Diseño y Evaluación de Nuevos Péptidos Antibacterianos: Actividad Comparativa Frente a Omiganan® Pentahydrochloride

Maffia, Paulo (1, 2); Bogado, Betiana (2); Faccone, Diego (1); Veliz, Omar (1); Semorile, Liliana (2); Corso, Alejandra (1)

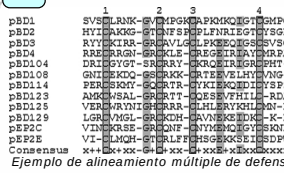
(1) Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. C. Malbran", Buenos Aires; (2) Laboratorio de Microbiologia Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina. pmaffia@unq.edu.ar

Introducción: La estrategia de contención de la resistencia bacteriana está focalizada en el uso prudente de antibióticos, aunque también es necesario el desarrollo de nuevas drogas. Los péptidos catiónicos antimicrobianos se encuentran en forma ubicua en la naturaleza. Son un componente crucial en el sistema inmune innato como primera línea de defensa contra agentes infecciosos. Las propiedades de éstos péptidos los hacen muy atractivos para el desarrollo de nuevas drogas terapéuticas, ya que no sólo poseen una rápida acción contra bacterias multirresistentes, si no que algunos péptidos exhiben actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora. Los péptidos antimicrobianos (PEP) catiónicos tienen un amplio espectro de actividad antibacteriana, incluyendo gram-positivos y negativos. Estos PEPs permeabilizan la membrana bacteriana en forma selectiva.

Omiganan Pentahydrochloride (MBI226) (OMI) es un PEP catiónico sintético análogo a las indolicidinas con actividad sobre bacterias y levaduras, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos fase III para su utilización tópica.

Objetivos: Diseño de nuevos péptidos antimicrobianos y evaluación de su potencial uso como agente terapéutico.

I ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE PÉPTIDOS CONOCIDOS



Ejemplo de alineamiento múltiple de defensinas.

- El diseño de PEPs se realizó con herramientas informáticas para alineamientos múltiples y análisis físicoquímicos *in silico* de hidrofobicidad y porcentaje de alfa hélice (BLAST, CLUSTAL, AGADIR, ExPASY)

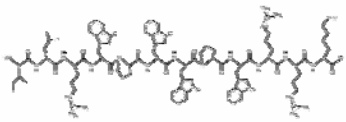
-Se tomaron como modelos PEPs antimicrobianos de origen natural (como catelicidinas y defensinas) se establecieron secuencias y aminoácidos (aa) en posiciones específicas consenso. Se diseñaron *in silico* 4 PEPs de entre 18 y 30 aminoácidos (Sec1, Sec2, Sec3 y Sec5) y un PEP altamente catiónico pero con aa alineados al azar (Sec4). Los 6 PEPs se sintetizaron con y sin amidación en el extremo COOH mediante síntesis automatizada y purificados hasta pureza > 95%.

Análisis de parámetros físico-químicos de los PEPs diseñados

	Sec 1	Sec 2	Sec 3	Sec 4	Sec 5
Punto isoeléctrico	13.10	10.89	12.25	9.85	11.75
Carga neta	+12	+6	+7	+3	+7
Hidrofobicidad *	+29.04	+20.51	+23.38	+19.05	+16.10
Cont. Alfa hélice**	1.03	5.35	1.54	0.11	7.07

**Escala Wimley-White Kcal mol -1* ***Según algoritmo AGADIR*

Omiganan Pentahydrochloride (MBI226)
Secuencia: LRWPWWPWRRK
Longitud: 12 aa
Masa: 1778.9971
Punto Isoelectrico (pI): 12.79
Carga Neta: +4
Hidrofobicidad: +5.68 Kcal * mol -1
Cont. Alfa Helice: 0.01



II EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS

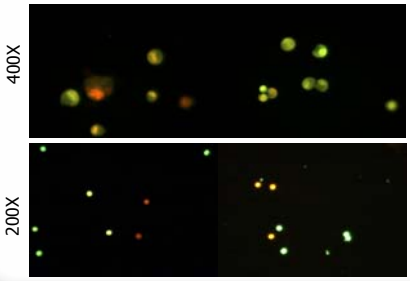
- Como parámetro de citotoxicidad se evaluó la hemólisis de los eritrocitos de sangre humana o de carnero en presencia de cada uno de los PEPs.

