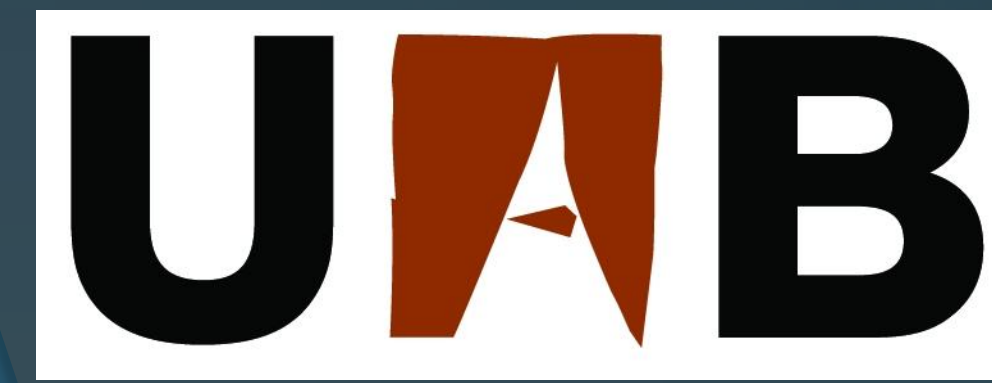


CARACTERIZACIÓN Y DISEÑO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.



INTERÉS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Daniel Balateu Paños (balateud@gmail.com)

Grado en Bioquímica - Universidad Autónoma de Barcelona

Bellaterra, Junio 2015

INTRODUCCIÓN

❖ Descubrimiento de sustancias bactericidas del sistema inmunitario conservadas evolutivamente en una gran variedad de especies; los péptidos antimicrobianos (AMPs) ¹. Dentro de los estos, se han caracterizado los *cationic antimicrobial peptides* (CAPs), péptidos con propiedades antitumorales ².

Características de los AMPs ³		Características de las células tumorales ²	Interacción electrostática ^{2,4} = MUERTE CELULAR
Sustancias aminoacídicas cortas (entre 10 y 50 aa) con carga positiva.	+	Presentan cargas aniónicas en su membrana por expresión de fosfatidil-Serina (las células sanas presentan fosfolípidos zwitteriónicos; carga neta nula).	Lisis directa → Se forman poros en la membrana y conduce a choque osmótico [Fig.1].
Amfipaticidad debido al 50% de regiones hidrofóbicas.		Presentan microvellosidades (+ superficie membranal que células sanas).	Inserción celular y desestructuración de la membrana mitocondrial (activa vía CytC y caspasas → apoptosis).
Papel quimiotáctico → Recluta neutrófilos y linfocitos B.		No presentan colesterol (permiten unión lipídica).	
Sensibilidad a proteasas y producción de efecto hemolítico.			

❖ En las últimas 2-3 décadas, ha aparecido resistencia a antibióticos y a tratamientos antitumorales convencionales (ej. quimioterapia). Esto es un problema de salud pública para el cual es importante encontrar soluciones terapéuticas alternativas → Interesante optimizar y sintetizar AMPs.

Efectos negativos de la quimioterapia ^{2,5}	Interés de los AMPs como agentes antitumorales ^{2,4}
<i>Multidrug resistance</i> de células cancerosas: <input type="checkbox"/> ↑ glicoproteína P (<i>drug transporter</i>) y ↑ Bcl2 (factor antiapoptótico). <input type="checkbox"/> Mutaciones inhibitoras de p53 (<i>tumor suppressor gene</i>).	No generan resistencia debido a: <input type="checkbox"/> Gran selectividad para células tumorales (no interaccionan con células sanas). <input type="checkbox"/> Su gran diversidad de estructuras (origen peptídico) y su corta longitud.
Citotoxicidad debida a la falta de selectividad (ataca a células tumorales y a células sanas).	Facilidad de modificación, inmovilización en superficies y síntesis <i>de novo</i> para: <input type="checkbox"/> ↑ Actividad anticancerígena <input type="checkbox"/> ↓ Proteólisis y efectos hemolíticos.

