D.E.; et al. Cloning of a cDNA for a Major Human Protein-Tyrosine-Phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2735–2739.
90. Guan, K.; Haun, R.S.; Watson, S.J.; Geahlen, R.L.; Dixon, J.E. Cloning and Expression of a Protein-Tyrosine-Phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 1501, doi:10.1073/PNAS.87.4.1501.
91. Bakke, J.; Haj, F.G. Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Substrates and Metabolic Regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *37*, 58–65, doi:10.1016/j.semcd.2014.09.020.
92. Owen, C.; Lees, E.K.; Mody, N.; Delibegović, M. Regulation of Growth Hormone Induced JAK2 and MTOR Signalling by Hepatic Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Diabetes Metab.* **2015**, *41*, 95–101, doi:10.1016/J.DIABET.2014.02.008.
93. Pan, J.; Zhou, L.; Zhang, C.; Xu, Q.; Sun, Y. Targeting Protein Phosphatases for the Treatment of Inflammation-Related Diseases: From Signaling to Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 1–24, doi:10.1038/s41392-022-01038-3.
94. Thompson, D.; Morrice, N.; Grant, L.; Le Sommer, S.; Lees, E.K.; Mody, N.; Wilson, H.M.; Delibegovic, M. Pharmacological Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Protects against Atherosclerotic Plaque Formation in the LDLR^{-/-} Mouse Model of Atherosclerosis. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 2489–2501, doi:10.1042/CS20171066.
95. Zhang, L.; Qin, Z.; Sharmin, F.; Lin, W.; Ricke, K.M.; Zasloff, M.A.; Stewart, A.F.R.; Chen, H.H. Tyrosine Phosphatase PTP1B Impairs Presynaptic NMDA Receptor-Mediated Plasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Dis.* **2021**, *156*, 105402, doi:10.1016/J.NBD.2021.105402.
96. Vieira, M.N.N.; Lyra e Silva, N.M.; Ferreira, S.T.; De Felice, F.G. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Potential Target for Alzheimer's Therapy? *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, doi:10.3389/FNAGI.2017.00007.
97. Yip, S.C.; Saha, S.; Chernoff, J. PTP1B: A Double Agent in Metabolism and Oncogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 442–449, doi:10.1016/j.tibs.2010.03.004.
98. Anderie, I.; Schulz, I.; Schmid, A. Direct Interaction between ER Membrane-Bound PTP1B and Its Plasma Membrane-Anchored Targets. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 582–592, doi:10.1016/j.cellsig.2006.08.007.
99. Reddy, R.H.; Kim, H.; Cha, S.; Lee, B.; Kim, Y.J. Structure-Based Virtual Screening of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors: Significance, Challenges, and Solutions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 878–895, doi:10.4014/jmb.1701.01079.
100. Tonks, N.K.; Diltz, C.D.; Fischer, E.H. Characterization of the Major Protein-Tyrosine-Phosphatases of Human Placenta. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6731–6737, doi:10.1016/S0021-9258(18)68703-4.
101. Buckley, D.A.; Cheng, A.; Kiely, P.A.; Tremblay, M.L.; O'Connor, R. Regulation of Insulin-Like Growth Factor Type I (IGF-I) Receptor Kinase Activity by Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP-1B) and Enhanced IGF-I-Mediated Suppression of Apoptosis and Motility in PTP-1B-Deficient Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 1998–2010, doi:10.1128/MCB.22.7.1998-2010.2002/ASSET/B16FE323-7D19-4490-A64A-7AF675767E43/ASSETS/GRAPHIC/MB0720920008.JPEG.
102. Kenner, K.A.; Anyanwu, E.; Olefsky, J.M.; Kusari, J. Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Is a Negative Regulator of Insulin- and Insulin-like Growth Factor-I-Stimulated Signaling. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19810–19816, doi:10.1074/jbc.271.33.19810.
103. Klamann, L.D.; Boss, O.; Peroni, O.D.; Kim, J.K.; Martino, J.L.; Zabolotny, J.M.; Moghal, N.; Lubkin, M.; Kim, Y.-B.; Sharpe, A.H.; et al. Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin

- Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 5479–5489, doi:10.1128/MCB.20.15.5479-5489.2000/ASSET/DF9129DF-2537-47B2-A6A9-E00B743DC28D/ASSETS/GRAPHIC/MB1500454008.JPEG.
104. Dubé, N.; Tremblay, M.L. Involvement of the Small Protein Tyrosine Phosphatases TC-PTP and PTP1B in Signal Transduction and Diseases: From Diabetes, Obesity to Cell Cycle, and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, *1754*, 108–117, doi:10.1016/J.BBAPAP.2005.07.030.
 105. Goldstein, B.J.; Bittner-Kowalczyk, A.; White, M.F.; Harbeck, M. Tyrosine Dephosphorylation and Deactivation of Insulin Receptor Substrate-1 by Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. Possible Facilitation by the Formation of a Ternary Complex with the Grb2 Adaptor Protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4283–4289, doi:10.1074/JBC.275.6.4283.
 106. Goldstein, B.J.; Li, P.M.; Ding, W.; Ahmad, F.; Zhang, W.R. Regulation of Insulin Action by Protein Tyrosine Phosphatases. *Vitam. Horm.* **1998**, *54*, 67–96, doi:10.1016/S0083-6729(08)60922-X.
