Produtos Naturais Marinhos com Atividade Anticâncer

LETICIA V. COSTA-LOTUFO & COLABORADORES

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

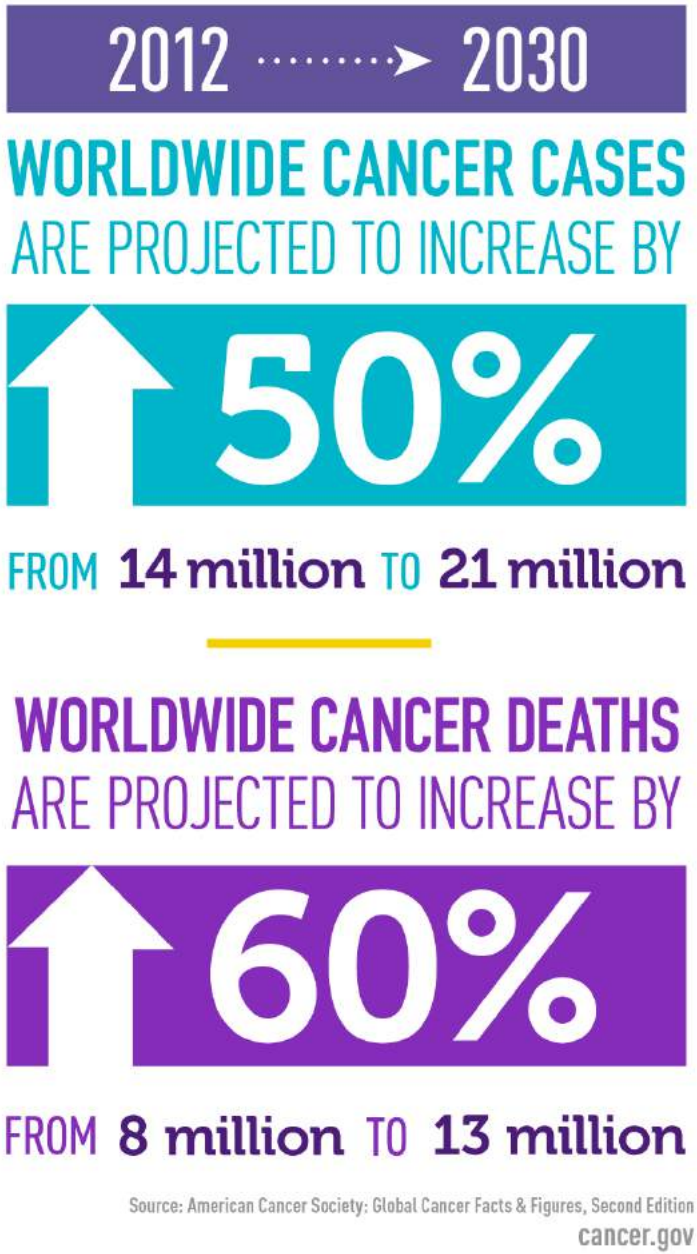
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Sumário

- Produtos naturais no tratamento do Câncer
- Rede ProspecMar – abordagens integrativas na prospecção de substâncias anticâncer
- Estudos Alvo-Direcionados
  - Fator de transcrição TBX2
  - Proteínas inibidoras de apoptose

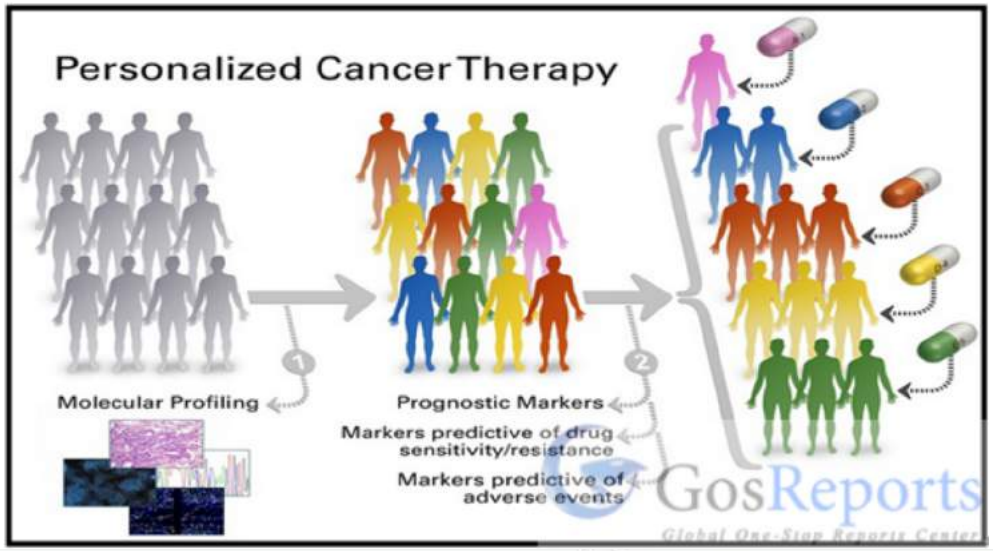
Câncer em Números:

- Segunda causa de morte por doenças;
- O número de novos casos de câncer chegará a 21 milhões nas próximas duas décadas;
- Mais que 60% dos casos diagnosticados ocorrem na Africa, Asia, a América Central e do Sul; 70% das mortes também ocorrem nessas localidades.



https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics

Tratamento do Câncer



- Resistência
- Toxicidade
- Custo

https://www.alliedmarketresearch.com/oncology-cancer-drugs-market

Fármacos Anti-Câncer:

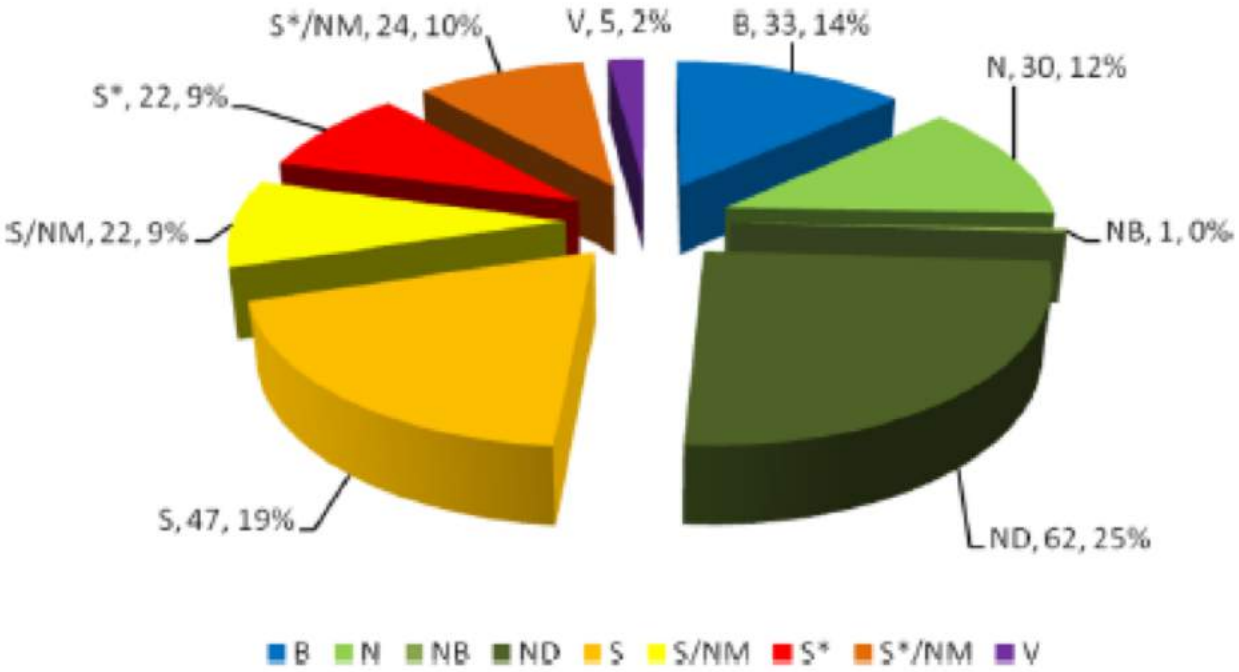


Figure 10. All anticancer drugs 1940s–2014 by source; $n = 246$.

