

Catarina Sofia Mateus Reis e Silva

**Uso de cromatografia de bioafinidade na prospecção de
substâncias anticâncer em actinomicetos marinhos: XIAP e
STMN1 como alvos farmacológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leticia Veras Costa Lotufo
Co- Orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

Versão corrigida.

São Paulo – SP

2021

Uso de cromatografia de bioafinidade na prospecção de substâncias anticâncer em actinomicetos marinhos: XIAP e STMN1 como alvos farmacológicos. Autora: Catarina Sofia Mateus Reis e Silva. Orientadora: Leticia Veras Costa Lotufo. Programa de pós-graduação em Farmacologia, ICB-USP.

Resumo

A riqueza dos produtos naturais é proveniente de uma otimização evolutiva de suas funções biológicas distintas que incluem a regulação de mecanismos endógenos de defesa e interação com outros organismos, o que explica a sua relevância para o tratamento de doenças infecciosas e o câncer. O câncer é um conjunto de doenças que pode se iniciar em qualquer tecido ou órgão, caracterizando-se pelo crescimento descontrolado de células que podem invadir outros tecidos e órgãos. Existem proteínas superexpressas em linhagens tumorais que auxiliam na viabilidade e sobrevivência do tumor, como são os casos da XIAP e da Statimina (STMN1), usadas como alvos no presente trabalho. A XIAP é uma proteína da família das proteínas inibidoras de apoptose que, inicialmente, foi identificada como uma proteína que se liga às caspases atuando na apoptose pela via intrínseca e extrínseca, sendo importante na regulação de diversas vias de morte celular e inflamação. A proteína STMN1 primeiramente foi caracterizada como um peptídeo de 18kDa superexpresso em leucemia aguda e linfócitos proliferativos, sendo uma proteína importante na progressão do ciclo celular, segregação cromossomal, mobilidade celular e sobrevivência por conta da sua atuação na desestabilização dos microtúbulos. Este estudo se desenvolveu em duas frentes, uma relacionada ao isolamento novas substâncias moduladoras das proteínas XIAP e STMN1 a partir do extrato de bactérias marinhas coletadas em diferentes pontos da costa brasileira (Descrita no capítulo 1); e uma segunda frente que envolveu o estudo de uma substância natural, embelina, isolada da planta *Embelia ribes*, e descrita na literatura como moduladora da XIAP (Descrita no capítulo 2). Referente ao capítulo 1, ambas as proteínas foram produzidas por expressão heteróloga, tendo o seu protocolo padronizado. A técnica de cromatografia de bioafinidade também se mostrou válida para a prospecção de substâncias que modulem ambas as proteínas sendo obtido ao final *hits* específicos e inespecíficos para ambas as proteínas. O isolamento das substâncias ativas e o seu teste em linhagens leucêmicas não foi possível, no entanto os extratos foram comparados ao banco de dados GNPS, AntiBase e Scifinder. A partir desta análise, foram anotadas duas substâncias correspondendo a dois

hits identificados na cromatografia de bioafinidade, a burkholona, que foi identificada quando utilizada a XIAP, e a phthoxazolina A, anotada quando utilizada a STMN1. Contudo não existe na literatura nenhum material relacionado à interação destas substâncias com as proteínas estudadas neste trabalho, que reforça a importância desta estratégia no estabelecimento de alvos para as substâncias citotóxicas. Referente ao capítulo 2, a embelina foi estudada em uma terapia combinada com o venetoclax. O venetoclax (ABT-199) é um fármaco de biodisponibilidade oral que inibe BCL2 seletivamente e foi aprovado para uso em 2016 para tratamento de leucemia linfocítica crônica. O presente estudo verificou que a combinação de venetoclax e embelina reduz a viabilidade das células derivadas de leucemia mieloide aguda (LMA) ao desencadear a apoptose, a regulação negativa de XIAP e o dano ao DNA induzido. Devido à baixa toxicidade da embelina, essa substância pode ser usada em combinação para reduzir as doses de venetoclax, o que poderia minimizar os efeitos colaterais com manutenção da resposta terapêutica ou até mesmo reverter mecanismos de resistência em pacientes com LMA. Nossas descobertas reforçam que ainda mais os medicamentos direcionados às IAPs são uma opção anticâncer putativa para a LMA.

Palavras-chave: produtos naturais, leucemia apoptose, prospecção alvo-direcionada

Use of bioaffinity chromatography to prospect for anticancer substances in marine actinomycetes: XIAP and STMN1 as pharmacological targets. Author: Catarina Sofia Mateus Reis e Silva. Supervisor: Leticia Veras Costa Lotufo. Graduation program in Pharmacology, ICB-USP.

