



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

# **Peptidi naturali antimicrobici e antitumorali come potenziale alternativa alla chemioterapia tradizionale**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio

Laureanda: Alessia Difino  
1191692

Anno Accademico 2021/2022

## Indice

- Introduzione.....p.3
- Peptidi antimicrobici naturali.....p.4
  - Classificazione.....p.5
  - Modalità d'azione.....p.7
  - Limitazioni.....p.9
- Peptidi antimicrobici naturali con attività antitumorale.....p.10
  - Meccanismo d'azione.....p.11
  - Modifiche chimiche.....p.12
  - Vantaggi e svantaggi.....p.13
- Polybia-MP1 come potenziale doppio agente antimicrobico e antitumorale.....p.14
  - Meccanismo d'azione.....p.15
  - Modifiche chimiche.....p.16
- Conclusioni.....p.19
- Bibliografia.....p.20

## **Introduzione**

Negli anni '60 del secolo scorso, l'uso intensivo di antibiotici ha condotto a una preoccupante resistenza ai farmaci antimicrobici da parte di batteri multiresistenti o "superbatteri". Si tratta di ceppi batterici in grado di annullare l'azione del farmaco attraverso la modifica del suo sito bersaglio o la produzione di enzimi distruttivi.

Da qui è derivata la ricerca di agenti antimicrobici alternativi che ha portato a un rinnovato interesse nei confronti di una particolare classe di peptidi: i peptidi antimicrobici naturali (AMP).

Questi hanno suscitato nel mondo accademico e, più recentemente, nelle industrie un immenso interesse a causa della loro attività ad ampio spettro contro i batteri e in particolare contro ceppi microbici resistenti a più farmaci. Questa enorme crescita della ricerca e degli studi clinici sugli AMP ha permesso di autorizzare l'uso di sei AMP per applicazioni topiche [V. Yadav 2021].

Attualmente risultano essere 60 gli AMP già approvati dalla *Food and Drug Administration* statunitense e si stima che oltre 150 peptidi antimicrobici siano attualmente in fase di sperimentazione clinica per testarne l'efficacia in varie infezioni [V. Yadav 2021].

Lo scopo di questo elaborato è presentare le caratteristiche principali degli AMP ed approfondire quindi una specifica tipologia di AMP che hanno dimostrato di possedere anche attività antitumorale. Questi peptidi, chiamati anche "peptidi anticancro" (ACP), sono stati recentemente al centro dell'interesse della comunità scientifica che ne sta valutando l'utilizzo come potenziale alternativa alla chemioterapia convenzionale, vista la resistenza ai chemioterapici mostrata da alcuni tipi di cellule cancerose e visti gli effetti collaterali deleteri dei farmaci invasivi ora utilizzati per curare il cancro.

In tale contesto, verrà descritto in particolare un AMP estratto dal veleno di vespa. Esso presenta tutte le caratteristiche tipiche degli AMP ma anche un'interessante attività antitumorale, caratterizzata da un'alta selettività e da una bassa attività emolitica rispetto ad altri peptidi di origine simile.

## Peptidi antimicrobici naturali

I peptidi antimicrobici naturali sono brevi sequenze di amminoacidi prodotte da organismi eucarioti e procarioti e sono noti anche come “peptidi di difesa dell’ospite”. Il nome deriva dal ruolo che essi svolgono nella difesa immunitaria innata degli organismi contro virus, batteri e funghi. Essi funzionano infatti come linea di difesa primaria non specifica contro un ampio spettro di agenti patogeni.

Per questo nell'uomo essi sono presenti nei fluidi dell'orecchio, degli occhi, della trachea, dei polmoni, dell'intestino e della pelle, dal momento che questi costituiscono il primo punto di contatto con i patogeni ambientali [V. Yadav 2021].

Oltre alle loro funzioni antimicrobiche, gli AMP possono presentare attività antinfiammatorie, immunomodulanti, angiogeniche, cicatrizzanti e antitumorali.

I primi AMP riconosciuti furono il lisozima, scoperto nel 1922 ad opera del batteriologo inglese Alexander Fleming che ne dimostrò l’attività batteriolitica, e la penicillina nel 1929 [K. Kardani 2021].

In seguito, nel 1939, il biologo René Jules Dubos riuscì a estrarre la gramicidina da un ceppo di batteri del suolo. Le gramicidine furono i primi antibiotici a base di peptidi prodotti commercialmente. Essi rivoluzionarono la ricerca di AMP naturali come vie terapeutiche per il trattamento di varie infezioni [A. L. Tornesello 2020, V. Yadav 2021].

I primi AMP derivati da animali, la leuchina e la fagocitina, vennero isolati dai leucociti di coniglio nel 1956, mentre nel 1985 vennero estratti tre peptidi (HNP-1, HNP-2 e HNP-3) da neutrofilo umani che furono denominati "defensine" [A. L. Tornesello 2020].

Negli ultimi decenni è stato caratterizzato un gran numero di AMP, sia naturali sia sintetici, e sono stati istituiti *database* pubblici che classificano le famiglie di AMP e ne riportano le applicazioni cliniche. Sono stati inoltre sviluppati *database* centrati su attività specifiche come il *Defensins Knowledgebase*, l’antivirale *AVPdb*, l’antiparassitario *ParaPep* e l’antitumorale *CancerPPD* [A. L. Tornesello 2020].

Dal punto di vista strutturale, gli AMP contengono da 12 a 50 L-amminoacidi e hanno strutture secondarie variabili. Pur esistendo anche AMP carichi negativamente, solitamente questi peptidi sono ricchi di residui di arginina e lisina e dunque risultano essere carichi positivamente con una carica netta compresa tra +2 e +9 a pH neutro.

Tale natura cationica permette loro di legare in maniera non specifica membrane caricate negativamente, ricche cioè di fosfolipidi carichi negativamente che sono particolarmente abbondanti nelle membrane microbiche. Questa interazione causa un aumento della permeabilità delle membrane, la perdita di componenti citoplasmatiche e conseguentemente la morte cellulare.

Ma va anche ricordato che gli AMP possiedono spesso alte porzioni di residui idrofobici e una natura anfipatica, che consente loro di stabilire interazioni sia con componenti idrofilici che idrofobici.