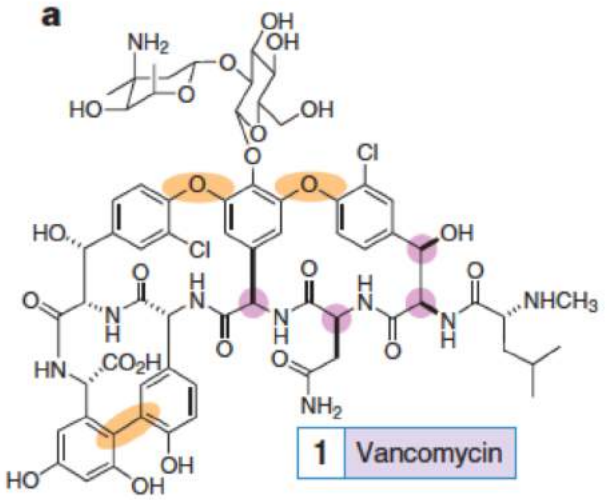
Newman & Cragg, 2016. J. Nat. Prod., 79:629.

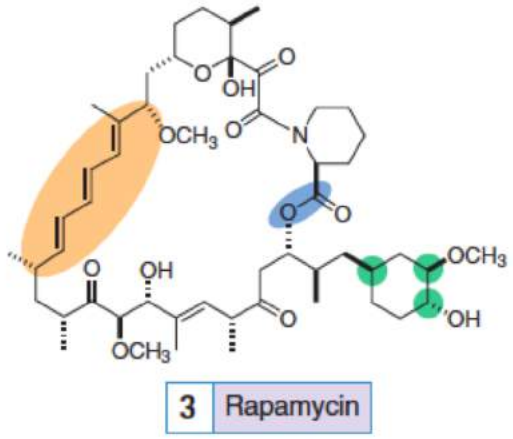
Table 1. Codes Used in Analyses

code	brief definition/year
B	Biological macromolecule, 1997
N	Unaltered natural product, 1997
NB	Botanical drug (defined mixture), 2012
ND	Natural product derivative, 1997
S	Synthetic drug, 1997
S*	Synthetic drug (NP pharmacophore), 1997
V	Vaccine, 2003
/NM	Mimic of natural product, 2003

Propriedades Estruturais:

- Presença de centros estereogênicos e maior complexidade estrutural que as moléculas sintéticas;
- Maior quantidade de relativa de carbono, hidrogênio e oxigênio que as moléculas sintéticas;
- Tamanho (massa molecular > 500Da) e polaridade (maior solubilidade em água).



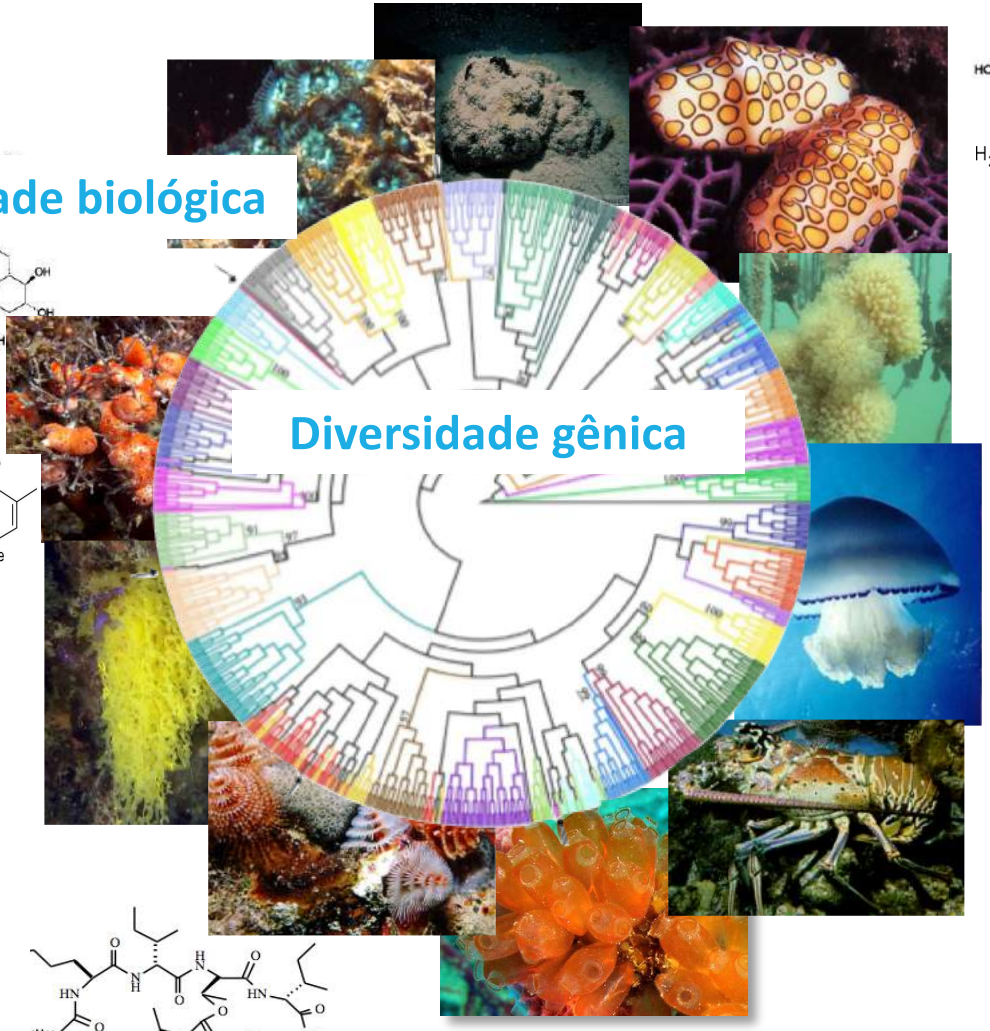


Clardy & Walsh. Nature, 432: 829.