Abstract

The richness of natural products comes from an evolutionary optimization of their distinct biological functions, which include the regulation of endogenous defense mechanisms and interaction with other organisms, which explains their relevance for the treatment of infectious diseases and cancer. Cancer is a set of diseases that can start in any tissue or organ, characterized by the uncontrolled growth of cells that can invade other tissues and organs. There are overexpressed proteins in cancer cell lines that assist in tumor viability and survival, as are the cases of XIAP and STathmina (STMN1), used as targets in the present study. XIAP is a protein from the apoptosis inhibiting protein family and was initially identified as a protein that binds to caspases acting inhibiting apoptosis by the intrinsic and extrinsic pathway, being important in the regulation of several pathways of cell death and inflammation. STMN1 was first characterized as an 18kDa peptide overexpressed in acute leukemia and proliferative lymphocytes, being an important protein in the progression of the cell cycle, chromosomal segregation, cell mobility and survival because of its role in destabilizing microtubules. This study was developed in two fronts, one related to the isolation of new substances modulating the proteins XIAP and STMN1 from the extract of marine bacteria collected in different points of the Brazilian coast (Described in chapter 1); and a second that involved the study of a natural substance, embelin, isolated from the *Embelia ribes* plant, described in the literature as a modulator of XIAP (described in chapter 2). Regarding chapter 1, both proteins were produced by heterologous expression, and their protocol was standardized. The functional chromatography technique also proved to be valid for the prospecting of substances that modulate both proteins, with specific and unspecific *hits* for both being obtained at the end. The isolation of the active substances and their testing in leukemia cell lines was not possible, however the extracts were compared to the GNPS, AntiBase and Scifinder database. Based on this analysis, two substances were annotated, corresponding to two hits identified in the functional chromatography, burkholone, which was identified when using XIAP, and phthoxazolin A, annotated when using STMN1.

However, there is no information in the literature relating to the potential interaction of these substances with the proteins studied in this work, which reinforces the importance of this strategy in the establishment of targets for cytotoxic substances. Referring to Chapter 2, embelin was studied in a combination therapy with venetoclax. Venetoclax (ABT-199) is an oral bioavailability drug that selectively inhibits BCL2 and was approved for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. We found that the combination of venetoclax and embelin reduces the viability of acute myeloid leukemia (AML) cells by triggering apoptosis, XIAP down-regulation and DNA damage induced. Due to the low toxicity of embelin, this drug can be used in combination to reduce doses of venetoclax, which could minimize side effects with maintaining therapeutic response or even reverse resistance mechanisms in AML patients. Our findings further highlight drugs targeting IAP as a putative anticancer option for AML.

Keywords: natural products, leukemia, apoptosis, target-oriented bioprospection

Considerações finais

O projeto inicial apresentado previa que no período de 24 meses a expressão heteróloga de ambas as proteínas, XIAP e STMN1, fossem padronizadas assim como os ensaios da cromatografia de bioafinidade. Com os resultados obtidos e os *hits* analisados então seriam purificadas substâncias ativas para os ensaios biológicos. A padronização foi concluída e ao fim foram testados 38 extratos de BRBs criando uma gama de dados que ainda podem ser trabalhados e estudados, contudo, em decorrência da pandemia mundial de Covid-19, não foi possível dar prosseguimento com a ideal inicial de purificação e isolamento de substâncias ativas impossibilitando os ensaios biológicos.

No lugar dos ensaios biológicos entraram as informações obtidas nos bancos de dados GNPS, AntiBase e Scifinder que ampliaram o conhecimento sobre o banco de bactérias do laboratório e também a sua riqueza. Desta maneira, duas substâncias foram sugeridas como potenciais moduladores dos alvos estudados, a burkholona com potencial afinidade para XIAP, e a phthoxazolin A com potencial afinidade para STMN1. Estes resultados abrem a perspectiva de estudo dessas substâncias em modelos de câncer com relevante papel da XIAP e STMN1.

Em paralelo, também foi evidenciado o efeito potenciado de indução de apoptose do tratamento combinado entre uma substância natural que atua sobre a XIAP, a embelina, e um fármaco, o venetoclax, já utilizado em clínica com atuação na proteína BCL2, também com relevante papel na regulação de apoptose em células tumorais. Neste estudo, ficou demonstrado que a abordagem combinada dos fármacos moduladores de alvos específicos e envolvidos na realização de um mesmo processo celular, a apoptose, traz um benefício significativo no aumento da atividade biológica. Mais além, estes dados ainda evidenciam a relevância da modulação de XIAP no efeito anticâncer de medicamento já em uso clínico, ressaltando a importância de se prospectar novas substâncias com capacidade de interagir com este alvo, oferecendo novas opções de tratamento anticâncer.