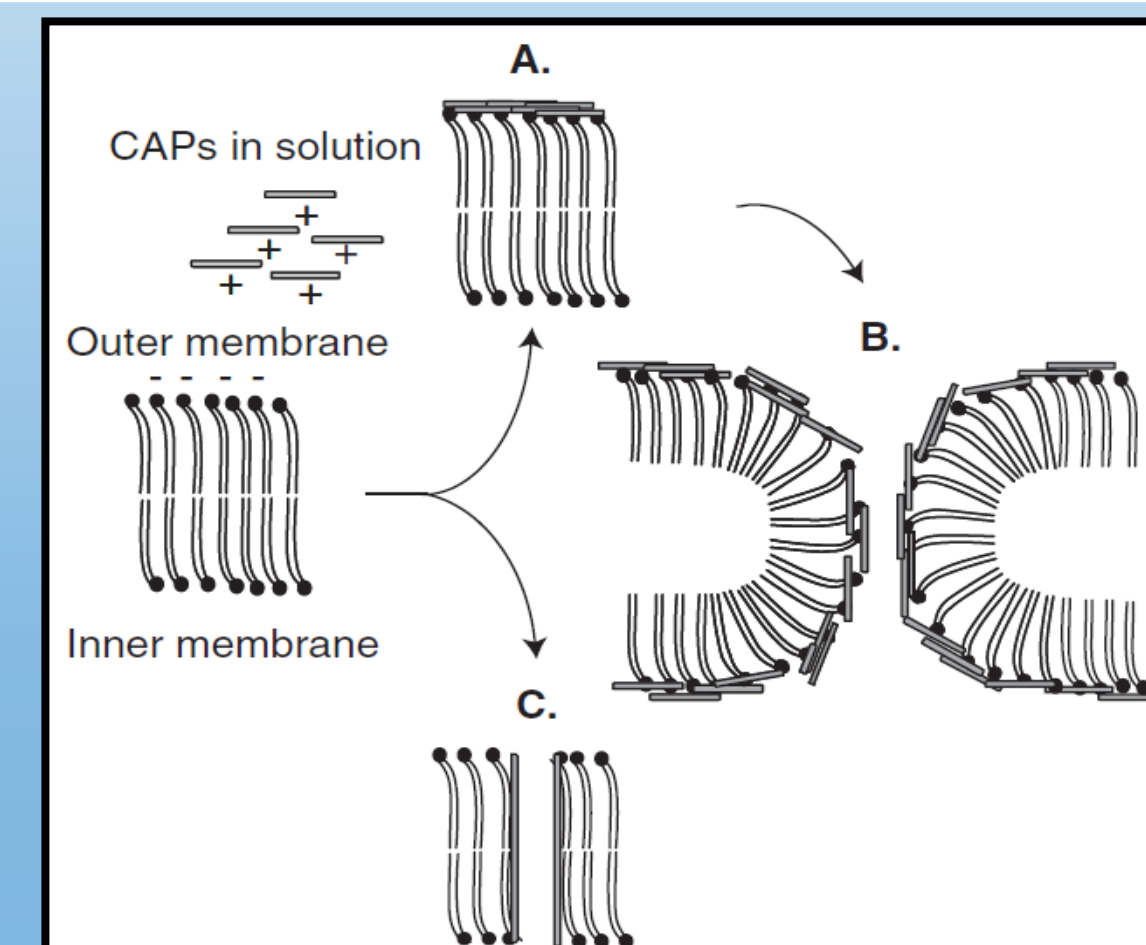


Figura 1. A) Interacción CAPs-membrana. B) *Barrel-stave model*, Monómeros de hélice-α que agregan en la membrana y cambian la permeabilidad. Provoca que se formen poros. C) *Carpet model*. Se agregan a la membrana en paralelo y forman capas hasta que una concentración crítica. Entonces producen la desintegración de la membrana celular

(*Imagen extraída de ⁷)

DISEÑO DE AMPs

❖ Para diseñar CAPs como fármacos se deben tener en cuenta distintos factores para llevar a cabo una síntesis correcta:

- ☐ Comprobar que tienen actividad antitumoral y que presentan una citotoxicidad baja.
- ☐ Poner énfasis en las características más esenciales para aumentar los beneficios.

❖ Existen distintos mecanismos para centrar el diseño:

MODIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE AMPs CONOCIDOS

❖ Identificación de las secuencias aminoacídicas responsables de ↑ actividad antitumoral y ↓ citotoxicidad en células sanas y la modificación de estos. Uso de estos *patterns* de secuencia para desarrollar péptidos *de novo* ⁴.

☐ Truncamiento del CAP conocido (solamente aa esenciales) → Menor longitud significa menos hemólisis (pero no pueden ser inferior a 8aa).

☐ Aumento de aminoácidos responsables de función en otras partes de la secuencia:

- ↑ Residuos catiónicos causa mayor selectividad membranal
- ↑ Residuos aromáticos permiten una mayor actividad lítica.

☐ Combinación de métodos de truncamiento y de adición a CAPs conocidos ⁵ para optimizar sus propiedades antitumorales y citotóxicas [Fig.2].