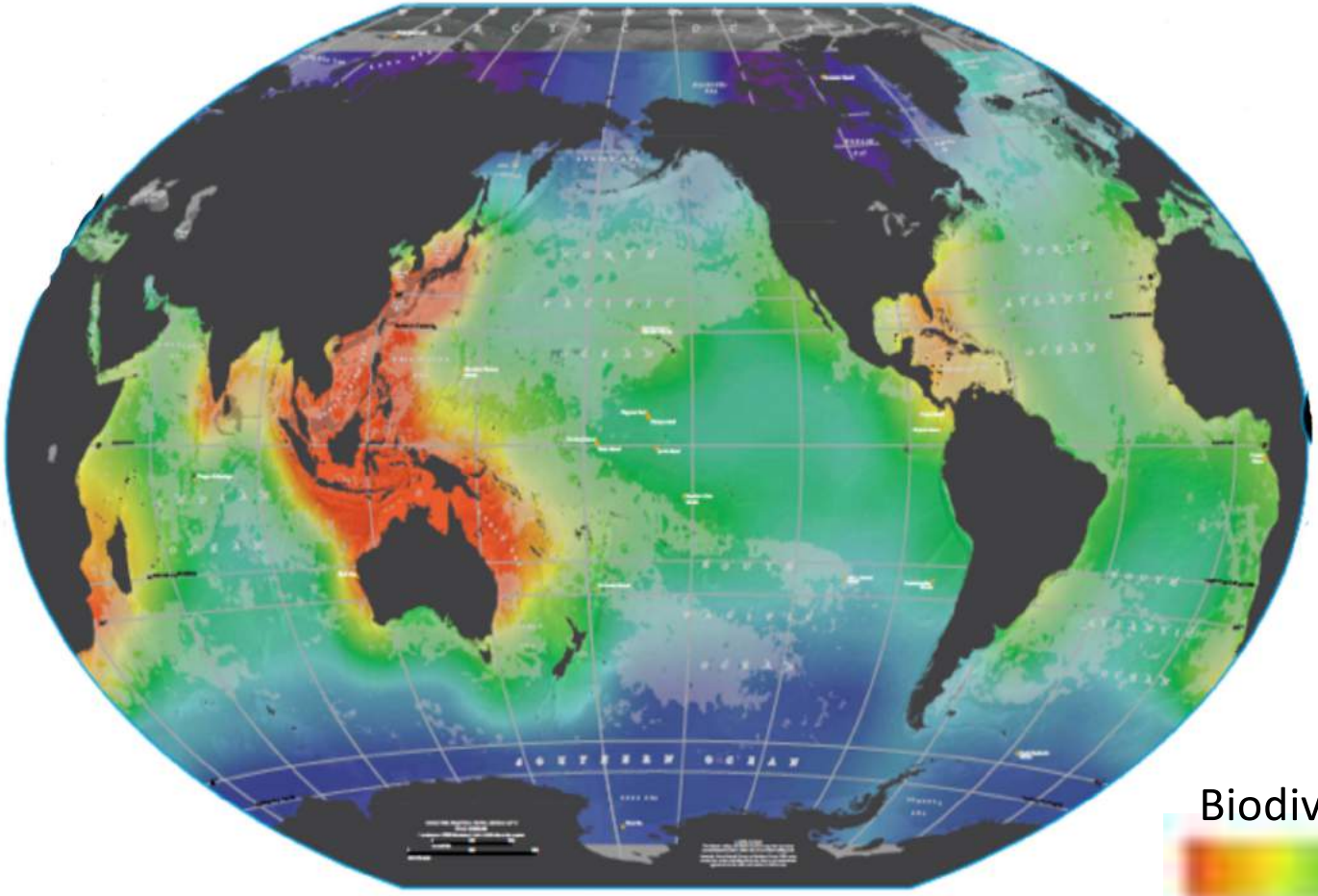
Diversidade química

Diversidade biológica

Diversidade gênica



BIODIVERSIDADE MARINHA



http://comlmaps.org/oceanlifemap/past-present-future

OPEN ACCESS Freely available online PLoS BIOLOGY

How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?

Camilo Mora[1,2]*, Derek P. Tittensor[1,3,4], Sina Adl[1], Alastair G. B. Simpson[1], Boris Worm[1]

1 Department of Biology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada, **2** Department of Geography, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, United States of America, **3** United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre, Cambridge, United Kingdom, **4** Microsoft Research, Cambridge, United Kingdom

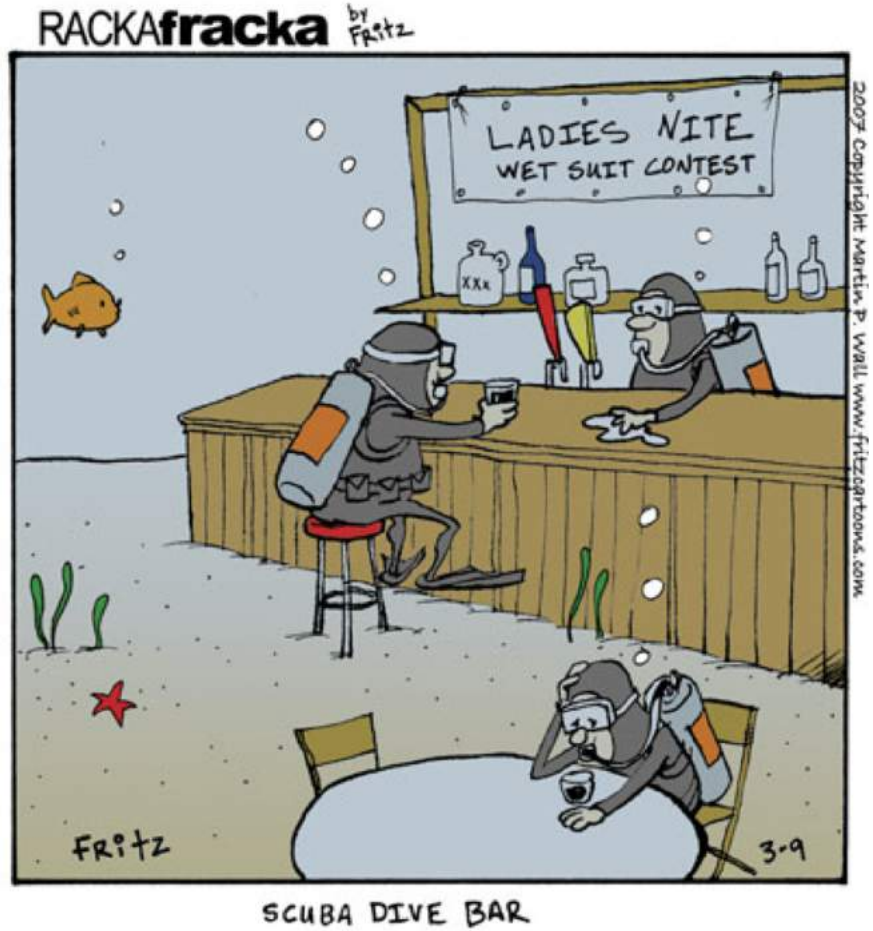
Table 2. Currently catalogued and predicted total number of species on Earth and in the ocean.

