

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS HÍBRIDOS CAPACES DE ACTUAR COMO AGENTES MULTIMODULADORES FRENTE A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

de Orellana, Milagros; Garnier, Isaías

Laboratorio de Péptidos Bioactivos, Departamento de Química Orgánica, FBCB-UNL

Director: Siano, Álvaro Sebastián

Co-Director: Spinelli, Roque

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Claves: Enfermedad de Alzheimer, Péptidos bioactivos, Enzimas colinesterasas.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno cerebral neurodegenerativo progresivo que representa la principal causa de demencia a nivel mundial. No existe cura para la EA, y en la actualidad solamente hay cinco fármacos paliativos aprobados para su tratamiento, que solamente retrasan la sintomatología en los pacientes, pero no detienen la progresión de la enfermedad (O World Health, 2012). El principal objetivo de estos fármacos son las enzimas colinesterasas (D Knez y col., 2017). La teoría colinérgica ha demostrado una exacerbada actividad de las enzimas hidrolasas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) en pacientes que padecen la EA, lo que produce importantes descensos en los niveles del neurotransmisor acetilcolina, haciendo que la sinapsis nerviosa se vea profundamente afectada. Actualmente, las terapias se enfocan en compuestos capaces de generar una modulación simultánea de estas enzimas ya que, si solamente una es inhibida, la otra puede suplementar su rol hidrolítico (D Knez y col., 2018).

Por otro lado, los péptidos terapéuticos son uno de los campos de mayor crecimiento de las ciencias médicas actuales. Esto se debe al amplio rango de actividades biológicas que poseen, actuando como agentes antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, antitumorales, liberadores de insulina, inhibidores enzimáticos, entre otros. A su vez, la síntesis de péptidos en fase sólida es una versátil metodología que permite el diseño racional, y la realización de modificaciones específicas, tanto estructurales como de aminoácidos, para la generación de bibliotecas de moléculas de un amplio espectro (A Petzer y col., 2014). Recientemente, estudios previos realizados por el equipo de trabajo, han permitido evidenciar la potencialidad de los péptidos naturales, aislados de pieles de anuros del Litoral Argentino, como agentes moduladores de las diferentes rutas patológicas de la EA. (R Spinelli y col., 2019).

Entre ellos, de la especie *Boana cordobae* (Anura: Hylidae), se destacan los péptidos Bcl-4 y Bcl-5. El primero posee una notable capacidad de inhibir la AChE, mientras que Bcl-5 una elevada potencia inhibitoria de la BChE, con valores de inhibición superiores al fármaco comercial Rivastigmina. Sin embargo, no presentan actividad dual, hecho que los hace excelentes candidatos para la generación de bibliotecas de moléculas híbridas.

Título del proyecto: Agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas: Diseño de péptidos y peptidomiméticos con actividad anticolinesterásica.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Agencia nacional de promoción científica y tecnológica

Director: Alvaro Siano.

OBJETIVOS

- Emplear estrategias químicas mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) para generar híbridos a partir de dos péptidos activos contras los blancos de la EA hallados previamente por el grupo de trabajo: Bcl-4 y Bcl-5.
- Evaluar la capacidad biológica in vitro de los híbridos generados frente a las enzimas colinesterasas (AChE y BChE).

METODOLOGÍA

Síntesis de los péptidos

La SPPS consiste en la adición de aminoácidos a cadenas peptídicas en crecimiento, las mismas se enlazan covalentemente a través de su extremo carboxiloterminale a una resina sólida. De esta manera, la síntesis se lleva a cabo en sentido C-terminal a N-terminal. El grupo α -amino de cada aminoácido está protegido con un grupo Fmoc (Fluorenilmetoxicarbonilo). Cada ciclo de reacción comienza con la eliminación del grupo Fmoc del último aminoácido unido a la cadena, luego se agrega un exceso del siguiente aminoácido de la secuencia junto con agentes de acoplamiento. Los reactivos en exceso son eliminados por lavado (Chan & White, 2000). Para la síntesis se utilizó la resina Rink SS 1 % DVB. La desprotección del grupo Fmoc se realizó con piperidina 20 % en dimetilformamida (DMF), y los acoplamientos con tetrafluorborato de O-(benzotriazol-1-il)- tetrametiluronio (TBTU), en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y di-isopropiletilamina (DIPEA), en DMF. La separación de la resina y la eliminación de los protectores fue realizada con ácido trifluoroacético en presencia de scavengers. Para la formación de los híbridos se sintetizó en primer lugar el péptido Bcl-5, se acopló un linker a su extremo N-terminal y finalmente se prosiguió con la síntesis del siguiente péptido (Bcl-4). Se emplearon linkers de 2, 4, 6 y 8 átomos de carbono para unir los dos péptidos, generando así un total de 4 híbridos. Los péptidos sintetizados fueron analizados mediante HPLC en fase reversa con columnas de C18. Las corridas se realizaron con un gradiente de 5 - 80 % de acetonitrilo/ agua durante 33 min a un flujo de 0,8 ml/min.