### ○ Classificazione

I circa 2500 AMP finora individuati vengono suddivisi in due classi in base alle loro attività o in quattro classi in base alla loro struttura.

Dal punto di vista della loro attività, è possibile individuare una prima classe che comprende i peptidi tossici per i batteri e le cellule tumorali, ma non letali per le normali cellule di mammifero, e una seconda classe che comprende i peptidi tossici per ogni tipo di cellula.

Da punto di vista della struttura invece si possono catalogare in peptidi  $\alpha$ -elicoidali, peptidi a foglietto  $\beta$  ( $\beta$ -sheet), peptidi disordinati (*random coil*) e peptidi ciclici (figura 1).

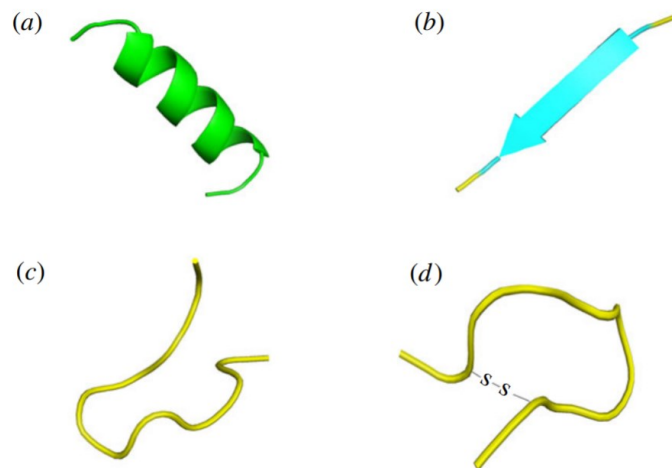


Figura 1. Rappresentazione schematica delle 4 classi di strutture di AMP:  $\alpha$ -elica, foglietto  $\beta$ , struttura disordinata, struttura ciclica [M. Xie 2020].

A) **Peptidi  $\alpha$ -elicoidali.** Si tratta della classe di AMP più studiata. Comprende peptidi caratterizzati dalla presenza di residui di alanina, leucina e lisina per stabilizzare l'elica, ma non residui di cisteina. I peptidi che rientrano in questa classe possiedono conformazioni casuali in soluzione acquosa e diventano elicoidali quando interagiscono con le membrane cellulari. Di questa classe fa parte la melittina (figura 2), un peptide isolato dal veleno d'api che ha mostrato di possedere proprietà antimicrobiche e antitumorali, ma che se somministrato per via endovenosa può causare gravi effetti collaterali allergici.

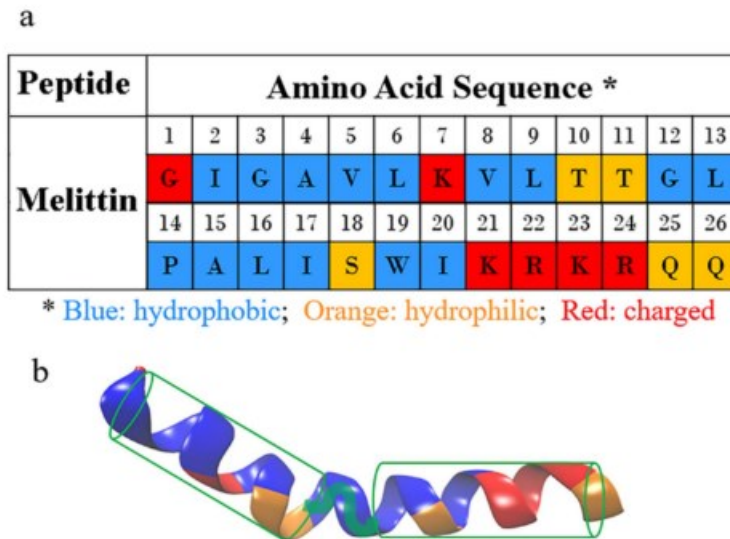


Figura 2. Sequenza e struttura secondaria del peptide antimicrobico melittina che assume una struttura  $\alpha$ -elicoidale [J. Hong 2019].

B) **Peptidi  $\beta$ -pieghettati ( $\beta$ -sheet)**. Si tratta di peptidi ricchi di prolina, glicina, triptofano, arginina o istidina e che contengono da due a dieci residui di cisteina che formano fino a cinque ponti disolfuro. In questa classe rientrano le defensine umane e la gomesina (figura 3). I peptidi di questa classe che presentano anche attività antitumorale risultano essere meno potenti contro le cellule cancerose rispetto ai peptidi antitumorali  $\alpha$ -elicoidali, ma anche meno tossici per le cellule dei tessuti normali [M. Xie 2020].

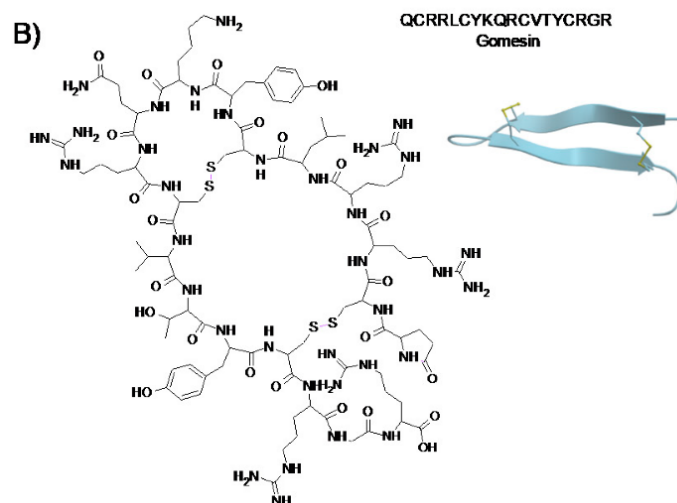


Figura 3. Struttura chimica e struttura secondaria del peptide antimicrobico gomesina che assume una struttura a foglietto  $\beta$ -pieghettato.

C) **Peptidi flessibili con strutture non ordinate**. Si tratta di peptidi che mancano di una tipica struttura secondaria e che generalmente si presentano come lineari. Sono caratterizzati dalla presenza di molti residui di prolina e glicina. In questa classe rientra l'indolicidina (figura 4).