Species	Earth			Ocean		
	Catalogued	Predicted	±SE	Catalogued	Predicted	±SE
Eukaryotes						
Animalia	953,434	7,770,000	958,000	171,082	2,150,000	145,000
Chromista	13,033	27,500	30,500	4,859	7,400	9,640
Fungi	43,271	611,000	297,000	1,097	5,320	11,100
Plantae	215,644	298,000	8,200	8,600	16,600	9,130
Protozoa	8,118	36,400	6,690	8,118	36,400	6,690
Total	1,233,500	8,740,000	1,300,000	193,756	2,210,000	182,000
Prokaryotes						
Archaea	502	455	160	1	1	0
Bacteria	10,358	9,680	3,470	652	1,320	436
Total	10,860	10,100	3,630	653	1,320	436
Grand Total	**1,244,360**	**8,750,000**	**1,300,000**	**194,409**	**2,210,000**	**182,000**

Predictions for prokaryotes represent a lower bound because they do not consider undescribed higher taxa. For protozoa, the ocean database was substantially more complete than the database for the entire Earth so we only used the former to estimate the total number of species in this taxon. All predictions were rounded to three significant digits.

doi:10.1371/journal.pbio.1001127.t002

A CONQUISTA DO AMBIENTE

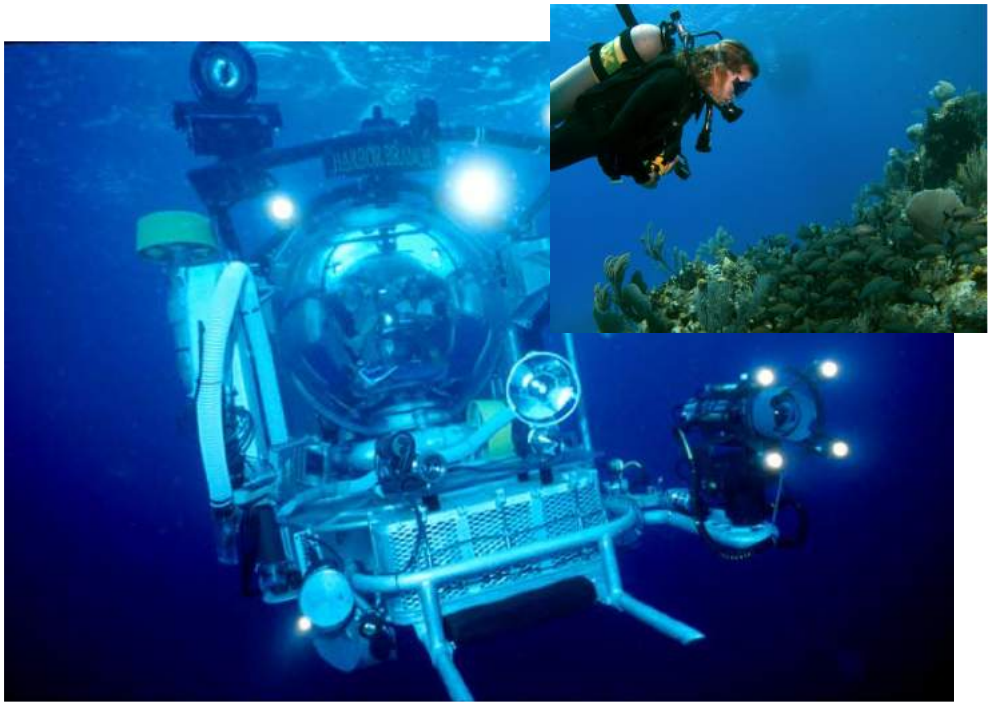


1950

DIAS ATUAIS...

A CONQUISTA DO AMBIENTE

- Invenção do equipamento de mergulho autônomo (1943);
- Revolução na exploração do ambiente marinho;
- Advento dos submersíveis.

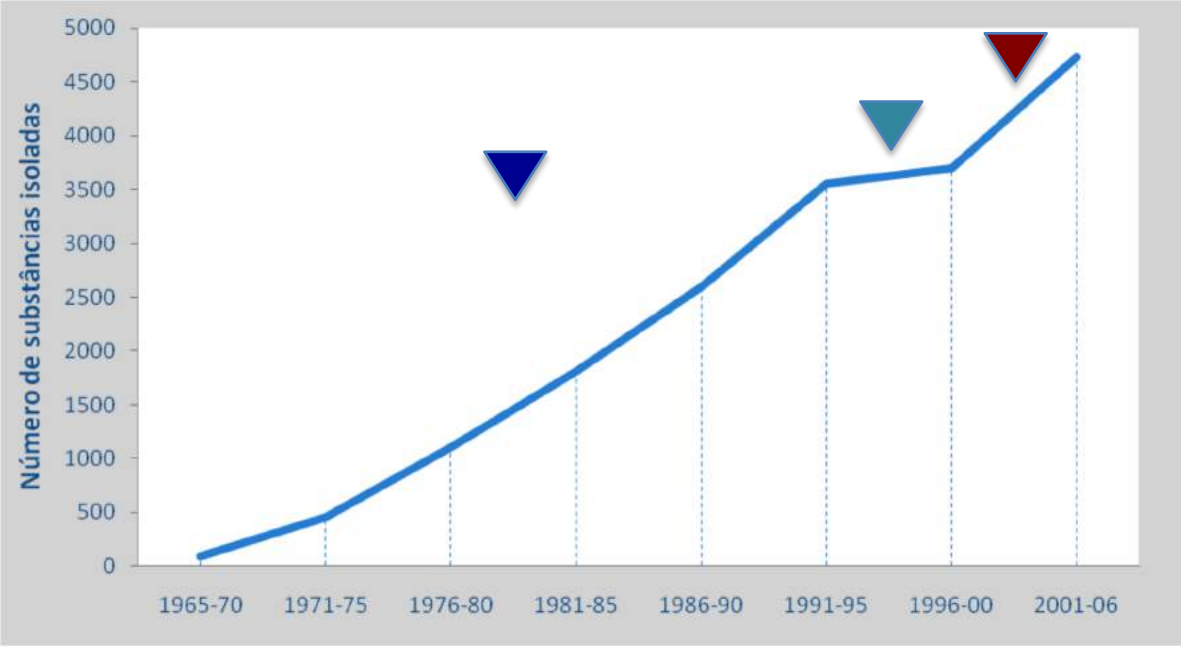


Jacques Cousteau e Simone Cousteau

It will happen, surgery will affix a set of artificial gills to man's circulatory system-right here at the neck-which will permit him to breathe oxygen from the water like a fish. Then the lungs will be by-passed and he will be able to live and breathe in any depth for any amount of time without harm.

PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Quantidade de novos produtos naturais marinhos isolados de 1965 a 2006.



- 2001-atual:
Ressurgimento do interesse da indústria farmacêutica. Novo perfil, empresas novas pequeno porte

- 1as décadas:
Explosão de moléculas com estruturas peculiares, alta potência, alvos biológicos novos

- 1990-2000:
Calmaria, indústria farmacêutica aposta na síntese e química combinatória

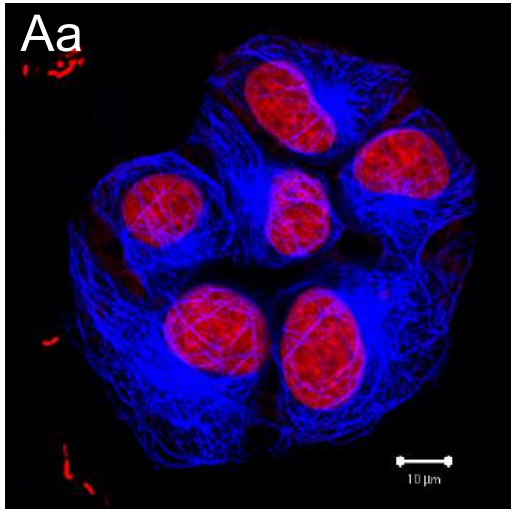
Costa-Lotufo et al., 2009.