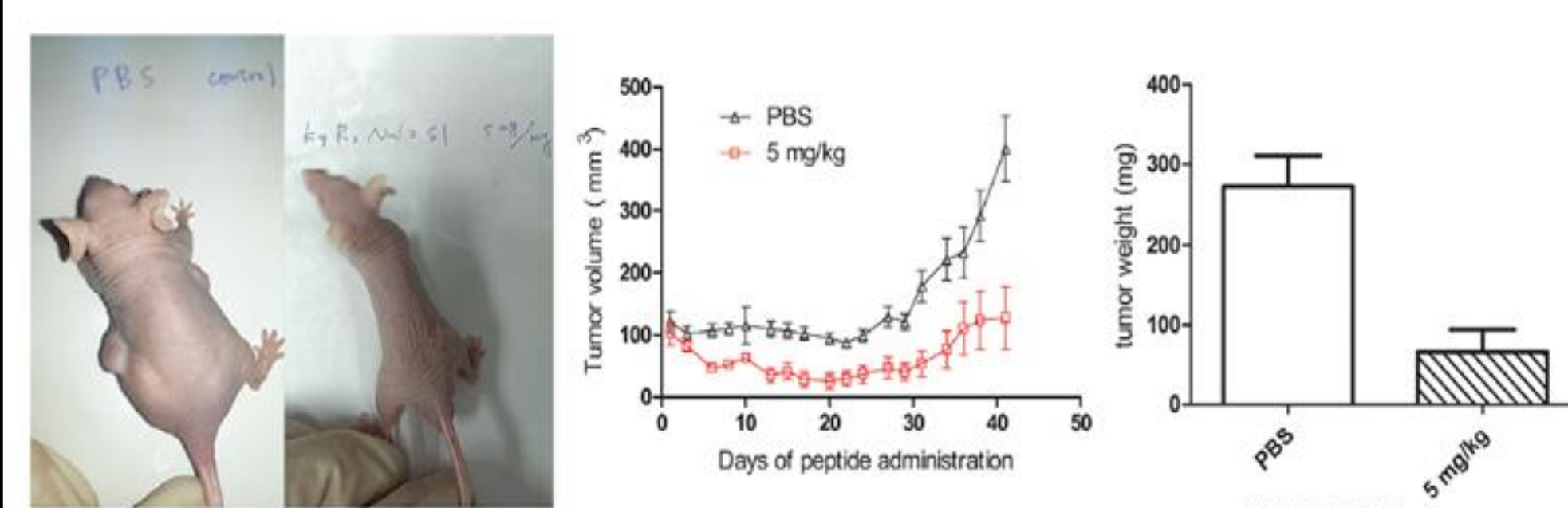


Figura 2. Combinación de *short cationic peptide* (K4R2) y aa aromáticos derivados de β-naftalaline en un CAP conocido (S1). Observación de la actividad del compuesto final K4R2-Nal-S1. A) Parte dorsal de ratones. Se observa la disminución de la masa tumoral en los ratones tratados. Comparación del volumen (B) y del peso (C) del tumor. Se observa la reducción de estos en los modelos animales tratados.

(*Imagen extraída de ⁵)

HIBRIDACIÓN O QUÍMERIZACIÓN PEPTÍDICA

❖ Método basado en la fusión de secuencias peptídicas de CAPs conocidos o de otros péptidos presentes en el organismo ^{6,7}. Permite:

- ☐ ↑ Propiedades anticancerosas
- ☐ ↓ Reducción de la citotoxicidad
- ☐ Direccionamiento mediante la combinación de secuencias *target* con CAPs para poder aumentar su selectividad en zonas específicas del organismo (tumor con angiogénesis o hormonodependiente).

❖ Ejemplos:

☐ Hibridación de Cecropina A con péptidos β-hairpin ⁷ → Reduce notablemente la hemólisis y aumenta de selectividad para células tumorales.

☐ Hibridación de un *short-lytic*-CAP con un péptido de unión a EGFR ⁶ → Permite el direccionamiento a angiogénesis (aumento de selectividad) en líneas tumorales humanas con K-Ras mutada o sin mutar (mutación que activa constitutivamente la vía de crecimiento Tyr-K aporta resistencia a quimioterapia) [Fig.3]

DISEÑO *de novo* POR SCREENING VIRTUAL

❖ Modelaje computacional que compara datos de escala molecular de distintos AMPs → Estimación cuantitativa de las propiedades fisicoquímicas y su actividad mediante estudios SAR (*structure-activity relation*) ³.

❖ Son predicciones informáticas, por lo que se requiere la comparación con CAPs naturales para determinar si realmente se han mejorado sus características ⁴.