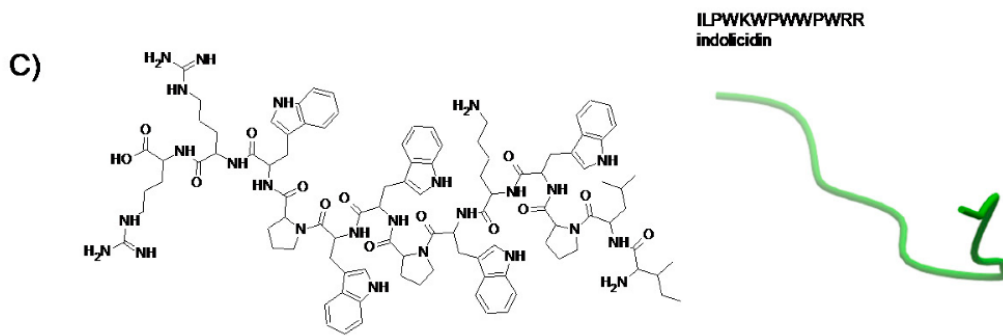


Figura 4. Struttura chimica e struttura secondaria dell'indolicidina, un peptide antimicrobico naturale di struttura tridimensionale estesa.

D) **Peptidi ciclici.** Si tratta di peptidi la cui conformazione è dovuta alla formazione di uno o più ponti disolfuro, come nel caso delle batteriocine. I peptidi ciclici che presentano attività antitumorale rappresentano la maggior parte dei peptidi antitumorali negli studi clinici, perché possiedono un forte effetto inibitorio sulle cellule tumorali e una minore tossicità rispetto ad altri peptidi [M. Xie 2020].

#### o Modalità d'azione

I peptidi antimicrobici naturali hanno un vasto spettro di attività nei confronti di diversi tipi di organismi, come batteri, virus, funghi e persino cellule di mammiferi. Tuttavia, i meccanismi molecolari con cui agiscono non sono spesso chiari o ben compresi.

Quello che è certo è che la composizione e sequenza amminoacidica, la struttura, l'anfipatia, l'oligomerizzazione, la carica netta, la concentrazione del peptide e la composizione della membrana influenzano i loro meccanismi d'azione [K. Kardani 2021].

Questi sono stati studiati con diverse tecniche, tra cui dicroismo circolare, cristallografia a raggi X, risonanza magnetica nucleare e cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa.

È stato dimostrato che gli AMP destabilizzano prima l'involucro batterico e poi interagiscono elettrostaticamente con la parte anionica della membrana. In questa fase, la diversa composizione delle membrane dei batteri gram-positivi e gram-negativi ha dimostrato di influenzare la sensibilità delle cellule agli AMP [A. L. Tornesello 2020].

Infatti, l'involucro dei batteri gram-positivi contiene acidi lipoteicoico, teicuronico e teicoico, nonché polisaccaridi acidi. Invece, la membrana dei batteri gram-negativi contiene cariche negative originate dai gruppi fosfato dei lipopolisaccaridi (LPS) così come alcuni fosfolipidi anionici come cardiolipina e fosfatidilglicerolo [A. L. Tornesello 2020].

Gli AMP carichi positivamente interagiscono facilmente con i siti di legame carichi negativamente dei lipopolisaccaridi, esposti sulla superficie cellulare, e consentono il passaggio di peptidi

attraverso la membrana esterna mediante un meccanismo detto di "captazione autopromossa" [A. L. Tornesello 2020].

I meccanismi d'azione sono stati classificati in due classi diverse:

- 1) meccanismi extracellulari, basati sulla lisi della membrana come la necrosi e l'apoptosi;
- 2) meccanismi intracellulari, non basati sulla lisi della membrana, come:
  - il modello "a tappeto" (figura 5) che descrive l'interazione di AMP  $\alpha$ -elicoidali, caricati positivamente, con i fosfolipidi caricati negativamente nello strato esterno delle membrane. Gli AMP rimangono paralleli alla superficie cellulare senza inserirsi nei doppi strati lipidici, fino a quando la concentrazione dei peptidi si avvicina al livello di soglia. A quel punto si verificano interazioni tra amminoacidi idrofili e teste polari dei fosfolipidi, causando un aumento della fluidità della membrana, permeabilizzazione e rottura del doppio strato lipidico.
  - Il "modello a doghe di botte" (figura 5) che consiste nell'accumulo di peptidi monomerici anfipatici, di solito con struttura  $\alpha$ -elicoidale, sulla superficie cellulare, seguito da cambiamenti conformazionali e aggregazione per formare multimeri a forma di botte all'interno della membrana batterica. Le catene idrofobe dell'AMP entrano in contatto con le catene aciliche della membrana, si allineano con il nucleo lipidico del doppio strato e inducono l'indebolimento della membrana cellulare. Le parti idrofile dei peptidi invece formano pori che si allargano all'aumentare del numero di peptidi aggregati.
  - Il "modello a poro toroidale" (figura 5), un modello a due stadi che unisce i due modelli precedenti. I peptidi sono inattivi a basse concentrazioni e disposti parallelamente al doppio strato, mentre ad alte concentrazioni si convertono nella forma attiva e ruotano perpendicolarmente al doppio strato, destabilizzando irreversibilmente le membrane, ma preservandone l'integrità. L'instabilità del poro toroidale neoformato consente l'ingresso di peptidi nel foglietto della membrana interna, mentre la disintegrazione dei pori provoca il rilascio di peptidi nello spazio intracellulare dove inibiscono vie essenziali, come la replicazione del DNA e la sintesi proteica, causando la morte dei batteri [A. L. Tornesello 2020].