ALVOS MOLECULARES:

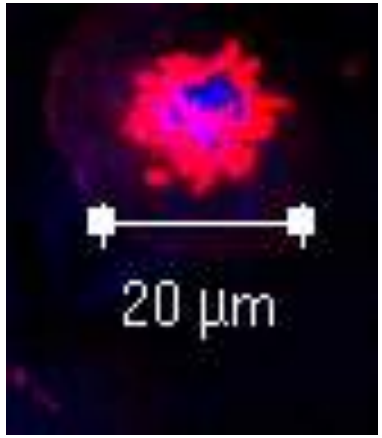
- Canais iônicos
- Enzimas
- Microtúbulos
- DNA
- Lisossomos
- Calmodulina
- Proteossomos
- Estresse oxidativo
- Modulação do sistema imune

Newman & Cragg, 2006. Current Drug Targets 7: 279-304.

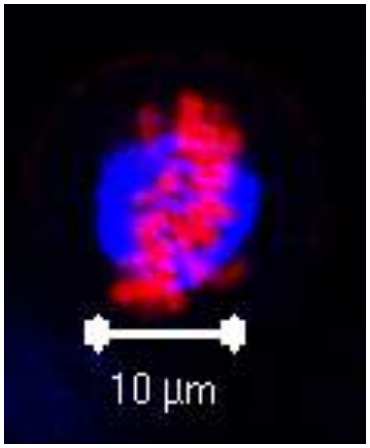
Aa



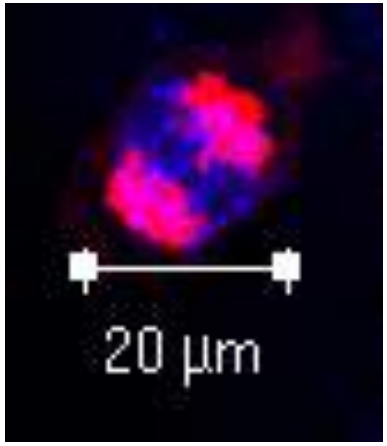
Ab



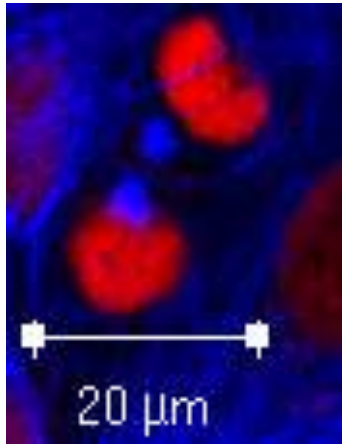
Prófase



metáfase

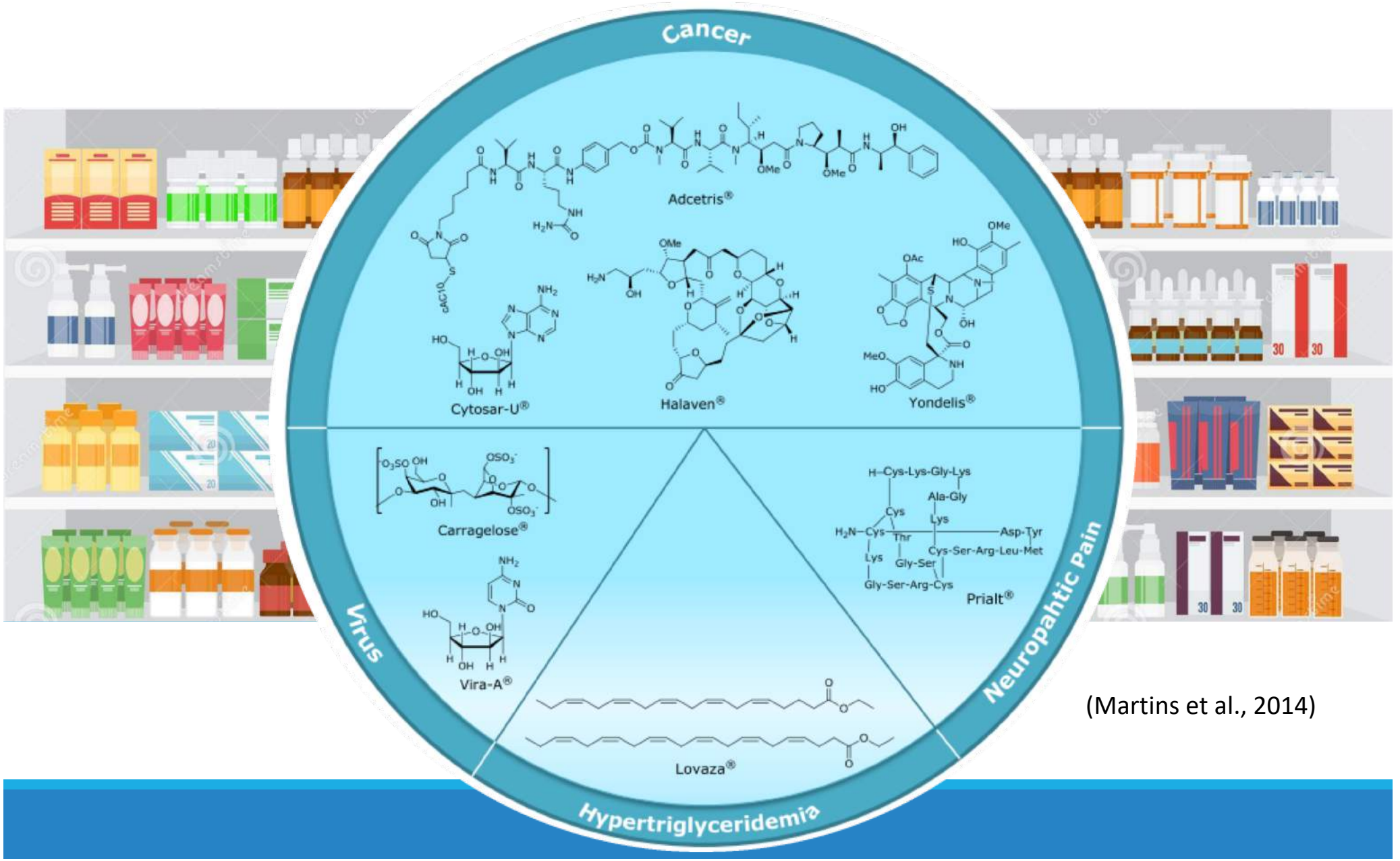


anáfase



telófase

FÁRMACOS MARINHOS



(Martins et al., 2014)

CLINICS

REVIEW ARTICLE

Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans

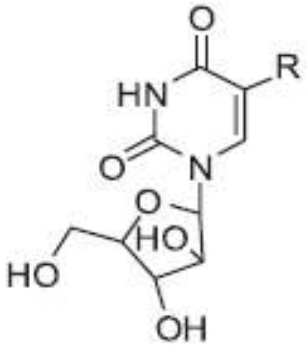
Paula Christine Jimenez,[I] Diego Veras Wilke,[II] Leticia Veras Costa-Lotufo[III,*]

[I]Departamento de Ciencias do Mar, Universidade Federal de Sao Paulo, Santos, SP, BR. [II]Nucleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, CE, BR. [III]Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR.

