DISEÑO RACIONAL DE UN PÉPTIDO ANTITUMORAL MEDIANTE EL USO DE UNA LIBRERÍA QUÍMICA GENERADA DE LA REGIÓN 32-51 DE LA PROTEÍNA FACTOR ANTI−LPS DE *LIMULUS*

Autores principales: Maribel Guerra Vallespí y Julio R. Fernández Massó

Otros autores: Osvaldo Reyes Acosta, Hilda Garay Pérez, Isis Torrens Madrazo, Milaid Granadino Rodríguez, Brizaida Oliva Argüelles, Isbel García, Isabel Guillen Pérez, Daniel Palenzuela Gardon, Dania Vázquez Blomquist, Viviana Falcón Cama, Osmany Mendoza Fuentes, Osvaldo Borras Hidalgo, Lidia I. Novoa Pérez y Mariela Vázquez Castillo

Colaboradores: Gerardo Guillen Nieto, Raimundo Ubieta Gómez, Boris Acevedo Castro, Ania Cabrales Rico, Ever Pérez Hernández, Reinier Acosta Martín, Antonio Antequera Guevara, Juan Hernández Pinero, Mercedes Arencibia Leyva y Yamilé Pérez Chabas

Entidad ejecutora principal: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

Autor para la correspondencia: Maribel Guerra Vallespi.
Dirección: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Avenida 31, entre 158 y 190, Playa. CP 10600. La Habana, Cuba. Fax: 273-6008
E-mail: **maribel.guerra@cigb.edu.cu**

Maribel Guerra Vallespí (30%). Diseño, y dirección científica del estudio, ejecución y análisis de resultados experimentales, escritura de artículos y patente, defensa de resultados.

Julio R. Fernández Massó (20%). Diseño, ejecución y análisis experimentos expresión diferencial y mecanismos, escritura de artículo.

Osvaldo Reyes Acosta (10%). Diseño y síntesis de péptidos.

Hilda Garay Pérez (10%). Diseño y síntesis de péptidos.

Isis Torrens Madrazo (7%). Diseño, ejecución y análisis experimentos preclínicos de eficacia y estudios penetrabilidad.

Milaid Granadino Rodríguez (6%). Ejecución de estudios preclínicos y de penetrabilidad celular.

Brizaida Oliva Arguelles (2%). Diseño, ejecución y análisis experimentos actividad biológica in vitro.

Isbel García (2%). Diseño, ejecución y análisis experimentos actividad biológica in vitro.

Isabel Guillen Pérez (2%). Ejecución experimentos expresión diferencial.

Daniel Palenzuela Gardon (2%). Ejecución experimentos expresión diferencial.

Dania Vázquez Blomquist (2%). Ejecución experimentos expresión diferencial.

Viviana Falcón Cama (2%). Diseño y ejecución experimentos microscopia electrónica y confocal.

Osmany Mendoza Fuentes (2%). Ejecución de estudios preclínicos de eficacia.

Osvaldo Borras Hidalgo (1%). Ejecución experimentos expresión diferencial.

Lidia I. Novoa Pérez (1%). Diseño y discusión de estrategias farmacogenómica.

Mariela Vázquez Castillo (1%). Presentación de patentes y respuesta a reivindicaciones.

RESUMEN

Antecedentes: Mediante estudios bioinformáticos se identificó dentro de la proteína antimicrobiana LALF (Factor anti-LPS) del "*Limulus poliphemus*", el péptido comprendido entre los aminoácidos 32-51, como un péptido de unión al lipopolisacárido bacteriano (LPS). Los péptidos catiónicos antimicrobianos son tóxicos a las bacterias pero no a las células normales de mamíferos y muestran un amplio espectro de actividad citotóxica contra las células de cáncer, como es el caso del péptido $LALF_{32-51}$. Con el **objetivo** de estudiar los aminoácidos involucrados en ambas actividades biológicas, diseñamos una librería química de péptidos mediante un barrido de alanina, a partir de la secuencia del $LALF_{32-51}$. **Resultados:** El estudio de la librería química de péptidos obtenidos a partir de la secuencia del $LALF_{32-51}$ evidenció que la capacidad de unir LPS no estaba asociada al efecto antitumoral. Además nos permitió identificar que la sustitución de la Tyr en la posición 2 por Ala aumenta el efecto citotóxico, mientras que los aminoácidos Phe8, Lys12 y Trp20 son esenciales para la actividad antitumoral. Estos hallazgos nos permitieron el diseño racional de un nuevo péptido L-2 con mayor efecto antitumoral en modelos murinos de tumores y con capacidad de penetración a las células. Se describen por primera vez un conjunto de genes expresados diferencialmente que regulan la actividad citotóxica del nuevo péptido antitumoral diseñado y la inducción de apoptosis en el tumor por el tratamiento con el péptido. Los resultados de estos trabajos están contenidos en una publicación en J. Peptide Science y la patente "Péptidos con capacidad antitumoral e inmunomoduladora" otorgada en Europa (1992638 B1); México (282158 B1); Rusia (2403-154287 RU/253); USA (US 8,283,324); Australia, China e India. Los