 107. Agouni, A.; Mody, N.; Owen, C.; Czopek, A.; Zimmer, D.; Bentires-Alj, M.; Bence, K.K.; Delibegović, M. Liver-Specific Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) 1B Improves Obesity- and Pharmacologically Induced Endoplasmic Reticulum Stress. *Biochem. J.* **2011**, *438*, 369–378, doi:10.1042/BJ20110373.
 108. Delibegovic, M.; Zimmer, D.; Kauffman, C.; Rak, K.; Hong, E.G.; Cho, Y.R.; Kim, J.K.; Kahn, B.B.; Neel, B.G.; Bence, K.K. Liver-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Improves Metabolic Syndrome and Attenuates Diet-Induced Endoplasmic Reticulum Stress. *Diabetes* **2009**, *58*, 590, doi:10.2337/DB08-0913.
 109. Feldhammer, M.; Uetani, N.; Miranda-Saavedra, D.; Tremblay, M.L. Ptp1b: A Simple Enzyme for a Complex World. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *48*, 430–445, doi:10.3109/10409238.2013.819830/SUPPL_FILE/IBMG_A_819830_SM0002.MP4.
 110. Krishnan, N.; Fu, C.; Pappin, D.J.; Tonks, N.K. H2S-Induced Sulfhydration of the Phosphatase PTP1B and Its Role in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Sci. Signal.* **2011**, *4*, doi:10.1126/SCISIGNAL.2002329.
 111. Xu, Q.; Wu, N.; Li, X.; Guo, C.; Li, C.; Jiang, B.; Wang, H.; Shi, D. Inhibition of PTP1B Blocks Pancreatic Cancer Progression by Targeting the PKM2/AMPK/MTOC1 Pathway. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 1–15, doi:10.1038/s41419-019-2073-4.
 112. Zhang, Z.; Deng, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; Sun, L.; Chen, F. PKM2, Function and Expression and Regulation. *Cell Biosci.* **2019**, *9*, 1–25, doi:10.1186/S13578-019-0317-8.
 113. Zhang, Z.Y.; Maclean, D.; McNamara, D.J.; Sawyer, T.K.; Dixon, J.E. Protein Tyrosine Phosphatase Substrate Specificity: Size and Phosphotyrosine Positioning Requirements in Peptide Substrates. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2285–2290, doi:10.1021/bi00174a040.
 114. Hubbard, S.R.; Wei, L.; Hendrickson, W.A. Crystal Structure of the Tyrosine Kinase Domain of the Human Insulin Receptor. *Nat.* **1994**, *372*, 746–754, doi:10.1038/372746a0.
 115. Bryant, N.J.; Govers, R.; James, D.E. Regulated Transport of the Glucose Transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 267–277, doi:10.1038/nrm782.
 116. Sasaoka, T.; Draznin, B.; Leitner, J.W.; Langlois, W.J.; Olefsky, J.M. Shc Is the Predominant Signaling Molecule Coupling Insulin Receptors to Activation of Guanine Nucleotide Releasing Factor and P21ras-GTP Formation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10734–10738, doi:10.1016/S0021-9258(17)34120-0.
 117. He, W.; O'Neill, T.J.; Gustafson, T.A. Distinct Modes of Interaction of SHC and Insulin Receptor Substrate-1 with the Insulin Receptor NPEY Region via Non-SH2 Domains. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23258–23262, doi:10.1074/jbc.270.40.23258.
 118. Ahmed, S.B.M.; Prigent, S.A. Insights into the Shc Family of Adaptor Proteins. *J. Mol. Signal.* **2017**, *12*, 1–17, doi:10.5334/1750-2187-12-2.
 119. Long, Y.C.; Cheng, Z.; Copps, K.D.; White, M.F. Insulin Receptor Substrates Irs1 and Irs2 Coordinate Skeletal Muscle Growth and Metabolism via the Akt and AMPK Pathways. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 430–441, doi:10.1128/mcb.00983-10.
 120. Eckstein, S.S.; Weigert, C.; Lehmann, R. Divergent Roles of IRS (Insulin Receptor Substrate) 1 and 2 in Liver and Skeletal Muscle. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, doi:10.2174/0929867324666170426142826.
 121. Kraut-Cohen, J.; Muller, W.J.; Elson, A. Protein-Tyrosine Phosphatase ϵ Regulates Shc Signaling in a Kinase-Specific Manner: INCREASING COHERENCE IN TYROSINE PHOSPHATASE SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 4612–4621, doi:10.1074/JBC.M708822200.
 122. Guo, Y.; Pan, W.; Liu, S.; Shen, Z.; Xu, Y.; Hu, L. ERK/MAPK Signalling Pathway and Tumorigenesis (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 1997–2007, doi:10.3892/ETM.2020.8454.
 123. Long, H.Z.; Cheng, Y.; Zhou, Z.W.; Luo, H.Y.; Wen, D.D.; Gao, L.C. PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 619, doi:10.3389/FPHAR.2021.648636/BIBTEX.
 124. Hemmings, B.A.; Restuccia, D.F. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A011189.
 125. Huang, X.; Liu, G.; Guo, J.; Su, Z.Q. The PI3K/AKT Pathway in Obesity and Type 2 Diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 1483, doi:10.7150/IJBS.27173.
 126. Shi, X.; Wang, J.; Lei, Y.; Cong, C.; Tan, D.; Zhou, X. Research Progress on the PI3K/AKT Signaling Pathway in Gynecological Cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 4529–4535, doi:10.3892/MMR.2019.10121/HTML.