Jimenez PC, Wilke DV, Costa-Lotufo LV. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. Clinics. 2018;73:e482s

*Corresponding author. E-mail: costalotufo@usp.br

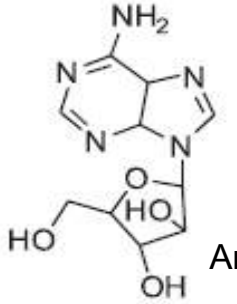
NUCLEOSÍDEOS DE ESPONJA



Espongotimidina R= H
Espongouridina R = Me

Bergman & Feeney, 1951

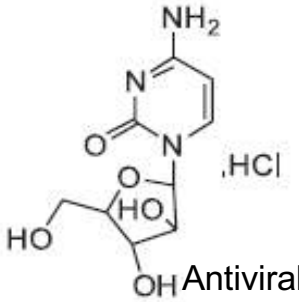
Adenina arabinosídeo



Anticâncer

Ara-a
(vidarabina®, thilo®)

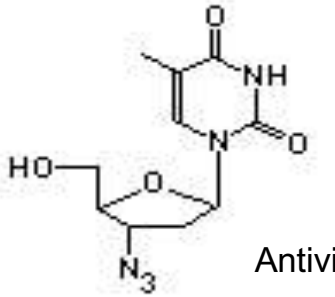
Citosina arabinosídeo



Antiviral

Ara-c
(citarabina®, alexan®, udicil®)

Azidotimidina

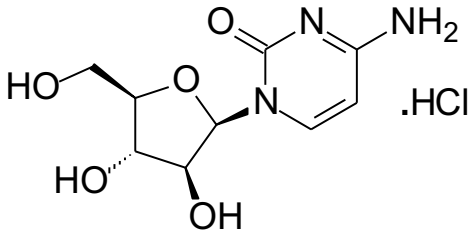


Antiviral

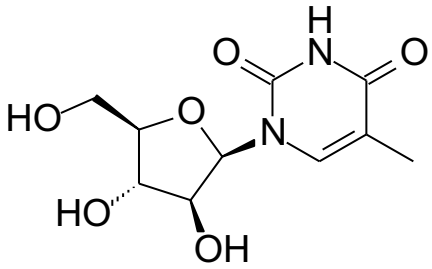
AZT
(retrovir®, zidovir®)

Cytarabine
Synthesis inspired by natural products

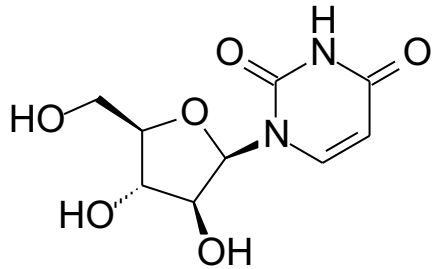
Arabinonucleosides isolated from marine sponge *Tectitethya cripta*



Cytarabine



Spongothymidine



Spongouridine

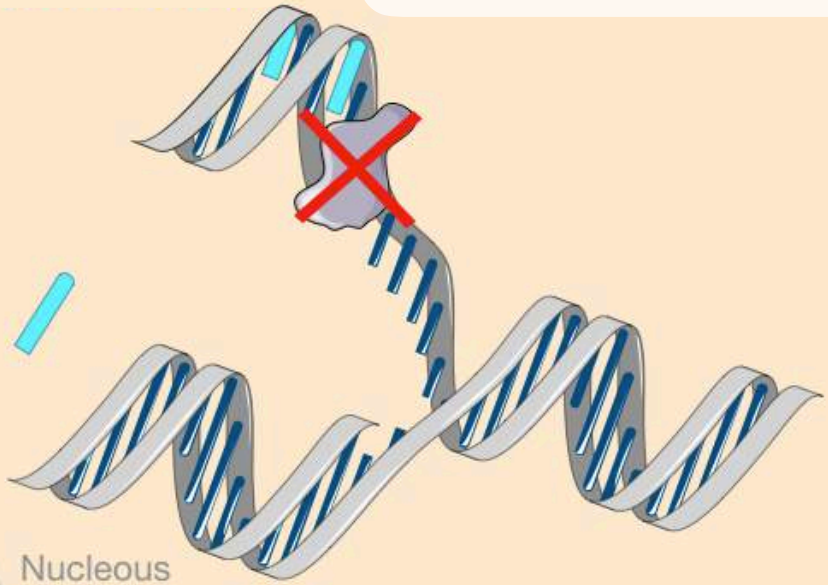
Mechanisms of action and effects of cytarabine

- **Inhibition of DNA duplication**
- **Inhibition of DNA transcription**
- **Apoptosis induction**

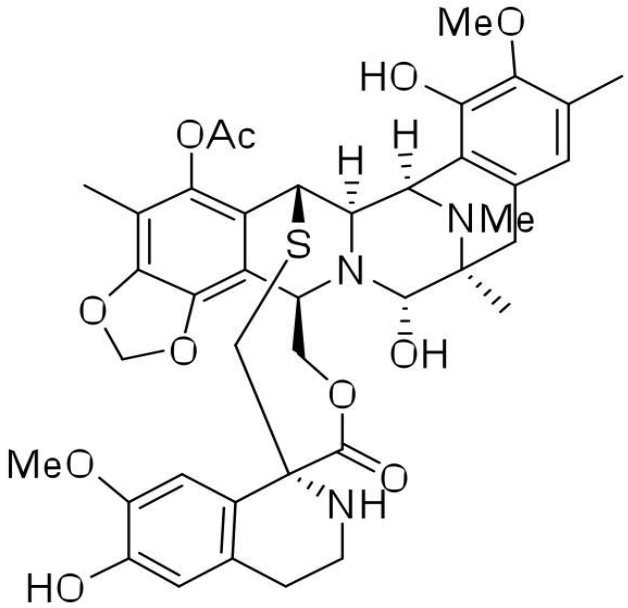
3. Fake nucleotide incorporation in DNA

2. Conversion to cytarabine-5'-triphosphate

1. **Cytarabine** internalization by nucleosides transporter



TRABECTEDINA



Trabectedina (ET-743)

Origem: Ascídia *Ecteinascidia turbinata*

Usos:

Aprovado pela EMEA, em 2007, para o tratamento de sarcoma de tecidos moles.

Aprovado pelo FDA em 2015.

SUPRIMENTO – ET743

Rendimento a partir da coleta - 0.0001%

Aquacultura:

- Hastes ou redes submersas
- Recifes artificias de concreto

Produtividade:

- 2001 – 80 ton métricas
- 2004 – 100 ton métricas
- Máximo – 250 ton métricas

Rendimento:

- 0.5 and 4.0 µg g^{-1}

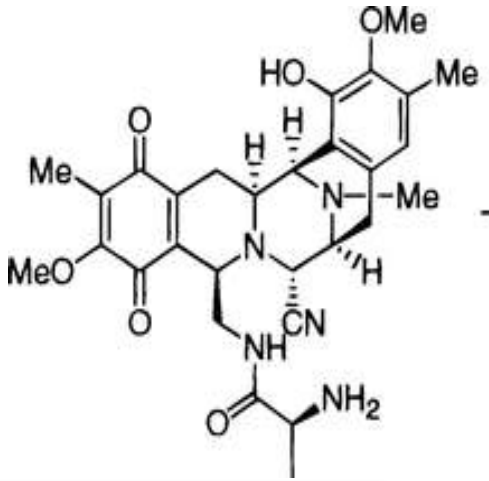
Quantidades suficientes para testes clínicos!!!