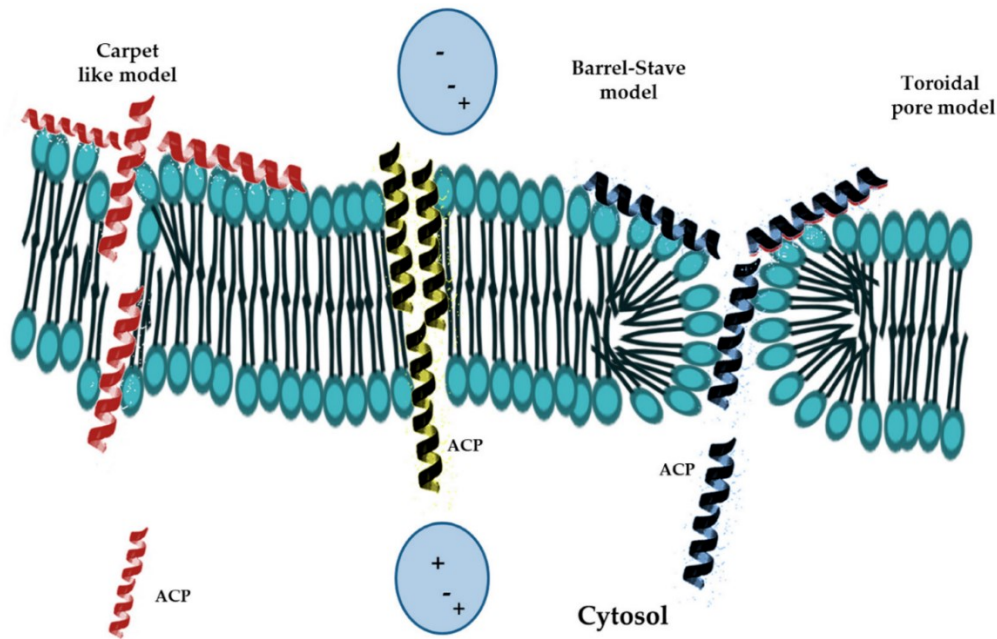


Figura 5. Rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione dei peptidi antimicrobici naturali.

#### ○ Limitazioni

Il risultato relativamente meno positivo per quanto riguarda l'uso di AMP naturali è stato attribuito alla scarsa selettività cellulare mostrata dalla maggior parte di essi e quindi alla loro propensione a interagire in modo non specifico.

È quindi necessaria una completa comprensione dei fattori coinvolti nella regolazione della loro selettività verso tipi cellulari specifici. Nonostante diversi studi abbiano fornito informazioni sulla relazione struttura-attività degli AMP, la comprensione dell'equilibrio tra efficacia e tossicità è ancora nella fase nascente.

La strategia adoperata è stata quella di progettare analoghi di AMP naturali mediante sostituzione, mescolamento, inserimento o delezione di specifici residui di amminoacidi. Tra i metodi usati uno prevede modifiche dei residui in una sequenza ripetuta di eptade per raggiungere il delicato equilibrio tra i profili antimicrobici e citotossici degli AMP naturali [V. Yadav 2021].

Per quanto riguarda gli AMP sintetici, essi possono essere tossici e non selettivi. Inoltre, sono spesso instabili nel siero a causa delle proteasi.

La suscettibilità alla degradazione proteolitica può essere ridotta in vari modi: (i) sostituendo gli L-amminoacidi naturali con i loro D-enantiomeri che non sono riconosciuti dalle proteasi del siero [A. L. Tornesello 2020]; (ii) ciclizzando i peptidi e riducendone quindi la libertà conformazionale [A. L. Tornesello 2020]; (iii) inserendo nei peptidi amminoacidi non proteici.

Un altro ostacolo è l'alto costo della sintesi dei peptidi dal momento che sono necessarie grandi quantità di peptidi durante gli studi pre e post-clinici. In questo senso può essere utile una

transizione verso peptidi più piccoli e di conseguenza meno costosi.

Bisogna anche evidenziare che per il momento l'uso clinico della maggior parte degli AMP approvati è limitato alla sola applicazione topica, poiché la somministrazione sistemica di AMP è ancora considerata troppo tossica per l'uomo [V. Yadav 2021].

### **Peptidi antimicrobici naturali con attività antitumorale**

In letteratura sono stati descritti più di 2.500 AMP naturali. Di questi, secondo l'*Antimicrobial Peptide Database*, circa il 10% è noto per esibire attività antitumorale e in totale, secondo il *Database of Anticancer Peptides and Proteins*, esistono circa 600 peptidi antitumorali [M. D. T. Torres 2018].

Questi peptidi antimicrobici naturali che risultano essere citotossici per le cellule cancerose sono stati denominati “peptidi anticancro” (ACP) e fu nel 1985 che vennero descritti per la prima volta come potenti agenti antitumorali [M. Xie 2020].

Nonostante lo sviluppo di vari agenti chemioterapici, il cancro rimane una delle principali cause di mortalità in tutto il mondo. Nel 2018, l'OMS ha riferito che i casi totali di cancro e le morti totali per cancro erano rispettivamente 18.078.957 e 9.555.027. Di questi, circa 2 milioni dei nuovi casi di cancro sono stati causati da agenti patogeni come virus e batteri [K. Kardani 2021].

Gli attuali approcci terapeutici includono chirurgia, chemioterapia, radioterapia e immunoterapia. Si tratta di metodi altamente invasivi e che presentano numerosi effetti collaterali deleteri.

La chemioterapia prevede l'introduzione di sostanze chimiche nel corpo per attaccare le cellule tumorali. L'uso a lungo termine di questa terapia aumenta la propensione alla farmacoresistenza con possibilità molto elevate di recidiva. Inoltre, i farmaci usati sono poco selettivi e uccidono anche cellule sane [M. Xie 2020].

La comprovata resistenza ai chemioterapici da parte delle cellule cancerose ne ha reso più complicato il trattamento [M. D. T. Torres 2018]. A livello cellulare pare che vengano indotti cambiamenti che includono la sovraespressione di enzimi e trasportatori di farmaci in grado di ridurre la concentrazione di chemioterapici nel citoplasma, consentendo alle cellule tumorali di riparare i danni causati dalla chemioterapia [M. Manrique-Moreno 2021].

Un'alternativa promettente alla chemioterapia convenzionale potrebbe quindi essere rappresentata dalla progettazione e sviluppo di peptidi anticancro, in quanto offrono una maggiore specificità e una minor incidenza di resistenza acquisita.

Il primo peptide antitumorale, il Magainin 2 (MG2), isolato da una rana africana *Xenopus laevis*, è stato identificato nel 1991 ed è stato il primo peptide antimicrobico naturale  $\alpha$ -elicoidale trovato ad avere attività antitumorale [K. Kardani 2021, M. Xie 2020].

La prima generazione di peptidi anticancro ha coinvolto peptidi bioattivi originati da prodotti naturali, come ad esempio quelli originati dai funghi *Lentinus squarrosulus* che hanno indotto l'apoptosi nelle cellule tumorali polmonari umane.