 127. Mueckler, M.; Thorens, B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 121–138, doi:10.1016/J.MAM.2012.07.001.
 128. Manning, B.D.; Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381, doi:10.1016/J.CELL.2017.04.001.
 129. Govers, R. Cellular Regulation of Glucose Uptake by Glucose Transporter GLUT4. *Adv. Clin. Chem.* **2014**, *66*, 173–240, doi:10.1016/B978-0-12-801401-1.00006-2.
 130. Park, H.K.; Ahima, R.S. Leptin Signaling. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*, doi:10.12703/P6-73.

131. Liu, H.; Du, T.; Li, C.; Yang, G. STAT3 Phosphorylation in Central Leptin Resistance. *Nutr. Metab.* **2021**, *18*, 1–13, doi:10.1186/S12986-021-00569-W.
132. Abella, V.; Scotece, M.; Conde, J.; Pino, J.; Gonzalez-Gay, M.A.; Gómez-Reino, J.J.; Mera, A.; Lago, F.; Gómez, R.; Gualillo, O. Leptin in the Interplay of Inflammation, Metabolism and Immune System Disorders. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 100–109, doi:10.1038/nrrheum.2016.209.
133. Zhou, Y.; Chen, J.J. STAT3 Plays an Important Role in DNA Replication by Turning on WDHD1. *Cell Biosci.* **2021**, *11*, 1–10, doi:10.1186/S13578-020-00524-X/TABLES/1.
134. Carpenter, R.L.; Lo, H.W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers (Basel)*. **2014**, *6*, 897–925, doi:10.3390/CANCERS6020897.
135. Kostrzewa, T.; Sahu, K.K.; Gorska-Ponikowska, M.; Tuszyński, J.A.; Kuban-Jankowska, A. Synthesis of Small Peptide Compounds, Molecular Docking, and Inhibitory Activity Evaluation against Phosphatases PTP1B and SHP2. *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 4139–4147, doi:10.2147/DDDT.S186614.
136. Dubé, N.; Cheng, A.; Tremblay, M.L. The Role of Protein Tyrosine Phosphatase 1B in Ras Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 1834–1839, doi:10.1073/pnas.0304242101.
137. Balavenkatraman, K.K.; Aceto, N.; Britschgi, A.; Mueller, U.; Bence, K.K.; Neel, B.G.; Bentires-Alj, M. Epithelial Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Contributes to the Induction of Mammary Tumors by HER2/Neu but Is Not Essential for Tumor Maintenance. *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 1377, doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0198.
138. Mertins, P.; Eberl, H.C.; Renkawitz, J.; Olsen, J. V.; Tremblay, M.L.; Mann, M.; Ullrich, A.; Daubt, H. Investigation of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Function by Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1763–1777, doi:10.1074/MCP.M800196-MCP200.
139. Mullard, A. Phosphatases Start Shedding Their Stigma of Undruggability. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 847–850, doi:10.1038/NRD.2018.201.
140. Sun, Q.; He, M.; Zhang, M.; Zeng, S.; Chen, L.; Zhou, L.; Xu, H. Ursolic Acid: A Systematic Review of Its Pharmacology, Toxicity and Rethink on Its Pharmacokinetics Based on PK-PD Model. *Fitoterapia* **2020**, *147*, doi:10.1016/J.FITOTE.2020.104735.
141. Zhang, X.; Tian, J.; Li, J.; Huang, L.; Wu, S.; Liang, W.; Zhong, L.; Ye, J.; Ye, F. A Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor with Therapeutic Potential for Insulin Resistance. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 1939–1949, doi:10.1111/bph.13483.
142. Ito, M.; Fukuda, S.; Sakata, S.; Morinaga, H.; Ohta, T. Pharmacological Effects of Jtt-551, a Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1b Inhibitor, in Diet-Induced Obesity Mice. *J. Diabetes Res.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/680348.
143. Tian Zhao, B.; Hung Nguyen, D.; Mi Lee, B.; Hui Seong, S.; Sue Choi, J.; Sun Min, B.; Hee Woo, M. PTP1B Inhibitory and Cytotoxic Activities of Triterpenoids from the Aerial Parts of *Agrimonia Pilosa*. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 2870–2878, doi:10.1007/S00044-017-1986-7/TABLES/3.
144. Luo, J.; Zheng, M.; Jiang, B.; Li, C.; Guo, S.; Wang, L.; Li, X.; Yu, R.; Shi, D. Antidiabetic Activity in Vitro and in Vivo of BDB, a Selective Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatase 1B, from *Rhodomela Confervoides*. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 4464–4480, doi:10.1111/BPH.15195.
145. Johnson, T.O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M.R. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 696–709, doi:10.1038/nrd895.
146. Hussain, H.; Green, I.R.; Abbas, G.; Adekenov, S.M.; Hussain, W.; Ali, I. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitors as Potential Anti-Diabetes Agents: Patent Review (2015-2018). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2019**, *29*, 689–702.
147. Tamrakar, A.K.; Maurya, C.K.; Rai, A.K. PTP1B Inhibitors for Type 2 Diabetes Treatment: A Patent Review (2011 - 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 1101–1115, doi:10.1517/13543776.2014.947268.
148. Verma, M.; Gupta, S.J.; Chaudhary, A.; Garg, V.K. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors as Antidiabetic Agents – A Brief Review. *Bioorg. Chem.* **2017**, *70*, 267–283.