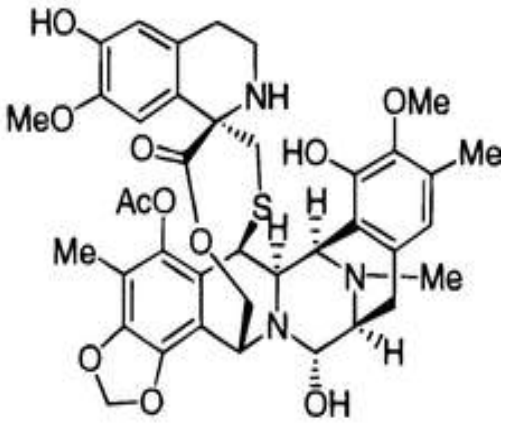
Economicamente inviável para comercialização.

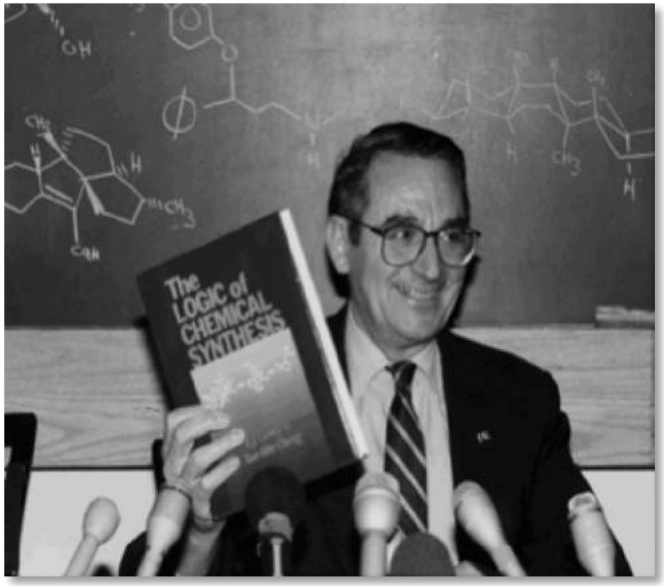
Cuevas & Francesch, 2009. *NPR* 26: 322-337.

Cianosafracina B

Trabectedina



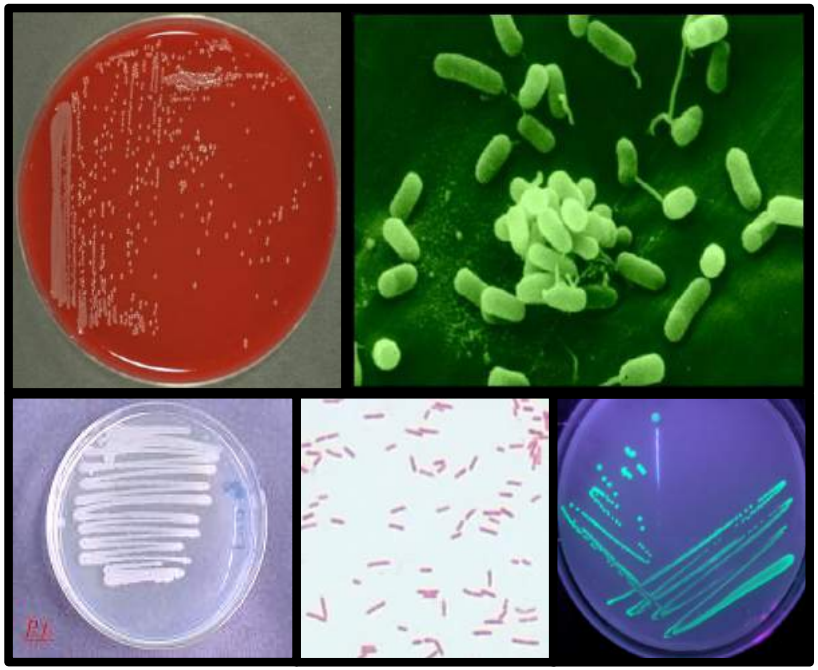




Elias James Corey

Emeritus Professor Harvard U.