resultados han sido presentados en eventos científicos internacionales. **Conclusiones:** Estos resultados avalan el empleo de una librería química para el diseño racional de nuevos péptidos citotóxicos con potencialidades en el tratamiento del cáncer.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

A pesar de los avances médicos en oncología a nivel mundial el cáncer continúa como la segunda causa de muerte, superado solamente por las enfermedades cardiovasculares. Cada año en Cuba fallecen unas 19 mil personas debido a tumores malignos y se diagnostica un promedio de 29 mil nuevos casos. El cáncer es la primera causa de muerte de 15-49 años de edad (tasa de 32.5 /100 000 habitantes), y de 50-64 años (tasa de 290 /100 000 habitantes), según Anuario Estadístico de Salud 2010, Cuba.

El desarrollo de nuevos fármacos cada vez más selectivos y efectivos, que minimicen su toxicidad y que puedan usarse en combinación con la terapia estándar constituye un reto en la actualidad. Dentro de este contexto, los péptidos están emergiendo como una importante alternativa terapéutica para las pequeñas moléculas “small molecules” (del inglés). Los péptidos terapéuticos tradicionalmente se han derivado de tres fuentes: péptidos bioactivos producidos por plantas o animales, péptidos aislados de librerías recombinantes, y péptidos descubiertos de librerías químicas. El uso de péptidos tiene ventajas sobre otros tipos de moléculas utilizadas en la actualidad en la terapia del cáncer. Debido a que los productos de la degradación de los péptidos son aminoácidos se minimiza el riesgo de toxicidad sistémica, son bien tolerados y tienen una alta especificidad y selectividad por las células tumorales comparado con los tratamientos quimioterapeúticos. Son pequeños, menos inmunogénicos y tienen mayor penetrabilidad respecto a los anticuerpos y las proteínas. Son relativamente sencillos de diseñar y modificar. La mayor parte de los péptidos antitumorales han sido aislados de fuentes naturales. Otra estrategia fundamental en la identificación de péptidos antitumorales lo constituye el uso de bibliotecas combinatorias químicas o recombinantes de péptidos, con afinidad a ligandos de las rutas tumorales capaces de bloquear funciones como la interacción de receptores, la adhesión celular y la metástasis. Mediante estudios bioinformáticos se identificó dentro de la proteína antimicrobiana LALF (Factor anti-LPS) del “*Limulus poliphemus*” el péptido comprendido entre los aminoácidos 32-51 como un péptido de unión al lipopolisacárido bacteriano (LPS). Los péptidos catiónicos antimicrobianos son tóxicos a las bacterias pero no a las células normales de mamíferos y muestran un amplio espectro de actividad citotóxica contra las células de cáncer, como es el caso del péptido $LALF_{32-51}$. Con el **objetivo** de estudiar los aminoácidos involucrados en ambas actividades biológicas, diseñamos una librería química de péptidos, mediante un barrido de alanina, a partir de la secuencia del $LALF_{32-51}$.