149. Liu, J.Z.; Zhang, S.E.; Nie, F.; Yang, Y.; Tang, Y.B.; Yin, W.; Tian, J.Y.; Ye, F.; Xiao, Z. Discovery of Novel PTP1B Inhibitors via Pharmacophore-Oriented Scaffold Hopping from Ertiprotafib. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6217–6222, doi:10.1016/j.bmcl.2013.10.002.
150. Yang, Y.; Tian, J.-Y.; Ye, F.; Xiao, Z. Identification of Natural Products as Selective PTP1B Inhibitors via Virtual Screening. *Bioorg. Chem.* **2020**, *98*, doi:10.1016/j.bioorg.2020.103706.
151. Khan, M.F.; Azad, C.S.; Kumar, A.; Saini, M.; Narula, A.K.; Jain, S. Novel Imbricatolic Acid Derivatives as Protein Tyrosine Phosphatase-1B Inhibitors: Design, Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1988–1992, doi:10.1016/j.bmcl.2016.03.003.
152. Kostrzewa, T.; Przychodzen, P.; Gorska-Ponikowska, M.; Kuban-Jankowska, A. Curcumin and Cinnamaldehyde as PTP1B Inhibitors With Antidiabetic and Anticancer Potential. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 745–749, doi:10.21873/ANTICANRES.13171.
153. Ha, M.T.; Shrestha, S.; Tran, T.H.; Kim, J.A.; Woo, M.H.; Choi, J.S.; Min, B.S. Inhibition of PTP1B by Farnesylated 2-Arylbenzofurans Isolated from *Morus Alba* Root Bark: Unraveling the Mechanism of Inhibition Based on in Vitro and in Silico Studies. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 961–975, doi:10.1007/S12272-020-01269-4/TABLES/2.
154. Zhang, X.; Jiang, H.; Li, W.; Wang, J.; Cheng, M. Computational Insight into Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition: A Case Study of the Combined Ligand- and Structure-Based Approach. *Comput. Math. Methods Med.* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/4245613.
155. Lantz, K.A.; Hart, S.G.E.; Planey, S.L.; Roitman, M.F.; Ruiz-White, I.A.; Wolfe, H.R.; McLane, M.P. Inhibition of PTP1B by Trodusquemine (MSI-1436) Causes Fat-Specific Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice. *Obesity (Silver Spring)*. **2010**, *18*, 1516–1523, doi:10.1038/OBY.2009.444.
156. Muthusamy, V.S.; Saravanababu, C.; Ramanathan, M.; Bharathi Raja, R.; Sudhagar, S.; Anand, S.; Lakshmi, B.S. Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Regulation of Insulin Signalling Markers by Caffeoyl

- Derivatives of Chicory (*Cichorium Intybus*) Salad Leaves. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 813–823, doi:10.1017/S0007114510001480.
157. Gao, C.; Dai, F.J.; Cui, H.W.; Peng, S.H.; He, Y.; Wang, X.; Yi, Z.F.; Qiu, W.W. Synthesis of Novel Heterocyclic Ring-Fused 18 β -Glycyrrhetic Acid Derivatives with Antitumor and Antimetastatic Activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *84*, 223–233, doi:10.1111/CBDD.12308.
 158. LaMontagne, K.R.; Flint, A.J.; Franza, B.R.; Pendergast, A.M.; Tonks, N.K. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Antagonizes Signalling by Oncoprotein Tyrosine Kinase P210 Bcr-Abl in Vivo. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 2965–2975, doi:10.1128/MCB.18.5.2965.
 159. Liu, F.; Hill, D.E.; Chernoff, J. Direct Binding of the Proline-Rich Region of Protein Tyrosine Phosphatase 1B to the Src Homology 3 Domain of P130(Cas). *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31290–31295, doi:10.1074/JBC.271.49.31290.
 160. Hendriks, W.J.A.J.; Elson, A.; Harroch, S.; Pulido, R.; Stoker, A.; Den Hertog, J. Protein Tyrosine Phosphatases in Health and Disease. *FEBS J.* **2013**, *280*, 708–730.
 161. Erbe, D. V.; Wang, S.; Zhang, Y.L.; Harding, K.; Kung, L.; Tam, M.; Stolz, L.; Xing, Y.; Furey, S.; Qadri, A.; et al. Ertiprotafib Improves Glycemic Control and Lowers Lipids via Multiple Mechanisms. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 69–77, doi:10.1124/MOL.104.005553.
 162. Wrobel, J.; Sredy, J.; Moxham, C.; Dietrich, A.; Li, Z.; Sawicki, D.R.; Seestaller, L.; Wu, L.; Katz, A.; Sullivan, D.; et al. PTP1B Inhibition and Antihyperglycemic Activity in the Ob/Ob Mouse Model of Novel 11-Arylbenzo[b]Naphtho[2,3-d]Furans and 11-Arylbenzo[b]Naphtho[2,3-d]Thiophenes. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3199–3202, doi:10.1021/jm990260v.
 163. Kumar, A.; Rana, D.; Rana, R.; Bhatia, R. Protein Tyrosine Phosphatase (PTP1B): A Promising Drug Target Against Life-Threatening Ailments. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2019**, *13*, 17–30, doi:10.2174/1874467212666190724150723.
 164. Zhang, Y.; Du, Y. The Development of Protein Tyrosine Phosphatase1B Inhibitors Defined by Binding Sites in Crystalline Complexes. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 2345–2367, doi:10.4155/fmc-2018-0089.