Durante todo o período do mestrado, período este que se estendeu além dos 24 meses iniciais, foram trabalhadas outras capacidades concomitantemente aos projetos. Utilizou-se o período para agregar conhecimento científico por meio de disciplinas, congressos nacionais/ internacionais, cursos e palestras, e organização de eventos.

Referências

1. Atanasov, A. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review - Infographic. (2008).
2. Jimenez, P. C. *et al.* Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 3–27 (2020).
3. Atanasov, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, (2021).
4. Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.* **77**, 703–723 (2014).
5. Costa-lotufo, L. V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C. & Epifanio, R. D. A. Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: History and perspectives. *Quim. Nova* **32**, 703–716 (2009).
6. Ferreira, E. G. *et al.* Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of Saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. *Chem. Biodivers.* **13**, 1149–1157 (2016).
7. Gomes, N. G. M., Dasari, R., Chandra, S., Kiss, R. & Kornienko, A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the 'supply problem'. *Mar. Drugs* **14**, (2016).
8. Imhoff, J. F., Labes, A. & Wiese, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnol. Adv.* **29**, 468–482 (2011).
9. GLOBOCAN. The Global Cancer Observatory - All cancers. *Int. Agent Res. Cancer - WHO* **419**, 199–200 (2020).
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
11. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
12. Nigam, M., Suleria, H. A. R., Farzaei, M. H. & Mishra, A. P. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. *DARU, J. Pharm. Sci.* **27**, 491–515 (2019).
13. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3670–3695 (2013).
14. Wilke, D. V. *et al.* Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. *Planta Med.* **87**, 49–70 (2021).

15. Approved Marine Drugs. <https://www.marinepharmacology.org/aproved>.
16. Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* **109**, 3012–3043 (2009).
17. Swinney, D. C. The value of translational biomarkers to phenotypic assays. *Front. Pharmacol.* **5 JUL**, 1–4 (2014).
18. Swinney, D. C. & Lee, J. A. Recent advances in phenotypic drug discovery. *F1000Research* **9**, 1–9 (2020).
19. Heilker, R., Lessel, U. & Bischoff, D. The power of combining phenotypic and target-focused drug discovery. *Drug Discov. Today* **24**, 526–532 (2019).
20. Bunnage, M. E., Gilbert, A. M., Jones, L. H. & Hett, E. C. Know your target, know your molecule. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 368–372 (2015).
21. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.* (2019).
22. Lau, E. C. *et al.* Functional chromatographic technique for natural product isolation. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 2255–2259 (2015).
23. Kang, M. J. *et al.* Functional Chromatography Reveals Three Natural Products that Target the Same Protein with Distinct Mechanisms of Action. *ChemBioChem* **15**, 2125–2131 (2014).
24. Sahm, B. D. B. *et al.* Targeting the Oncogenic TBX2 Transcription Factor With Chromomycins. *Front. Chem.* **8**, 1–9 (2020).
25. Abbas, R. & Larisch, S. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC. *Cells* **9**, 663 (2020).
26. Machado-Neto, J. A. *et al.* Stathmin 1 is involved in the highly proliferative phenotype of high-risk myelodysplastic syndromes and acute leukemia cells. *Leuk. Res.* **38**, 251–257 (2014).
27. Jost, P. J. & Vucic, D. Regulation of Cell Death and Immunity by XIAP. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **12**, (2020).
28. Machado-Neto, J. A., Saad, S. T. O. & Traina, F. Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis. *BMB Rep.* **47**, 660–665 (2014).
29. Niu, G. Genomics-Driven Natural Product Discovery in Actinomycetes. *Trends Biotechnol.* **36**, 238–241 (2018).
30. Velasco-Alzate, K. Y. *et al.* Marine Bacteria from Rocas Atoll as a rich source of pharmacologically active compounds. *Mar. Drugs* **17**, 1–16 (2019).