☐ Diseño computacional de HFUs (*helix forming units*) formadas por un *cuore* tripeptídico de Phe, Ile y Arg → ↑ Actividad lítica y ↓ hemólisis como más unidades HFU se añadan (límite 3 unidades).

☐ Diseño computacional de un péptido cíclico de 14aa derivado de citotoxinas; el L1AD3 → Activa la vía de la caspasa 8 en células tumorales leucémicas (apoptosis y reducción de la masa tumoral).

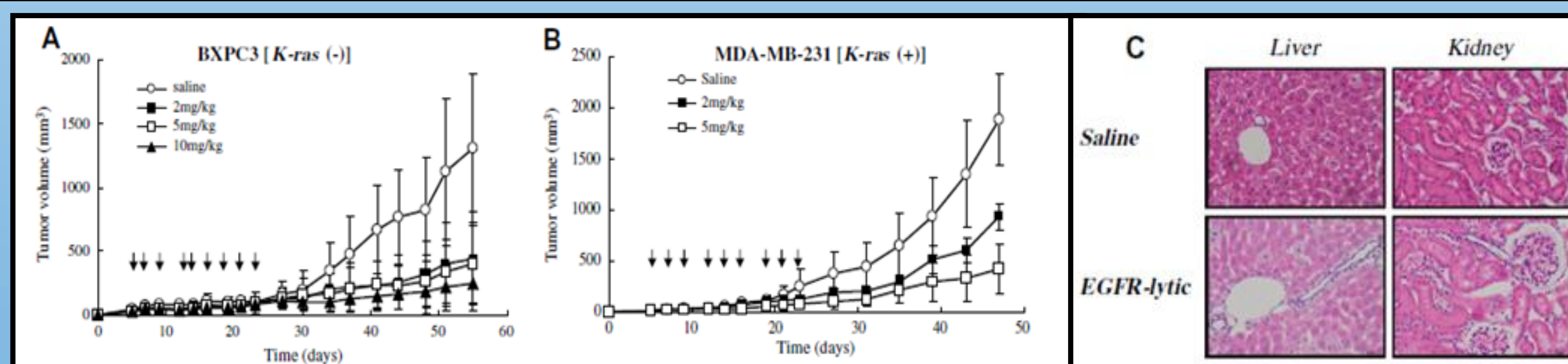


Figura 3. Observación de la actividad antitumoral de *EGFR-hybrid lytic peptide* en distintas líneas tumorales humanas. A) BXP33 sin mutación en K-ras (células tumorales pancreáticas). B) MDA-MB-231 mutadas positivamente en K-ras (células de cáncer de mama). C) Examen histológico después del tratamiento con PBS o con el péptido híbrido en tumores hepáticos y de riñón (color blanco marca la muerte celular).

(*imágenes extraídas de ⁶)

CONCLUSIONES

- ❖ AMPs son moléculas de gran interés para el futuro desarrollo de terapias antitumorales ya que no generan resistencia y pueden combinarse con quimioterapia (inhiben citotoxicidad).
- ❖ El método más prometedor de la biología sintética de AMPs es la hibridación de secuencias modificadas de AMPs conocidos con péptidos *target* específicos del individuo.
- ❖ La nanotecnología se prevé que permita la integración de CAPs en nanopartículas (protección hasta la diana).
- ❖ El efecto limitante es el elevado coste y tiempo de manufacturar estos AMPs. → Urge desarrollar nuevos métodos que permitan mejorar y simplificar el diseño (realizar + experimentos).
- ❖ Permitirán el tratamiento personalizado del cáncer y también las abre para el tratamiento de otro tipo de enfermedades como el caso de la infección por VIH.

REFERENCIAS

- Rivas-santiago, B., C. M., Sada, E., Hernández-pando, R. & Tsutsumi, V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *48*, 62–71 (2006).
- Mader, J. S. & Hoskin, D. W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* **15**, 933–946 (2006).
- Bahar, A. A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*, **6**, 1543–75 (2013).
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W. & Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery* (2012). doi:10.1038/nrd3653
- Chu, H.-L. *et al.* Novel Antimicrobial Peptides with High Anticancer Activity and Selectivity. *PLoS One* **10**, e0126390 (2015).
- Kohno, M. *et al.* A novel hybrid peptide targeting EGFR-expressing cancers. *Eur. J. Cancer* **47**, 773–783 (2011).
- Liu, Y., Xia, X., Xu, L. & Wang, Y. Design of hybrid β-hairpin peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity. *Biomaterials* **34**, 237–250 (2013).