 165. Rongjun He; Li-Fan Zeng; Yantao He; Zhong-Yin Zhang Recent Advances in PTP1B Inhibitor Development for the Treatment of Type-2 Diabetes and Obesity. In *New therapeutic strategies for type 2 diabetes: small molecule approaches*; Jones, R.M., Ed.; RSC Publishing - Royal Society of Chemistry: London, 2012; Vol. 53, pp. 142–146 ISBN 978-1-84973-414-1.
 166. De-La-cruz-martínez, L.; Duran-Becerra, C.; González-Andrade, M.; Páez-Franco, J.C.; Germán-Acacio, J.M.; Espinosa-Chávez, J.; Torres-Valencia, J.M.; Pérez-Villanueva, J.; Palacios-Espinosa, J.F.; Soria-Arteche, O.; et al. Indole- and Pyrazole-Glycyrrhetic Acid Derivatives as PTP1B Inhibitors: Synthesis, In Vitro and In Silico Studies. *Mol.* **2021**, *Vol. 26*, Page 4375 **2021**, *26*, 4375, doi:10.3390/MOLECULES26144375.
 167. Nandi, S.; Saxena, M. Potential Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP1B) Enzyme: Promising Target for Type-II Diabetes Mellitus. *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20*, 2692–2707, doi:10.2174/1568026620999200904121432.
 168. Patel, D.; Jain, M.; Shah, S.R.; Bahekar, R.; Jadav, P.; Joharapurkar, A.; Dhanesha, N.; Shaikh, M.; Sairam, K.V.V.M.; Kapadnis, P. Discovery of Potent, Selective and Orally Bioavailable Triaryl-Sulfonamide Based PTP1B Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1111–1117, doi:10.1016/j.bmcl.2011.11.122.
 169. Sarabia-Sánchez, M.J.; Trejo-Soto, P.J.; Velázquez-López, J.M.; Carvente-García, C.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Avitia-Domínguez, C.; Enríquez-Mendiola, D.; Sierra-Campos, E.; Valdez-Solana, M.; et al. Novel Mixed-Type Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. Kinetic and Computational Studies. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/MOLECULES22122262.
 170. Zhao, B.T.; Nguyen, D.H.; Le, D.D.; Choi, J.S.; Min, B.S.; Woo, M.H. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from Natural Sources. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41*.
 171. Chen, X.; Gan, Q.; Feng, C.; Zhang, Q.; Liu, X. Investigation of Selective Binding of Inhibitors to PTP1B and TCPTP by Accelerated Molecular Dynamics Simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37*, doi:10.1080/07391102.2018.1526117.
 172. Wiese, J.; Aldemir, H.; Schmaljohann, R.; Gulder, T.A.M.; Imhoff, J.F.; Kerr, R. Asperentin B, a New Inhibitor of the Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, doi:10.3390/md15060191.
 173. Zhang, Z.Y.; Lee, S.Y. PTP1B Inhibitors as Potential Therapeutics in the Treatment of Type 2 Diabetes and Obesity. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 223–233, doi:10.1517/13543784.12.2.223.
 174. Sun, J.; Qu, C.; Wang, Y.; Huang, H.; Zhang, M.; Li, H.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zou, W. PTP1B, A Potential Target of Type 2 Diabetes Mellitus. *Mol. Biol.* **2016**, *05*, 2–7, doi:10.4172/2168-9547.1000174.
 175. Koren, S.; Fantus, I.G. Inhibition of the Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B: Potential Therapy for Obesity, Insulin Resistance and Type-2 Diabetes Mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *21*, 621–640.
 176. Nichols, A.J.; Mashal, R.D.; Balkan, B. Toward the Discovery of Small Molecule PTP1B Inhibitors for the Treatment of Metabolic Diseases. In *Proceedings of the Drug Development Research*; July 2006; Vol. 67, pp. 559–566.
 177. Tonks, N.K.; Muthuswamy, S.K. A Brake Becomes an Accelerator: PTP1B—A New Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 214–216, doi:10.1016/J.CCR.2007.02.022.
 178. Yuan, C.; Wang, W.; Wang, J.; Li, X.; Wu, Y.B.; Li, S.; Lu, L.; Zhu, M.; Xing, S.; Fu, X. Potent and Selective PTP1B Inhibition by a Platinum(II) Complex: Possible Implications for a New Antitumor Strategy. *Chem. Commun.* **2019**, *56*, doi:10.1039/c9cc06972k.
 179. Xie, F.; Yang, F.; Liang, Y.; Li, L.; Xia, Y.; Jiang, F.; Liu, W.; Qi, Y.; Chowdhury, S.R.; Xie, D.; et al. Investigation of Stereoisomeric Bisarylethenesulfonic Acid Esters for Discovering Potent and Selective PTP1B Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *164*, 408–422, doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.032.
 180. Rao, G.S.; Ramachandran, M. V.; Bajaj, J.S. In Silico Structure-Based Design of a Potent and Selective Small Peptide Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatase 1b, a Novel Therapeutic Target for Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: A Computer Modeling Approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2006**, *23*, 377–384,

- doi:10.1080/07391102.2006.10531233.
181. Taylor, S.D.; Hill, B. Recent Advances in Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 199–214, doi:10.1517/13543784.13.3.199.