In seguito, dopo aver compreso che i peptidi naturali potevano essere modificati per colpire specifiche cellule cancerose, penetrare efficacemente nelle cellule, ridurre gli effetti collaterali e aumentare l'efficacia, è stata sviluppata la seconda generazione di potenti ACP in base alle loro proprietà fisico-chimiche e strutturali.

Gli analoghi sintetizzati sono stati in grado di selezionare e quindi uccidere le cellule tumorali.

Bortezomib Boronate (Velcade®) è stato il primo ACP approvato dalla FDA degli Stati Uniti per la terapia del mieloma multiplo nel 2003 e del linfoma a cellule mantellari nel 2006 [K. Kardani 2021].

#### ○ **Meccanismo d'azione**

Gli ACP presentano caratteristiche simili tra loro come carica positiva, struttura anfipatica, strutture secondarie definite (in genere elicoidali) in ambienti idrofobici e una rapida attività antitumorale.

Questi peptidi hanno dimostrato di colpire selettivamente le cellule tumorali umane attraverso la loro capacità di legare le fosfatidilserine fosfolipidiche (PS) che nelle cellule tumorali sono principalmente localizzate nel lembo esterno delle membrane plasmatiche.

Infatti, nelle cellule normali le fosfatidilserine fosfolipidiche caricate negativamente si trovano nel lembo interno, mentre i fosfolipidi neutri, ovvero le fosfatidilcoline (PC) e le sfingomieline (SM), si trovano nel lembo esterno della membrana plasmatica. Tuttavia, tale condizione è invertita nei tumori a causa dell'effetto delle citochine infiammatorie, dello stress ossidativo, dell'acidità e della trombina che causano la perdita dell'asimmetria di membrana [A. L. Tornesello 2020].

Inoltre, livelli ridotti di colesterolo nelle cellule tumorali le rendono più suscettibili alla lisi facilitando la destabilizzazione della membrana.

È noto che gli ACP interagiscono prima con le membrane caricate negativamente (cioè le membrane delle cellule cancerose) tramite interazioni elettrostatiche, dopodiché tendono ad adottare conformazioni elicoidali, che causano la permeabilizzazione della membrana cellulare o addirittura la rottura della membrana che può portare alla necrosi.

Quasi tutti gli ACP hanno mostrato di assumere strutture  $\alpha$ -elicoidali e  $\beta$ -pieghettate durante l'interazione elettrostatica con le membrane cellulari. Si è visto inoltre che la natura anfipatica e le caratteristiche cationiche degli ACP  $\alpha$ -elicoidali e i ponti disolfuro degli ACP  $\beta$ -pieghettati hanno ruoli centrali nella citotossicità, nella penetrazione cellulare e nel mantenimento strutturale, fattori che favoriscono una maggiore potenza nell'uccidere le cellule tumorali [K. Kardani 2021].

L'attività antitumorale si verifica tipicamente a concentrazioni micromolari e di solito non è

accompagnata da attività emolitica. Questo avviene probabilmente perché ci sono differenze strutturali tra le membrane dei globuli rossi e delle cellule tumorali, che sono rispettivamente zwitterioniche e cariche negativamente. La selettività dei peptidi osservata nei confronti delle cellule tumorali rispetto alle cellule normali è probabilmente dovuta al microambiente acido che accompagna le cellule tumorali e all'aumento della carica netta negativa delle cellule tumorali rispetto alle cellule normali [M. D. T. Torres 2018].

Gli studi sulla relazione struttura-attività hanno identificato inoltre l'anfifilia e l'angolo polare come le proprietà fisico-chimiche più importanti affinché gli ACP invadano le cellule tumorali o ne disturbino le membrane [M. D. T. Torres 2018].

#### ○ **Modifiche chimiche**

Una volta individuate le proprietà chimico-fisiche necessarie affinché gli ACP possano attaccare le cellule cancerose, gli studiosi si sono concentrati sulla progettazione di analoghi modificati che preservassero tali caratteristiche specifiche, come la carica netta positiva, l'idrofobicità e l'anfipatia, note per essere importanti per interagire con le membrane, esercitare la bioattività contro i microrganismi e le cellule tumorali e sopprimere l'attività emolitica indesiderata.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che bruschi cambiamenti nell'idrofobicità del peptide e nella propensione conformazionale portano all'inattivazione del peptide, mentre l'aumento della carica netta positiva dei peptidi migliora la loro attività [M. D. T. Torres 2018].

La progettazione di peptidi anticancro si basa sulla ricostruzione della catena principale e sulla modifica della catena laterale [M. Xie 2020].

La ricostruzione della catena principale si basa principalmente sulla sostituzione con amminoacidi naturali o non naturali. Gli amminoacidi naturali modulano la carica netta, l'idrofobicità e l'elicità, portando a variazioni nell'attività e nella selettività dei peptidi.

Gli amminoacidi non naturali invece consentono di ottimizzare le interazioni con le membrane cellulari, migliorare la selettività degli ACP e ridurre la citotossicità, aumentando così l'indice terapeutico.

Per quanto riguarda le modifiche della catena laterale, invece, esse includono principalmente inserimenti di colesterolo, fosforilazioni, glicosilazioni o legami con polietilenglicole (PEG).

Il colesterolo è un componente della membrana cellulare animale e la sua incorporazione negli ACP può facilitare il loro ingresso nella cellula cancerosa, migliorando l'attività antitumorale e riducendo la citotossicità dei peptidi.

La fosforilazione è una modifica pervasiva della proteina o del peptide, dopo la sintesi, che si verifica in diversi siti di fosforilazione specifici negli amminoacidi. I dati esistenti dimostrano che, pur non essendo efficace quanto le altre modifiche nel potenziare l'attività antitumorale, la

fosforilazione è in grado di ridurre significativamente gli effetti tossici e collaterali degli ACP.

La glicosilazione, così come la fosforilazione, è una modifica post-traduzionale delle proteine o peptidi. Vengono legati zuccheri ad amminoacidi specifici mediante glicosiltransferasi per formare legami glicosidici. Si tratta di una modifica che aumenta la diversità delle proteine e/o dei peptidi ed espande il loro range funzionale, ma che non restituisce necessariamente ACP efficaci, portando talvolta alla perdita di attività o funzione.