Actividad enzimática de las colinesterasas.

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de los híbridos frente a la AChE y BChE se utilizó un micrométodo basado en el ensayo de Ellman (GL Ellman y col., 1961). El mismo se basa en la determinación de la cantidad de tiocolina producida por la hidrólisis enzimática de la acetiltiocolina o butiriltiocolina. Esto se logra por la reacción continua de la tiocolina con el ácido 5,5'- ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar el anión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico de color amarillo. Para el ensayo de inhibición se utilizaron placas de 96 pocillos y se incubó la enzima (AChE o BChE) con concentraciones crecientes de los híbridos (50, 100, 200 y 400 μ M) durante 30 minutos a 25°C. Luego se agregó el sustrato de la enzima (acetiltiocolina o butiriltiocolina) junto con el reactivo de cromogénico (DTNB). Finalmente, se determinó la absorbancia a 405 nm luego de 5 minutos de reacción (R. Spinelli y col., 2019). El cálculo de los porcentajes de inhibición fue realizado mediante la siguiente fórmula: $I \% = 100 - (100 * (absM - absB) / (absC - absB))$, donde absM, absB y absC representan la absorbancia de la muestra, del blanco de reactivos y del basal, respectivamente. Con los porcentajes de inhibición se calcularon los valores de IC50 (concentración inhibitoria 50) utilizando el paquete GRmetrics del software R.

RESULTADOS

El análisis mediante HPLC en fase reversa C18 para los híbridos sintetizados demostró que estos poseen una pureza mayor al 95 % en todos los casos. La Tabla 1 muestra información sobre los híbridos sintetizados.

Tabla 1. Información de los péptidos híbridos sintetizados

Péptido	Secuencia	Carga	Nº	Gravy (H) ^(a)	Tr ^(b)
Bcl-4-(LC₈)-Bcl-5	RMACCCAPR-(Linkers)-DDDHSVVYTR-NH ₂	+1	20	-0,805	14,01
Bcl-4-(LC₆)-Bcl-5					13,27
Bcl-4-(LC₄)-Bcl-5					12,54
Bcl-4-(LC₂)-Bcl-5					12,14

- a. Gravy (H): valor de hidrofobicidad con escala de Eisenberg, >1 hidrofóbico, <1 hidrofílico.
 (b)Tr: Tiempo de retención en minutos en RP-HPLC C18.

Los híbridos han demostrado la capacidad de inhibir a ambas enzimas colinesterasas (AChE y BChE). En la Tabla 2 se muestran los valores de inhibición de los péptidos frente a las enzimas AChE y BChE expresados como IC₅₀. La IC₅₀ informa la concentración de inhibidor necesaria para alcanzar el 50 % de la inhibición de la enzima.

Tabla 2. IC₅₀ de los híbridos frente a la AChE y BChE expresados en µM

Péptido	IC ₅₀ (µM)	
	AChE	BChE
Bcl-4-(LC₈)-Bcl-5	86,39 ± 1,24	153,47 ± 0,68
Bcl-4-(LC₆)-Bcl-5	80,92 ± 2,58	98,34 ± 2,47
Bcl-4-(LC₄)-Bcl-5	43,56 ± 0,44	46,25 ± 0,22
Bcl-4-(LC₂)-Bcl-5	39,51 ± 1,87	43,87 ± 5,12
Bcl-4	0,90 ± 0,40	NI*
Bcl-5	NI*	0,82 ± 0,05

Todos los valores son expresados con un intervalo de confianza del 95 %. *NI: no inhibe