 182. Zhang, S.; Zhang, Z.Y. PTP1B as a Drug Target: Recent Developments in PTP1B Inhibitor Discovery. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 373–381, doi:10.1016/j.drudis.2007.03.011.
 183. Kumar, A.P.; Nguyen, M.N.; Verma, C.; Lukman, S. Structural Analysis of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Reveals Potentially Druggable Allosteric Binding Sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2018**, *86*, 301–321, doi:10.1002/PROT.25440.
 184. Liu, Z.; Gao, H.; Zhao, Z.; Huang, M.; Wang, S.; Zhan, J. Status of Research on Natural Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors as Potential Antidiabetic Agents: Update. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *157*, doi:10.1016/J.BIOPHA.2022.113990.
 185. Kyriakou, E. Natural Products and Derivatives as Novel Scaffolds Targeting PTP1B. **2017**.
 186. Kyriakou, E.; Schmidt, S.; Dodd, G.T.; Pfuhlmann, K.; Simonds, S.E.; Lenhart, D.; Geerlof, A.; Schriever, S.C.; De Angelis, M.; Schramm, K.W.; et al. Celastrol Promotes Weight Loss in Diet-Induced Obesity by Inhibiting the Protein Tyrosine Phosphatases PTP1B and TCPTP in the Hypothalamus. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 11144–11157, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01224.
 187. Liu, W.S.; Wang, R.R.; Yue, H.; Zheng, Z.H.; Lu, X.H.; Wang, S.Q.; Dong, W.L.; Wang, R.L. Design, Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Dynamics Studies of 4-Thiazolinone Derivatives as Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *38*, 3814–3824, doi:10.1080/07391102.2019.1664333.
 188. Luo, J.; Hou, Y.; Xie, M.; Ma, W.; Shi, D.; Jiang, B. CYC31, a Natural Bromophenol PTP1B Inhibitor, Activates Insulin Signaling and Improves Long Chain-Fatty Acid Oxidation in C2C12 Myotubes. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, doi:10.3390/md18050267.
 189. Sohail, A.; Fayyaz, H.; Muneer, H.; Raza, I.; Ikram, M.; Uddin, Z.; Gul, S.; Almohaimeed, H.M.; Alsharif, I.; Alaryani, F.S.; et al. Targeted Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by Viscosol Ameliorates Type 2 Diabetes Pathophysiology and Histology in Diabetic Mouse Model. *Biomed Res. Int.* **2022**, *2022*, doi:10.1155/2022/2323078.
 190. Verma, M.; Gupta, S.J.; Chaudhary, A.; Garg, V.K. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors as Antidiabetic Agents – A Brief Review. *Bioorg. Chem.* **2017**, *70*, 267–283, doi:10.1016/J.BIOORG.2016.12.004.
 191. Lipchock, J.M.; Hendrickson, H.P.; Douglas, B.B.; Bird, K.E.; Ginther, P.S.; Rivalta, I.; Ten, N.S.; Batista, V.S.; Loria, J.P. Characterization of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition by Chlorogenic Acid and Cichoric Acid. *Biochemistry* **2017**, *56*, 96–106, doi:10.1021/ACS.BIOCHEM.6B01025/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2016-01025J_0007.JPEG.
 192. Duarte, A.M.; Guarino, M.P.; Barroso, S.; Gil, M.M. Phytopharmacological Strategies in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Foods* **2020**, *Vol. 9*, Page 271 **2020**, *9*, 271, doi:10.3390/FOODS9030271.
 193. Kashyap, D.; Tuli, H.S.; Sharma, A.K. Ursolic Acid (UA): A Metabolite with Promising Therapeutic Potential. *Life Sci.* **2016**, *146*, 201–213, doi:10.1016/j.lfs.2016.01.017.
 194. Tan, X.F.; Uddin, Z.; Park, C.; Song, Y.H.; Son, M.; Lee, K.W.; Park, K.H. Competitive Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitors, Prenylated Caged Xanthenes from *Garcinia Hanburyi* and Their Inhibitory Mechanism. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25*, doi:10.1016/j.bmc.2017.03.010.
 195. Tian Zhao, B.; Hung Nguyen, D.; Mi Lee, B.; Hui Seong, S.; Sue Choi, J.; Sun Min, B.; Hee Woo, M. PTP1B Inhibitory and Cytotoxic Activities of Triterpenoids from the Aerial Parts of *Agrimonia Pilosa*. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 2870–2878, doi:10.1007/S00044-017-1986-7/TABLES/3.
 196. Sarfraz, I.; Rasul, A.; Ucak, I.; Lai, N.S.; Asrar, M.; Adem, Ş. Enzyme Assay Techniques and Protocols. *Anal. Tech. Biosci. from Basics to Appl.* **2022**, 191–199, doi:10.1016/B978-0-12-822654-4.00012-9.
 197. MarÉchal, E. Measuring Bioactivity: KI, IC50 and EC50. *Chemogenomics Chem. Genet.* **2011**, *55–65*, doi:10.1007/978-3-642-19615-7_5.
 198. Holdgate, G.A.; Meek, T.D.; Grimley, R.L. Mechanistic Enzymology in Drug Discovery: A Fresh Perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *17*, 115–132, doi:10.1038/nrd.2017.219.
 199. Holdgate, G.A. Kinetics, Thermodynamics, and Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Compr. Med. Chem. III* **2017**, *2–8*, 180–211, doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12318-2.
 200. Yung-Chi, C.; Prusoff, W.H. Relationship between the Inhibition Constant (K1) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108, doi:10.1016/0006-2952(73)90196-2.