L'accoppiamento di gruppi PEG con gruppi di catene laterali libere attraverso legami covalenti migliora la selettività degli ACP e ne riduce la tossicità. Poiché il PEG è una macromolecola, fa anche aumentare il diametro molecolare degli ACP, prolungandone così l'emivita. La modifica del PEG presenta alcuni problemi, ma conferisce una forte idrofilia, che può aumentare la solubilità dei farmaci e migliorare la stabilità degli ACP.

#### ○ **Vantaggi e svantaggi**

Un vantaggio notevole degli ACP è la minor incidenza di resistenza acquisita da parte delle cellule tumorali. È stato infatti dimostrato che, mentre i chemioterapici devono entrare nelle cellule tumorali per esercitare la loro azione, consentendo così alle cellule di sviluppare meccanismi di resistenza per combattere il loro effetto, al contrario gli ACP agiscono dall'esterno della membrana, meccanismo che non può essere compensato dalle cellule tumorali [M. Manrique-Moreno 2021].

Gli effetti biologici indotti da ACP sono stati valutati in ambienti controllati *in vivo* mediante test sugli animali. Si è visto che gli ACP sono in grado di inibire significativamente la crescita del tumore senza provocare, nella maggior parte dei casi, effetti collaterali negativi [M. Manrique-Moreno 2021].

È stato anche evidenziato il fatto che, a differenza della chemioterapia convenzionale, molti ACP possono uccidere sia le cellule tumorali metabolicamente attive, sia quelle a crescita lenta, sia quelle multiresistenti [M. Xie 2020].

Di contro, ci sono ancora alcune criticità da superare. In primo luogo, la selettività della maggior parte degli ACP non è sufficientemente differenziata tra cellule tumorali e cellule normali, con conseguenti applicazioni cliniche limitate. In secondo luogo, la bassa resistenza degli ACP alla degradazione proteolitica è uno degli aspetti che ha sollevato più domande. Essa spiega la loro breve emivita e la bassa biodisponibilità *in vivo*, cosa che limita l'uso di peptidi come agenti farmaceutici.

Tuttavia, diverse aziende farmaceutiche hanno compiuto progressi nella valutazione e nello sviluppo di farmaci da peptidi naturali o modificati, dimostrando il potenziale utilizzo di questi composti. Questo potenziale si basa sulla facile modifica della sequenza, della carica netta, dell'idrofobicità, dell'anfipatia e della struttura secondaria del peptide.

## Polybia-MP1 come potenziale doppio agente antimicrobico e antitumorale

Nella ricerca di nuovi composti di interesse farmacologico, i veleni animali, e in particolare i veleni di imenotteri, sono emersi come un'interessante fonte di composti bioattivi.

I peptidi possono rappresentare fino al 70% dei veleni essiccati e al momento questi peptidi risultano in gran parte inesplorati nonostante mostrino un'ampia gamma di attività di interesse farmacologico.

Come caratteristica preziosa per il rapporto costi-benefici, sono generalmente più brevi nella sequenza rispetto ai peptidi provenienti da anfibi, pesci e mammiferi.

Pochi peptidi del veleno di imenotteri sono stati studiati per l'attività antitumorale. Tra questi vi sono la melittina, estratta dal veleno d'api e i peptidi della famiglia *Mastoparan* (figura 6), estratti dal veleno di vespe.

In quest'ultimo gruppo rientra un AMP che, così come le sue varianti sintetiche, ha dimostrato una potente attività antitumorale.

Si tratta di Polybia-MP1, isolato dal veleno di vespa *Polybia paulista* e recentemente studiato intensamente per il suo potenziale terapeutico. La ricerca ne ha evidenziato ampie proprietà antibatteriche, ma anche proprietà antimicotiche e antitumorali.

In particolare, Polybia-MP1 si è dimostrato come uno dei peptidi più selettivi e con minore attività emolitica della famiglia *Mastoparan* [H. L. Xuan 2021].

*Mastoparan* è una famiglia di peptidi bioattivi del veleno che possiedono proprietà strutturali comuni. Hanno una lunghezza di 14 residui, carica netta positiva, alto contenuto di residui idrofobici comunemente posti in posizione 1, 3, 6, 7, 9, 10, 13 e 14, mentre le posizioni 2 e 12 sono solitamente residui polari (figura 6).

Nell'analisi strutturale, i peptidi della famiglia *Mastoparan* sono classificati come AMP anfipatici cationici elicoidali, il tipo più diffuso di peptide antimicrobico in natura.

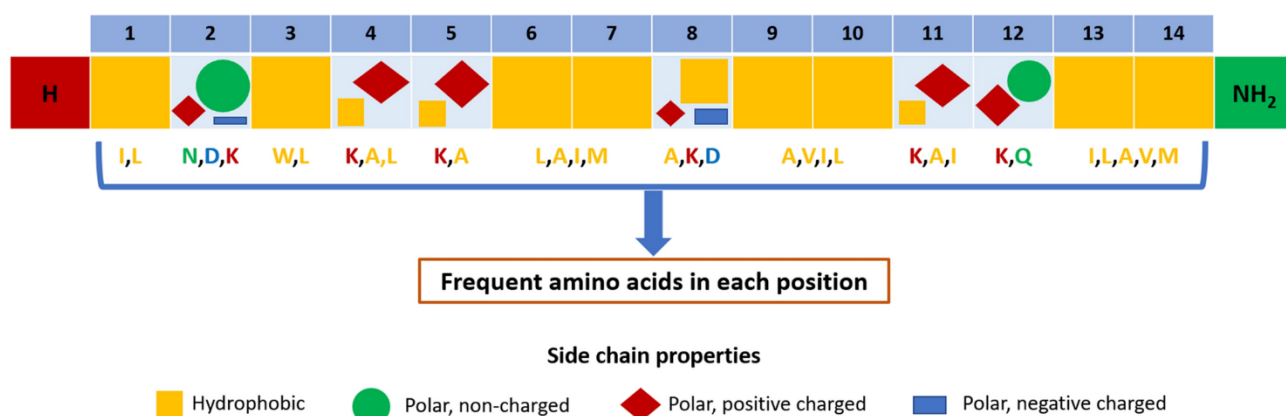


Figura 6. Schema generale della struttura di peptidi appartenenti alla famiglia *Mastoparan*.