Importancia del trabajo:
Los resultados presentados en este documento tienen una gran relevancia científica. Por primera vez se describe la utilización de una librería química en la selección de un nuevo péptido proapoptotico con potencialidad en la terapia del cáncer. El estudio de la librería química de péptidos obtenidos a partir de la secuencia del $LALF_{32-51}$ evidenció que la capacidad de unir LPS no estaba asociada al efecto antitumoral. Además nos permitió identificar que la sustitución de la Tyr en la posición 2 por Ala aumenta el efecto citotóxico, mientras que los aminoácidos Phe8, Lys12 y Trp20 son esenciales para la actividad antitumoral. Estos hallazgos nos permitieron el diseño racional de un nuevo péptido L-2 con mayor efecto antitumoral en modelos murinos de tumores y con capacidad de penetración a las células. Se describen por primera vez un conjunto de genes expresados diferencialmente que regulan la actividad citotóxica del nuevo péptido antitumoral diseñado y la inducción de apoptosis en el tumor por el tratamiento con el péptido. Los resultados de estos trabajos están contenidos en una publicación en J. Peptide Science y la patente "Péptidos con capacidad anti-tumoral e inmunomoduladora" otorgada en Europa (1992638 B1); México (282158 B1); Rusia (2403-154287 RU/253); USA (US 8,283,324); Australia, China e India. Los resultados han sido presentados en eventos científicos internacionales. Desde el punto de vista práctico, los resultados avalan el empleo de una librería química para el diseño racional de nuevos péptidos citotóxicos con potencialidades en el tratamiento del cáncer.

Resultados:
Selección de péptidos que pierden su capacidad de asociación al LPS, conservan su penetrabilidad celular y presentan actividad citotóxica. Para estudiar los aminoácidos relacionados con la capacidad de asociación a LPS y la actividad antitumoral diseñamos una librería química de péptidos usando un barrido de alanina partir de la secuencia del $LALF_{32-51}$ (figura 1B). Los resultados en la figura 1A, demostraron que los péptidos denominados L-2, L-8, L-12 y L-20 pierden la capacidad de unión a LPS manteniendo su capacidad de penetración a células (figura 1C). Además se demostró que los péptidos L-2, L-8, L-12 y L-20 fueron efectivos en cuanto a la capacidad de inhibir la progresión del tumor y aumentar la supervivencia de los ratones en un modelo murino de tumor. Los resultados evidencian que el péptido análogo L-2 aumenta significativamente ($p< 0.001$) la supervivencia de los animales en comparación al péptido $LALF_{32-51}$ (figura 1D). El estudio del barrido de alanina a partir de la secuencia del $LALF_{32-51}$ evidenció que la capacidad de unir LPS no estaba asociada al efecto antitumoral. Además nos permitió identificar que la sustitución de la Tyr en la posición 2 por Ala aumenta el efecto citotóxico, mientras que los aminoácidos Phe8, Lys12 y Trp20 son esenciales para la actividad antitumoral. Estos hallazgos nos permitieron el diseño racional de un nuevo péptido L-2 con mayor efecto antitumoral en modelos murinos de tumores y con capacidad de penetración a las células.

La caracterización del perfil de expresión diferencial del péptido L-2 mediante ensayo de Hibridación Substractiva por Supresión demostró que el péptido inhibe importantes procesos biológicos de las células de cáncer como la reparación del ADN, la angiogénesis y la mitosis. Resulta interesante la reducción de la expresión de tres genes de la ruta de la Glicolisis (PDGK1, PGM y ENO1) que pueden explicar el arresto del ciclo celular y la apoptosis de las células tumorales tratadas con el péptido L−2.

El análisis por citometría de flujo de las células tumorales tratadas con el péptido L−2 demostró ausencia del pico G2/M, acumulación del ADN en la fase S y un incremento significativo del pico sub-G1 característico de muerte celular. Adicionalmente la administración del péptido L-2 a ratones portadores de un tumor, evidenció una disminución de la masa tumoral que correlacionó con apoptosis del tumor, evaluado por ensayo de TUNEL.