31. Jeong, H. *et al.* Genome Sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**, 644–652 (2009).
32. Büssow, K. *et al.* Structural genomics of human proteins - Target selection and generation of public catalog of expression clones. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1–13 (2005).
33. Mongkolthanaruk, W. Classification of bacillus beneficial substances related to plants, humans and animals. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1597–1604 (2012).
34. Ortiz, A. & Sansinenea, E. Chemical Compounds Produced by Bacillus sp. Factories and Their Role in Nature. *Mini-Reviews Med. Chem.* **19**, 373–380 (2018).
35. Juni, E. & Heym, G. A. Composed of Gram-Negative , Aerobic , Oxidase-Positive C occob acilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 388–391 (1986).
36. Zachariah, S., Kumari, P. & Das, S. K. Psychrobacter pocilloporae sp. Nov., isolated from a coral, pocillopora eydouxi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5091–5098 (2016).
37. Evans-yamamoto, D. *et al.* crossm Complete Genome Sequence of Psychrobacter sp . Strain. 18–19 (2019).
38. Kothe, C. I., Delbarre-Ladrat, C., Renault, P. & Passerini, D. Draft-genome sequence data and phylogenomic comparison of two marine-sourced bacterial strains Pseudoalteromonas sp. MIP2626 and Psychrobacter sp. BI730. *Data Br.* **31**, (2020).
39. Lasa, A. & Romalde, J. L. Genome sequence of three Psychrobacter sp. strains with potential applications in bioremediation. *Genomics Data* **12**, 7–10 (2017).
40. Mori, T. *et al.* Burkholone, a new cytotoxic antibiotic against IGF-I dependent cells from Burkholderia sp. *J. Antibiot. (Tokyo).* **60**, 713–716 (2007).
41. OMURA, S., TANAKA, Y., KANAYA, I., SHINOSE, M. & TAKAHASHI, Y. Phthoxazolin, a specific inhibitor of cellulose biosynthesis, produced by a strain of Streptomyces sp. *J. Antibiot. (Tokyo).* **43**, 1034–1036 (1990).
42. Kawada, M., Inoue, H., Usami, I. & Ikeda, D. Phthoxazolin A inhibits prostate cancer growth by modulating tumor-stromal cell interactions. *Cancer Sci.* **100**, 150–157 (2009).
43. Kirtonia, A. *et al.* A comprehensive review of genetic alterations and molecular targeted therapies for the implementation of personalized medicine in acute myeloid leukemia. *J. Mol. Med.* **98**, 1069–1091 (2020).
44. Ko, J. H. *et al.* The application of embelin for cancer prevention and therapy.

- Molecules* **23**, 1–14 (2018).
45. Prabhu, K. S. *et al.* Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein and PI3-kinase/AKT signaling by embelin suppresses growth of leukemic cells. *PLoS One* **12**, 1–17 (2017).
 46. Chen, K. *et al.* Preclinical evaluation of a regimen combining chidamide and ABT-199 in acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* **11**, (2020).
 47. Fulda, S. & Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 109–124 (2012).
 48. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
 49. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi & D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany, NY)*. **8**, 603–619 (2016).
 50. D’Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **43**, 582–592 (2019).
 51. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 52. Lima, K., Vicari, H.P., Carlos, J.A.E.G., Silva, J.C.L., Pontes, L.L.F., Rego, E.M., Machado-Neto, J. A. Obatoclax reduces cell viability of acute myeloid leukemia cell lines independently of their sensitivity to venetoclax. *Hematol Transfus Cell Ther* **in press**, in press (2021).
 53. Souers, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202–208 (2013).
 54. Roberts, A. W., Stilgenbauer, S., Seymour, J. F. & Huang, D. C. S. Venetoclax in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4527–4533 (2017).
 55. Pollyea, D. A. *et al.* Enasidenib, an inhibitor of mutant IDH2 proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 2575–2584 (2019).
 56. DiNardo, C. D. *et al.* Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **133**, 7–17 (2019).
 57. DiNardo, C. D. *et al.* Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute

- Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **383**, 617–629 (2020).
58. Liu, T., Zhang, J., Li, K., Deng, L. & Wang, H. Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* **11**, 1–14 (2020).
 59. Nishi, R. *et al.* Venetoclax and alvocidib are both cytotoxic to acute myeloid leukemia cells resistant to cytarabine and clofarabine. *BMC Cancer* **20**, 1–13 (2020).
 60. Samra, B. *et al.* Outcome of adults with relapsed/refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. *Am. J. Hematol.* **95**, E245–E247 (2020).
 61. Castelli, G., Pelosi, E. & Testa, U. Emerging therapies for acute myelogenous leukemia patients targeting apoptosis and mitochondrial metabolism. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 62. Yang, T. *et al.* Embelin Sensitizes Acute Myeloid Leukemia Cells to TRAIL through XIAP Inhibition and NF- κ B Inactivation. *Cell Biochem. Biophys.* **71**, 291–297 (2015).
 63. Moreno-Martínez, D. *et al.* XIAP inhibitors induce differentiation and impair clonogenic capacity of acute myeloid leukemia stem cells. *Oncotarget* **5**, 4337–4346 (2014).
 64. Carter, B. Z. *et al.* XIAP downregulation promotes caspase-dependent inhibition of proteasome activity in AML cells. *Leuk. Res.* **37**, 974–979 (2013).
 65. Lee, F. A. S. *et al.* Randomized Phase II Study of the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) Antisense AEG35156 in Combination with Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **39**, 609–613 (2016).
 66. Schimmer, A. D. *et al.* Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4741–4746 (2009).
 67. Cossu, F., Milani, M., Mastrangelo, E. & Lecis, D. Targeting the BIR Domains of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins in Cancer Treatment. *Computational and Structural Biotechnology Journal* vol. 17 142–150 (2019).