Polybia-MP1 rispetto alle specie batteriche e ad alcune linee cellulari tumorali [H. L. Xuan 2021]. Le cellule tumorali prese di mira da Polybia-MP1 contengono due molecole di fosfolipidi, fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE). Questi fosfolipidi si trovano nel foglietto della membrana esterna delle cellule tumorali, mentre sono posizionati nel foglietto della membrana interna delle normali membrane cellulari. La combinazione sinergica dei due fosfolipidi migliora la capacità di Polybia-MP1 di trovare cellule cancerose e distruggerle. In effetti la fosfatidilserina è un fattore importante per l'adesione di Polybia-MP1 alle cellule, dal momento che la quantità di Polybia-MP1 che si lega a una membrana cellulare cancerosa simulata contenente questo componente è 7 volte superiore a quella che si lega alle membrane cellulari normali [H. L. Xuan 2021].

Dopo essersi legato alla superficie esterna della cellula, il peptide crea un foro abbastanza grande da consentire la fuoriuscita delle componenti intracellulari e tale foro sarà 20-30 volte più grande nelle cellule contenenti fosfatidiletanolamina [H. L. Xuan 2021].

Questi fori vengono creati in pochi secondi, ma sono abbastanza grandi da consentire a molecole importanti come l'RNA e le proteine di fuoriuscire dalla cellula, portando alla necrosi.

È stato evidenziato che Polybia-MP1, che quindi rientra nella classe dei peptidi antimicrobici naturali con anche attività antitumorale che agiscono provocando la necrosi della cellula bersaglio, impiega solo da 30 minuti a 1 ora per mostrare il 90% dell'attività massima, mentre la maggior parte dei farmaci e dei principi attivi richiedono almeno 12-48 ore nel test antitumorale [H. L. Xuan 2021].

Inoltre, è stato dimostrato che Polybia-MP1 ha una doppia azione, tra cui la lisi della membrana e l'inibizione del biofilm. Pertanto, esso potrebbe anche essere utilizzato, oltre che come agente antitumorale, anche come agente antimicrobico alternativo agli attuali farmaci antibiotici, dal momento che presenta le stesse proprietà biologiche generali di altri peptidi antimicrobici.

#### ○ **Modifiche chimiche**

Polybia-MP1 è considerato uno dei peptidi antimicrobici più corti che non solo ha mostrato un'attività ad ampio spettro ma anche quasi nessuna tossicità per i globuli rossi e i fibroblasti normali. Tuttavia, sebbene possieda un alto potenziale per diventare un farmaco alternativo per i trattamenti infettivi e contro il cancro, il suo utilizzo presenta ancora diversi ostacoli.

Ad esempio, esso è suscettibile alla degradazione proteolitica. Inoltre, la sua attività biologica deve essere ulteriormente migliorata per applicazioni specifiche.

Pertanto, molti studi si sono concentrati sulla progettazione, sintesi e valutazione di numerosi analoghi modificati con vari metodi.



### ▪ **Sostituzione degli amminoacidi**

La carica positiva è un fattore importante per l'interazione iniziale con la membrana batterica. La carica positiva di Polybia-MP1 è piuttosto bassa (+ 2) rispetto alla maggior parte degli attuali AMP naturali. Pertanto, sono stati condotti molti tentativi per migliorare la carica netta.

Tuttavia, l'aumento della carica netta ha come conseguenza la destabilizzazione della struttura elicoidale. Di conseguenza, aumenta l'attività inibitoria del peptide verso i batteri, ma aumenta anche la tossicità per i globuli rossi umani.

Per quanto riguarda i residui anionici, si è dimostrato che sono insostituibili per la selettività del peptide e non vanno quindi sostituiti. Si è invece ipotizzato che la sostituzione di residui non carichi con altri carichi positivamente potrebbe far aumentare il potere antimicrobico e diminuire la tossicità [H. L. Xuan 2021].

È stata anche studiata la sostituzione di un amminoacido nel mezzo della sequenza del peptide con la prolina, un residuo che interrompe una struttura elicoidale, al fine di fornire una maggiore flessibilità alla molecola. Questa sostituzione ha migliorato la potenza antimicrobica e antitumorale e ridotto l'attività emolitica di alcuni peptidi.

Tuttavia, nel caso di Polybia-MP1 si è persa completamente l'attività antitumorale.

Questo risultato ha ulteriormente confermato il ruolo cruciale della struttura elicoidale nell'attività biologica di Polybia-MP1 [H. L. Xuan 2021].

### ▪ **Ciclizzazione**

Fino ad ora sono stati usati due approcci per Polybia-MP1.

Il primo, ha effettuato una ciclizzazione mediante un ponte idrocarburico tra due residui idrofobici: la leucina in posizione 6 e l'alanina in posizione 10. Questo analogo è risultato più stabile nella struttura secondaria, più potente nei confronti dei batteri Gram-positivi e più resistente alla degradazione proteolitica rispetto al peptide originale. Tuttavia, ha evidenziato una maggiore attività emolitica e un'efficacia relativamente bassa nei confronti delle specie Gram-negative. Questi inconvenienti potrebbero essere spiegati principalmente da tre ragioni.

- Innanzitutto, anche se i residui di reticolazione sono stati introdotti al posto di due residui idrofobici, i residui di reticolazione sono più idrofobici di quelli sostituiti risultando quindi più dannosi per la membrana sanguigna.
- In secondo luogo, i batteri Gram-negativi hanno una struttura della membrana più complicata rispetto alle specie Gram-positive e questo richiede un equilibrio idrofilo-lipofilo ottimale per l'efficace interazione e perturbazione.
- Infine, si suggerisce che l'alto contenuto elicoidale in una soluzione acquosa di peptidi antimicrobici cationici indotto dal sistema di graffatura di idrocarburi non sia sempre

benefico per l'attività, ma possa aumentare la tossicità nei confronti delle cellule del sangue. Un secondo sistema di reticolazione applicato su Polybia-MP1 è la graffatura al triazolo mediante cicloadizione azide-alchino catalizzata da rame(I). Gli analoghi modificati ottenuti in questo modo hanno mostrato o la perdita della struttura  $\alpha$ -elicoidale, accompagnata da una perdita di potenza che li ha resi inattivi sia contro i batteri gram-positivi che gram-negativi, oppure un miglioramento dell'elicità e della stabilità proteolitica rispetto all'originale, ma senza mostrare benefici per la potenza antimicrobica e incrementando ulteriormente la tossicità per i globuli rossi umani.