 201. Kallioikoski, T.; Kramer, C.; Vulpetti, A.; Gedeck, P. Comparability of Mixed IC50 Data – A Statistical Analysis. *PLoS One* **2013**, *8*, e61007, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0061007.
 202. Aykul, S.; Martinez-Hackert, E. Determination of Half-Maximal Inhibitory Concentration Using Biosensor-Based Protein Interaction Analysis. *Anal. Biochem.* **2016**, *508*, 97–103, doi:10.1016/J.AB.2016.06.025.
 203. Lubben, T.; Clampit, J.; Stashko, M.; Trevillyan, J.; Jirousek, M.R. In Vitro Enzymatic Assays of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2001**, *13*, 3.8.1–3.8.18, doi:10.1002/0471141755.PH0308S13.
 204. Picha, K.M.; Patel, S.S.; Mandiyan, S.; Koehn, J.; Wennogle, L.P. The Role of the C-Terminal Domain of Protein Tyrosine Phosphatase-1B in Phosphatase Activity and Substrate Binding *. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2911–2917, doi:10.1074/JBC.M610096200.
 205. Martin, K.R.; Narang, P.; Xu, Y.; Kauffman, A.L.; Petit, J.; Xu, H.E.; Meurice, N.; MacKeigan, J.P. Identification of Small Molecule Inhibitors of PTPσ through an Integrative Virtual and Biochemical Approach. *PLoS One* **2012**, *7*, 50217, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0050217.
 206. Reymond, J.L. The Chemical Space Project. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 722–730, doi:10.1021/AR500432K/ASSET/IMAGES/LARGE/AR-2014-00432K_0003.JPEG.
 207. Sadybekov, A. V.; Katritch, V. Computational Approaches Streamlining Drug Discovery. *Nat.* **2023**, *616*, 673–685, doi:10.1038/s41586-023-05905-z.

208. Kontoyianni, M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1647*, 255–266, doi:10.1007/978-1-4939-7201-2_18/COVER.
209. Hongdusit, A.; Zwart, P.H.; Sankaran, B.; Fox, J.M. Minimally Disruptive Optical Control of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–11, doi:10.1038/s41467-020-14567-8.
210. McCain, D.F.; Wu, L.; Nickel, P.; Kassack, M.U.; Kreimeyer, A.; Gagliardi, A.; Collins, D.C.; Zhang, Z.Y. Suramin Derivatives as Inhibitors and Activators of Protein-Tyrosine Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14713–14725, doi:10.1074/jbc.M312488200.
211. Mahapatra, M.K.; Kumar, R.; Kumar, M. N-Alkylated Thiazolidine-2,4-Dione Analogs as PTP1B Inhibitors: Synthesis, Biological Activity, and Docking Studies. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 1176–1183, doi:10.1007/S00044-017-1823-Z/FIGURES/4.
212. He, X.F.; Chen, J.J.; Huang, X.Y.; Hu, J.; Zhang, X.K.; Guo, Y.Q.; Zhang, X.M.; Geng, C.A. The Antidiabetic Potency of Amomum Tsao-Ko and Its Active Flavanols, as PTP1B Selective and α -Glucosidase Dual Inhibitors. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *160*, 112908, doi:10.1016/J.INDCROP.2020.112908.
213. Basith, S.; Cui, M.; Macalino, S.J.Y.; Park, J.; Clavio, N.A.B.; Kang, S.; Choi, S. Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
214. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nat.* **2021**, *596*, 583–589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
215. Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D439–D444, doi:10.1093/NAR/GKAB1061.
216. Yildirim, I.; Kennedy, S.D.; Stern, H.A.; Hart, J.M.; Kierzek, R.; Turner, D.H. Revision of AMBER Torsional Parameters for RNA Improves Free Energy Predictions for Tetramer Duplexes with GC and IGiC Base Pairs. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 172–181, doi:10.1021/ct200557r.
217. D.A. Case; K. Belfon; I.Y. Ben-Shalom; S.R. Brozell; D.S. Cerutti; T.E. Cheatham; III; V.W.D. Cruzeiro; T.A. Darden; R.E. Duke; et al. AMBER 2020 Available online: <https://ambermd.org/AmberTools.php> (accessed on 18 June 2020).
218. Pethe, M.A.; Rubenstein, A.B.; Khare, S.D. Large-Scale Structure-Based Prediction and Identification of Novel Protease Substrates Using Computational Protein Design. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 220–236, doi:10.1016/j.jmb.2016.11.031.
219. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247–260, doi:10.1016/J.JMGM.2005.12.005.
220. Case, D.A.; Berryman, J.; Betz, R.M.; Cerutti, D.S.; Cheatham III, T.E.; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Giese, T.J.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; et al. AMBER 2015; University of California, San Francisco, United States - California, 2015;
221. Case, D.A.; Cheatham, T.E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K.M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688, doi:10.1002/JCC.20290.
222. Izadi, S.; Onufriev, A. V. Accuracy Limit of Rigid 3-Point Water Models. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 74501, doi:10.1063/1.4960175.
223. Elber, R.; Ruymgaart, A.P.; Hess, B. SHAKE Parallelization. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* **2011**, *200*, 211, doi:10.1140/EPJST/E2011-01525-9.
224. Salomon-Ferrer, R.; Case, D.A.; Walker, R.C. An Overview of the Amber Biomolecular Simulation Package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2013**, *3*, 198–210, doi:10.1002/wcms.1121.