Capacidad hemolítica de los péptidos amidados comparados con OMIGANAN en eritrocitos humanos

Muestra	Concentración	DO 540 nm	% Hemólisis (Tween20 1%)	% Hemólisis (Agua)
sec 1	128 ug/ml	0,067	4	3,4
sec 2	128 ug/ml	0,641	46,3	39,8
sec 3	128 ug/ml	0,036	1,7	1,5
sec4	128 ug/ml	0,04	2	1.72
sec 5	128 ug/ml	0,163	11,1	9,5
Omiganan	128 ug/ml	0,171	11,6	10
Tween 20	1%	1,37	100	86
PBS	-	0,013	0	0
Agua	-	1,59	116,2	100

Los valores de hemólisis fueron comparables a los de Omiganan en todos los PEP, excepto Sec2 que mostró valores de citotoxicidad mayores en eritrocitos humanos.

- La capacidad de lisis de los PEPs antimicrobianos se corroboró mediante microscopía de fluorescencia y marcación con Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina en células mononucleares humanas obtenidas de sangre periférica.



Ejemplo de microscopía de fluorescencia de células tratadas con el PEP Sec2.
El color rojo-naranja evidencia células muertas y el verde células vivas, en función de la integridad de la membrana, luego del tratamiento con cada PEP.
Vistas en microscopio de fluorescencia con aumento de 400x y 200x.

III ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

- La sensibilidad se evaluó por el método de microdilución según el CLSI con caldo Mueller-Hinton Difco con (10mg/L Mg2+ y 20mg/L Ca2+) y sin el agregado de cationes.
-Los PEPs amidados tuvieron mayor actividad (1-4 diluciones de CIM) que los no amidados frente a todo el panel estudiado.
- Al comparar los valores de CIM (µg/ml) de OMI amidado frente a *P. aeruginosa* ATCC27853 con/sin agregado de cationes se observaron diferencias significativas en los rangos: 128-256 (con CA) vs 16-32 (sin CA). En base a estos resultados, los experimentos siguientes se realizaron con el agregado cationes.
En la Tabla se muestran los valores de CIM de los 5 péptidos en estudio más el OMI.
- Los PEPs se evaluaron frente a un panel de 8 bacterias: *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC29213 y *P. aeruginosa* ATCC27853 (PaeATCC) como controles y 5 cepas clínicas: *S. warnerii, S. cohnii, S. aureus, P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Se usaron los rangos de referencia de CIM para OMI y las cepas ATCC definidos en JCM 2004 v42:1386-7.

CIM (µg/ml) en microdilución con MH Difco de los PEPs amidados.

Péptidos	OMI	Sec1	Sec2	Sec3	Sec4	Sec5
Staphylococcus warneri M6823	4	4	8	8	>256	4
Staphylococcus cohnii M6767	8	8	8	4	>256	4
Staphylococcus aureus ATCC29213	16	16	64	128	>256	16
Escherichia coli ATCC25922	32	32	16	64	>256	4
Staphylococcus aureus M6794	16	8	32	128	>256	4
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	32	16	16	128	>256	8
Pseudomonas aeruginosa M13513	64	16	32	128	>256	8
Klebsiella pneumoniae M13540	64	>128	16	128	>256	8

Conclusiones:

-El orden de la secuencia de aa de los PEPs más que la carga positiva, es determinante en la actividad antimicrobiana. Este efecto se evidenció al analizar Sec4, cuyos parámetros físico-químicos , excepto el contenido de alfa hélice, son comparables al resto de PEP, pero sin embargo no mostró actividad antibacteriana (I y III).

- La amidación COOH terminal mejoró la actividad antimicrobiana en la mayoría de los PEPs, pero no hubo grandes diferencias en la actividad hemolítica (III).

-El PEP Sec2 presentó valores de hemólisis de eritrocitos humanos mas elevados que OMI, sin embargo su potencial uso tópico no se vería afectado.

-LOS PEPS SEC1, SEC2 Y SEC5 MOSTRARON ACTIVIDAD COMPARABLE A OMI FRENTE AL PANEL ANALIZADO (III).

-Se encuentra en evaluación la actividad de los PEPs Sec1, Sec2 y Sec5 frente a un panel con mayor número de cepas, ya que mostraron potencial actividad antimicrobiana.