Para la AChE se pudo observar que los péptidos de mayor actividad inhibitoria resultaron ser los que poseen los linkers de menor longitud (2 y 4 carbonos) con valores de IC₅₀ de 39,51 y 43,56, respectivamente. En lo que respecta a la BChE, el comportamiento inhibitorio fue igual que lo observado anteriormente, donde los péptidos más activos resultaron ser los de menor longitud de linker. Este tipo de comportamiento, en donde la capacidad inhibitoria se ve

disminuida por la longitud del linker, nos permite suponer que cadenas más cortas lograrían conservar la estructura secundaria que poseen los péptidos, mientras que a medida que el

tamaño del linker aumenta, las cadenas peptídicas estarían perdiendo rigidez fomentando a un mayor desorden estructural. La rigidez estructural es una estrategia ampliamente utilizada para la generación de péptidos terapéuticos, como ser la síntesis de péptidos miméticos o péptidos cíclicos ([Aubrey J Ellison y col., 2020](#)). Esta hipótesis será corroborada a través de estudios computacionales de docking y dinámica molecular, herramientas con las que cuenta el Laboratorio de Péptidos Bioactivos.

Los péptidos originales Bcl-4 y Bcl-5, si bien eran poseedores de una notable actividad inhibitoria (ver Tabla 2), no contaban con la capacidad de inhibir a ambas colinesterasas, AChE y BChE, claves en la EA. La combinación de estas dos secuencias a través de estrategias propias de la química orgánica ha logrado conferir a los péptidos una acción dual, al inhibir tanto a la AChE como a la BChE, atendiendo a las nuevas investigaciones en fármacos frente a la EA.

CONCLUSIONES

Las estrategias de síntesis química en fase sólida llevadas a cabo en el presente trabajo lograron conferir actividad inhibitoria dual frente a AChE y BChE, a moléculas que no la poseían. Los prometedores resultados alcanzados abren las puertas para continuar con estudios en profundidad de los péptidos híbridos más activos frente a los otros blancos patológicos de la EA. Por otro lado, este estudio representa un importante punto de partida para la generación de nuevas bibliotecas híbridas en el Laboratorio, y ratifica a la síntesis en fase sólida como una herramienta útil, versátil y efectiva para el diseño racional de péptidos terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Aubrey J Ellison, Caglar Tanrikulu, Jesús M Dones, Ronald T Raines. 2020. Cyclic Peptide Mimetic of Damaged Collagen. DOI: [10.1021/acs.biomac.0c00103](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00103)

A Petzer, BH Harvey, JP Petzer. 2014. The interactions of azure B, a metabolite of methylene blue, with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 274 (3):488-493.

A Silver. 1974. The biology of cholinesterases. Elsevier/Agricultural Research Council Institute 426-47.

D Knez, M Sova, U Košak, S Gobec. 2017. Dual inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases for Alzheimer's disease. *Future Med Chem* 9 (8):811-832.

D Knez, N Coquelle, A Pislar, S Zakelj, M Jukic, M Sova, J Mravljak, F Nachon, X Brazzolotto, J Kos, JP Colletier, S Gobec. 2018. Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur J Med Chem* 156 598-617.

G Mushtaq, NH Greig, JA Khan, MA Kamal. 2014. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS & neurological disorders drug targets* 13 (8):1432-1439.

GL Eilman, KD Courtney, V Andres, RM Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7 (2):88-95.

O World Health. 2012. Dementia: a public health priority, World Health Organization.

R Spinelli, I Sanchis, FM Aimaretti, AM Attademo, M Portela, MV Humpola, GG Tonarelli, AS Siano. 2019. Natural Multi-Target Inhibitors of Cholinesterases and Monoamine Oxidase Enzymes with Antioxidant Potential from Skin Extracts of *Hypsiboas cordobae* and *Pseudis minuta* (Anura: Hylidae). *16 (1):e1800472*.

R Spinelli, FM Aimaretti, JA Lopez, AS Siano. 2019. Amphibian skin extracts as source of bioactive multi-target agents against different pathways of Alzheimer's disease. *Nat Prod Res* 1-4.

WC Chan, PD White. 2000. Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach, (Ed: WC Chan, PD White), Oxford University Press, p.1-346.