225. Walker, R.C.; Crowley, I.F.; Case, D.A. The Implementation of a Fast and Accurate QM/MM Potential Method in Amber. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1019–1031, doi:10.1002/JCC.20857.
226. Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J.L.; Dror, R.O.; Shaw, D.E. Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber F99SB Protein Force Field. *Proteins* **2010**, *78*, 1950–1958, doi:10.1002/PROT.22711.
227. Thomas, A.S.; Mao, S.; Elcock, A.H. Flexibility of the Bacterial Chaperone Trigger Factor in Microsecond-Timescale Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 732–744, doi:10.1016/J.BPJ.2013.06.028.
228. Salomon-Ferrer, R.; Götz, A.W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R.C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3878–3888, doi:10.1021/CT400314Y/SUPPL_FILE/CT400314Y_SI_001.PDF.
229. Li, H.; Leung, K.S.; Wong, M.H. Idock: A Multithreaded Virtual Screening Tool for Flexible Ligand Docking. *2012 IEEE Symp. Comput. Intell. Comput. Biol. CIBCB 2012* **2012**, *77–84*, doi:10.1109/CIBCB.2012.6217214.
230. ZHANG, X.Y.; LI, W.; WANG, J.; LI, N.; CHENG, M.S.; KOIKE, K. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activities of Ursane-Type Triterpenes from Chinese Raspberry, Fruits of Rubus Chingii. *Chin. J. Nat. Med.* **2019**, *17*, 15–21, doi:10.1016/S1875-5364(19)30004-4.
231. Zhao, B.T.; Nguyen, D.H.; Le, D.D.; Choi, J.S.; Min, B.S.; Woo, M.H. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from Natural Sources. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41*, 130–161.
232. Whiteley, C.G. Mechanistic and Kinetic Studies of Inhibition of Enzymes. *Cell Biochem. Biophys.* **2000**, *33*, 217–225, doi:10.1385/CBB:33:3:217/METRICS.
233. Krishnan, N.; Konidaris, K.F.; Gasser, G.; Tonks, N.K. A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the Protein-Tyrosine Phosphatase PTP1B Improves Insulin and Leptin Signaling in Animal Models. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 1517–1525, doi:10.1074/JBC.C117.819110.
234. Chio, C.M.; Yu, X.; Bishop, A.C. Rational Design of Allosteric-Inhibition Sites in Classical Protein Tyrosine Phosphatases. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23*, 2828–2838, doi:10.1016/j.bmc.2015.03.027.

235. Wang, L.J.; Jiang, B.; Wu, N.; Wang, S.Y.; Shi, D.Y. Natural and Semisynthetic Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitors as Anti-Diabetic Agents. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 48822–48834, doi:10.1039/C5RA01754H.
236. Hopkins, A.L.; Keserü, G.M.; Leeson, P.D.; Rees, D.C.; Reynolds, C.H. The Role of Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 105–121, doi:10.1038/NRD4163.
237. PubChem Collection of Freely Accessible Chemical Information Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 22 January 2021).
238. Senior, A.W.; Evans, R.; Jumper, J.; Kirkpatrick, J.; Sifre, L.; Green, T.; Qin, C.; Židek, A.; Nelson, A.W.R.; Bridgland, A.; et al. Improved Protein Structure Prediction Using Potentials from Deep Learning. *Nat.* **2020**, *577*, 706–710, doi:10.1038/s41586-019-1923-7.
239. Mao, F.; Ni, W.; Xu, X.; Wang, H.; Wang, J.; Ji, M.; Li, J. Chemical Structure-Related Drug-Like Criteria of Global Approved Drugs. *Molecules* **2016**, *21*, doi:10.3390/MOLECULES21010075.
240. RW, D.; KS, C.; SA, M.; JW, D.; DA, P. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7*, 473–493, doi:10.2174/1386207043328544.
241. Wang, L.-J.; Jiang, B.; Wu, N.; Wang, S.-Y.; Shi, D.-Y. *Small Molecules as Potent Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitors Documented in Patents from 2009 to 2013*; 2015; Vol. 15;.
242. Hussain, H.; Green, I.R.; Shamraiz, U.; Saleem, M.; Badshah, A.; Abbas, G.; Rehman, N.U.; Irshad, M. Therapeutic Potential of Glycyrrhetic Acids: A Patent Review (2010-2017). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 383–398, doi:10.1080/13543776.2018.1455828.
243. Zhang, Y.; Yang, S.; Zhang, M.; Wang, Z.; He, X.; Hou, Y.; Bai, G. Glycyrrhetic Acid Improves Insulin-Response Pathway by Regulating the Balance between the Ras/MAPK and PI3K/Akt Pathways. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/NU11030604.
244. Kalaiarasi, P.; Pugalendi, K.V. Antihyperglycemic Effect of 18 Beta-Glycyrrhetic Acid, Aglycone of Glycyrrhizin, on Streptozotocin-Diabetic Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *606*, 269–273, doi:10.1016/J.EJPHAR.2008.12.057.
245. Sen, S.; Roy, M.; Chakraborti, A.S. Ameliorative Effects of Glycyrrhizin on Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *63*, 287–296, doi:10.1111/J.2042-7158.2010.01217.X.
246. Jensen, C.X.J. *Biological Modeling and Simulation*; 2009; Vol. 84; ISBN 9780262195843.