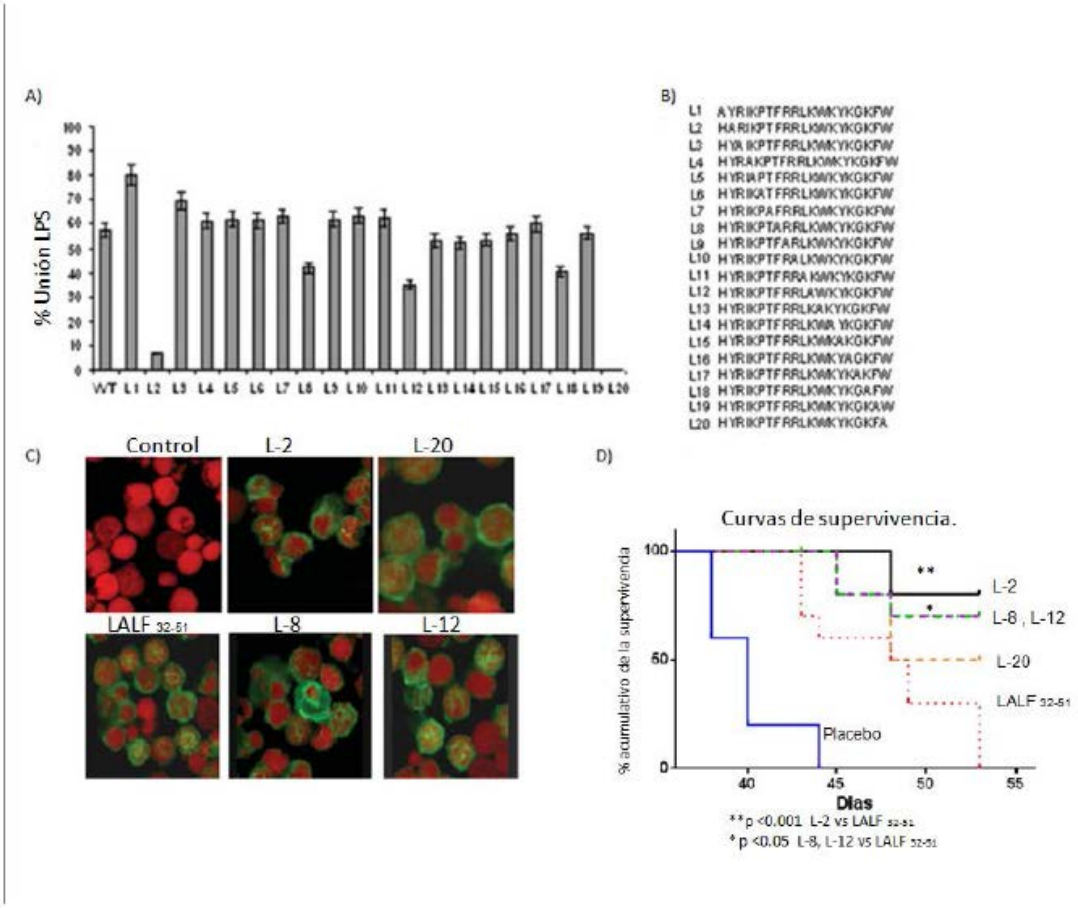

Figura 1: (A) Efecto de los péptidos sobre la capacidad de unir lipopolisacárido bacteriano (LPS). La unión de los péptidos análogos al LPS fijado en la superficie sólida se evaluó por competencia directa con el péptido LALF 32-51 marcado con biotina a una concentración de 0.2 μM. (B) Péptidos diseñados a partir del barrido de alanina del LALF 32-51. (C) Capacidad de penetración celular. Las células fueron incubadas con ioduro de propido y los péptidos con FITC. (D) Porciento acumulativo de supervivencia en modelo de tumor TC-1.

Conclusiones: Estos resultados avalan el empleo de una librería química para el diseño racional de nuevos péptidos citotóxicos con potencialidades en el tratamiento del cáncer.

Publicaciones

1. Maribel G. Vallespi, Julio R. Fernandez, Isis Torrens, Isbel Garcia, Hilda Garay, Osmani Mendoza, Milaid Granadillo, Viviana Falcon, Boris Acevedo, Raimundo Ubieta, Gerardo E. Guillen y Osvaldo Reyes. Identification of a novel antitumor peptide based on the screening of an Ala-library derived from the LALF32–51 region. J. Pept. Sci. 2010; 16: 40–47.

2. Guerra Vallespí, Maribel; Torréns Madrazo, Isis del Carmen; Reyes Acosta, Osvaldo; Garay Pérez, Hilda Elisa; Guillén Nieto, Gerardo Enrique; Acevedo Castro, Boris Ernesto; Ubieta Gómez, Raimundo. Péptidos con capacidad antitumoral e inmunomoduladora. Otorgada en Europa (1992638 B1); México (282158 B1); Rusia (2403-154287 RU/253); USA (US 8,283,324); Australia, China e India.