#### ▪ **Incorporazione di D-amminoacido**

La sostituzione di un L-amminoacido con un D-amminoacido è stata applicata alla sequenza di Polybia-MP1 e ne ha notevolmente aumentato la stabilità nei confronti della tripsina e della chimotripsina. Tuttavia, la potenza antimicrobica e antimicotica dell'analogo modificato con tutti gli amminoacidi in configurazione D è stata solo leggermente migliorata o è rimasta inalterata in molte specie testate. Ciò potrebbe essere dovuto all'azione rapida di Polybia-MP1 che richiede solo poco tempo per mostrare la sua attività in vitro. Pertanto, anche se gli analoghi modificati di Polybia-MP1 avevano un'emivita molto più elevata, non risultavano molto più potenti rispetto alla versione naturale [H. L. Xuan 2021].

Nel caso dell'analogo sostituito con D-lisina, che aveva solo i residui di lisina sostituiti dalla loro configurazione D, la potenza e la struttura secondaria erano drasticamente diminuite, mentre la stabilità contro la degradazione proteolitica era altamente migliorata. Poiché non c'era quasi alcun cambiamento in altre proprietà fisiche come idrofobicità o carica netta, questo risultato ha confermato ancora una volta la forte correlazione tra la conformazione elicoidale e l'attività biologica.

## Conclusioni

In un quadro preoccupante in cui il cancro rimane una delle principali cause di morte globali e in cui gli approcci terapeutici sfruttati per farvi fronte si presentano come invasivi, ricchi di effetti deleteri e sempre meno efficienti a causa della comprovata resistenza delle cellule tumorali ai farmaci chemioterapici, si sono imposti come potenziale alternativa alla chemioterapia tradizionale i cosiddetti “peptidi anticancro” (ACP). Essi, che non sono altro che una specifica classe di peptidi antimicrobici naturali, presentano le caratteristiche più consuete degli AMP sia in quanto a struttura sia in quanto a modalità d’azione. In più però possiedono la capacità di interagire e distruggere le cellule tumorali.

In questo senso i peptidi anticancro potrebbero essere il futuro della lotta contro il cancro nonostante presentino limitazioni non trascurabili. Per farvi fronte la ricerca scientifica si impegna a progettare analoghi modificati che preservino le caratteristiche fisico-chimiche che sono risultate fondamentali per le proprietà terapeutiche riducendo allo stesso tempo gli effetti collaterali.

Tutto ciò al fine ultimo di convertirli in un agente chemioterapico che in futuro possa essere utilizzato in oncologia da solo o in combinazione con altre piccole molecole.

Allo scopo di prevedere quali ACP possano essere utilizzati per attivare le risposte immunitarie antitumorali, sono anche stati creati diversi *database* e *server web* per la previsione in silico dell’azione dei peptidi prima dell’analisi di laboratorio.

Tra i peptidi antitumorali che sono al centro di attuali studi scientifici vi è Polybia-MP1, un peptide antimicrobico naturale che ha dimostrato di avere proprietà antitumorali interessanti accompagnate da un’elevata selettività e da una bassa attività emolitica. Queste caratteristiche hanno portato la comunità scientifica a investire nella progettazione di peptidi modificati a partire da Polybia-MP1 tentando di incrementarne ulteriormente le proprietà farmacologiche e di diminuire le limitazioni.

Lo sviluppo di farmaci basati su peptidi si presenta tuttavia ancora pieno di sfide considerevoli come stabilità, tossicità e problemi di costo, ma l’attività nell’intervallo micromolare e l’attività emolitica relativamente bassa rendono di certo i peptidi anticancro meritevoli di ulteriori indagini.

## Bibliografia

- S. Aghamiri; F. Zandsalimi; P. Raee; M.A. Abdollahifar; S. C. Tan; T.Y. Low; S. Najafi; M. Ashrafizadeh; A. Zarrabi; H. Ghanbarian; M. Bandehpour *Pharmacological Research - Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer* 2021, 171
- J. Hong; X. Lu; Z. Deng; S. Xiao; B. Yuan; K. Yang *Molecules - How melittin inserts into cell membrane: conformational changes, inter-peptide cooperation, and disturbance on the membrane* 2019, 24, 1-17
- K. Kardani; A. Bolhassani *Immunotherapy - Antimicrobial/anticancer peptides: bioactive molecules and therapeutic agents* 2021, 13, NO. 8
- M. Manrique-Moreno; G. A. Santa-González; V. Gallego *Biosci Rep-Bioactive cationic peptides as potential agents for breast cancer treatment* 2021, 41 (12)
- D. B. Martins; Fadel, V; F. D. Oliveira; D. Gaspar; D. S. Alvares; M.A.R.B.Castanho; M. P. dos Santos Cabrera *Journal of Colloid and Interface Science - Protonectin peptides target lipids, act at the interface and selectively kill metastatic breast cancer cells while preserving morphological integrity* 2021, 601, 517-530.
- A. L. Tornesello; A. Borrelli; L. Buonaguro; F.M. Buonaguro; M. L. Tornesello *Molecules - Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities* 2020, 25, articolo 2850
- M. D. T. Torres; G. P. Andrade; R. H. Sato; C. N. Pedron; T. M. Manieri; G. Cerchiaro; A. O. Ribeiro; C. de la Fuente-Nunez; V. X. Oliveira Jr. *Beilstein J. Org. Chem. - Natural and redesigned wasp venom peptides with selective antitumoral activity* 2018, 14, 1693-1703
- M. Xie; D. Liu; Y. Yang *Open Biology - Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification* 2020, 1-10
- H. L. Xuan; T. D. Duc; A. M. Thuy; P. M. Chau; T. T. Tung *Amino Acids - Chemical approaches in the development of natural nontoxic peptide Polybia-MP1 as a potential dual antimicrobial and antitumor agent* 2021, 53, 843–852
- V. Yadav; R. Misra *Biochimie- A review emphasizing on utility of heptad repeat sequence as a tool to design pharmacologically safe peptide-based antibiotics* 2021, 191, 126-139