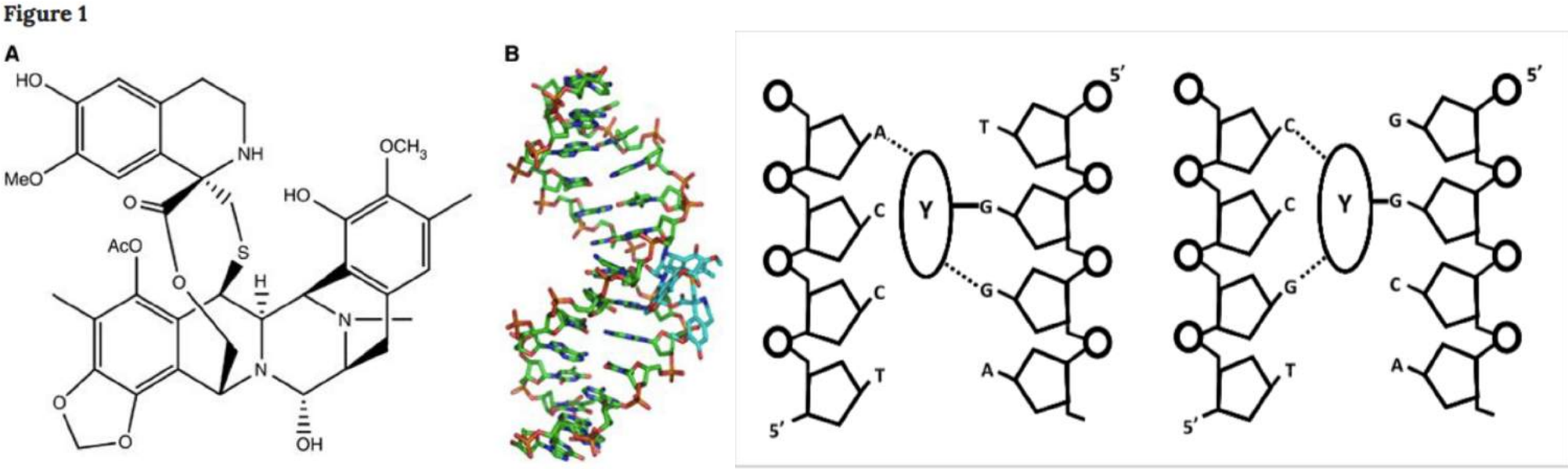
Nobel Prize in Chemistry, 1990



Pseudomonas fluorescens

Mechanism of action

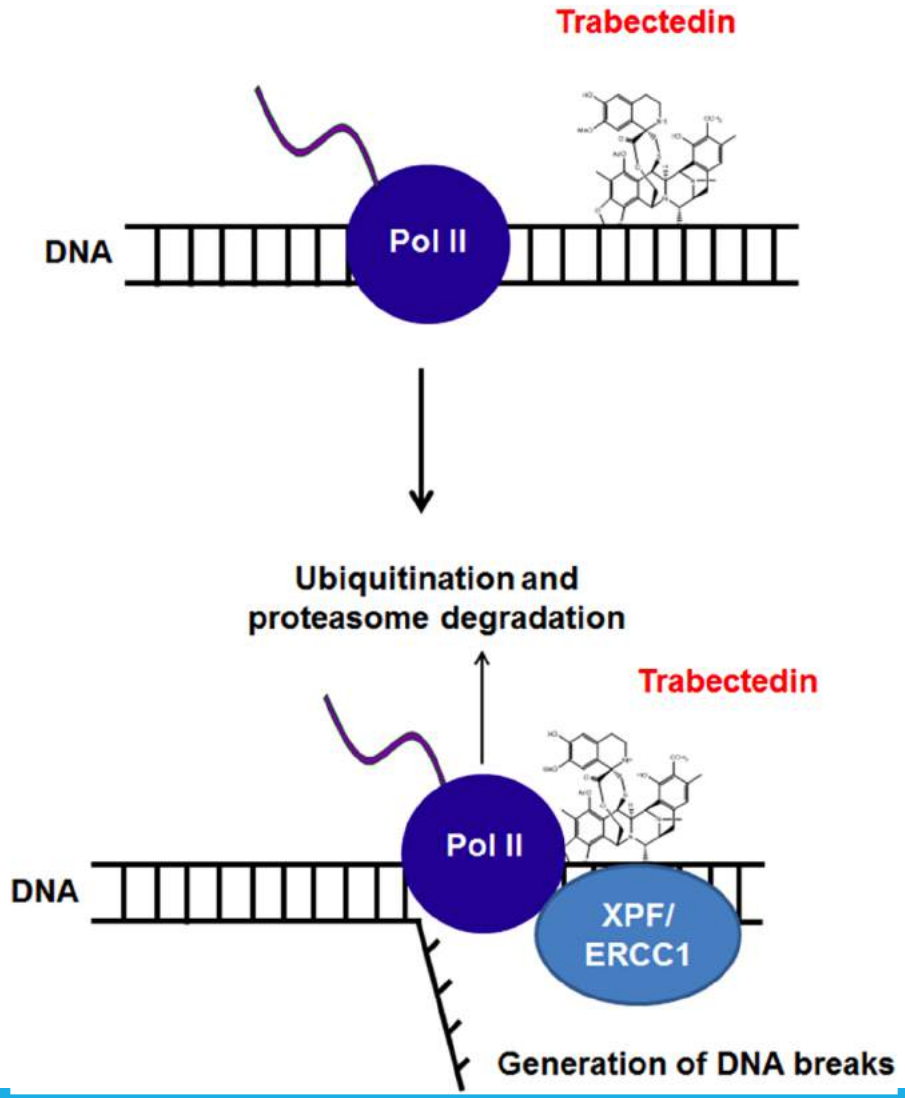
Bind covalently to the exocyclic amino group of guanines in the minor groove of DNA



D’Inalci et al., 2014, British J Cancer 111: 646

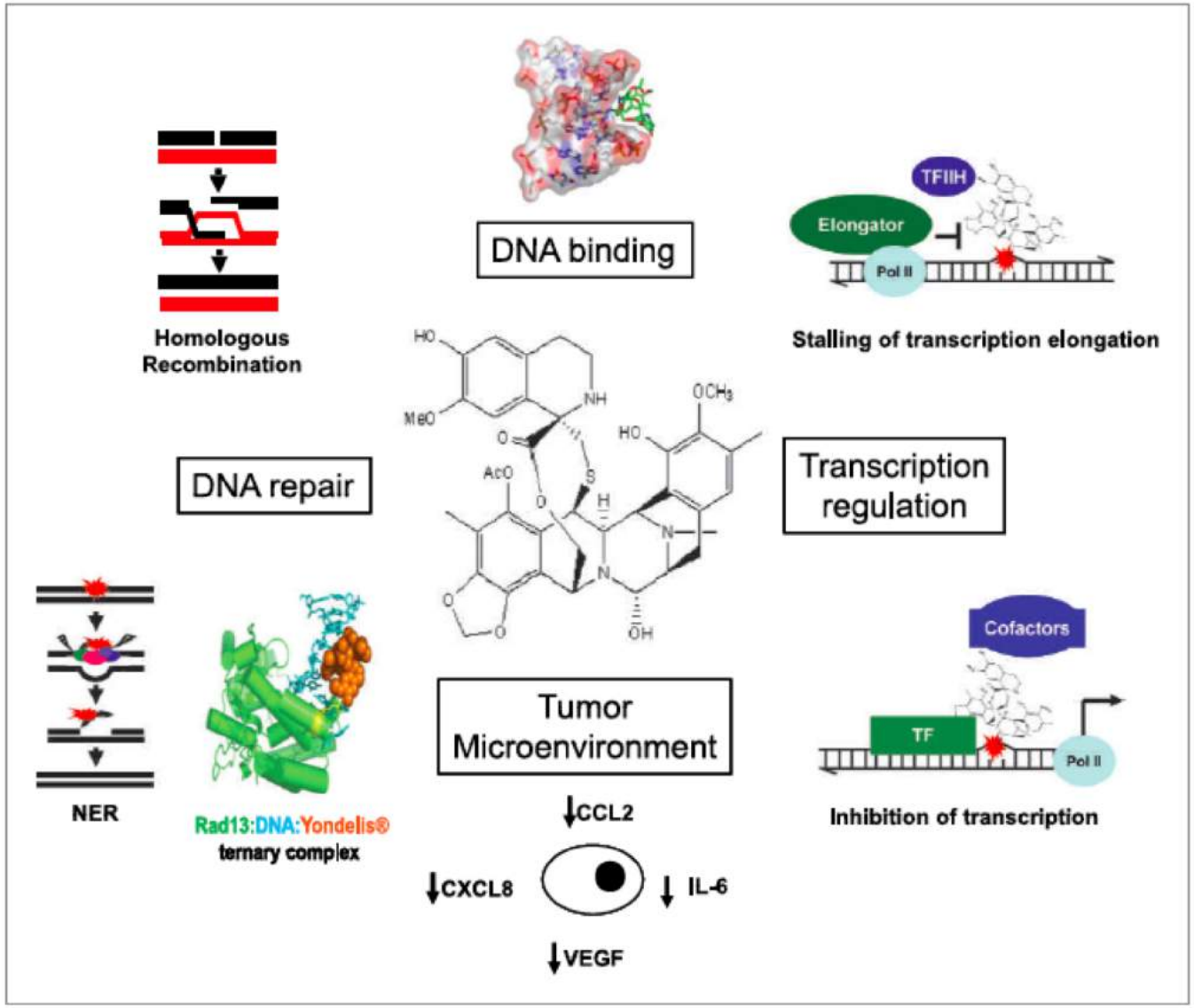
D’Inalci and Galmarini, 2010, Mol Cancer Ther; 9(8); OF1–7.

Blockade and degradation of RNA polymerase II

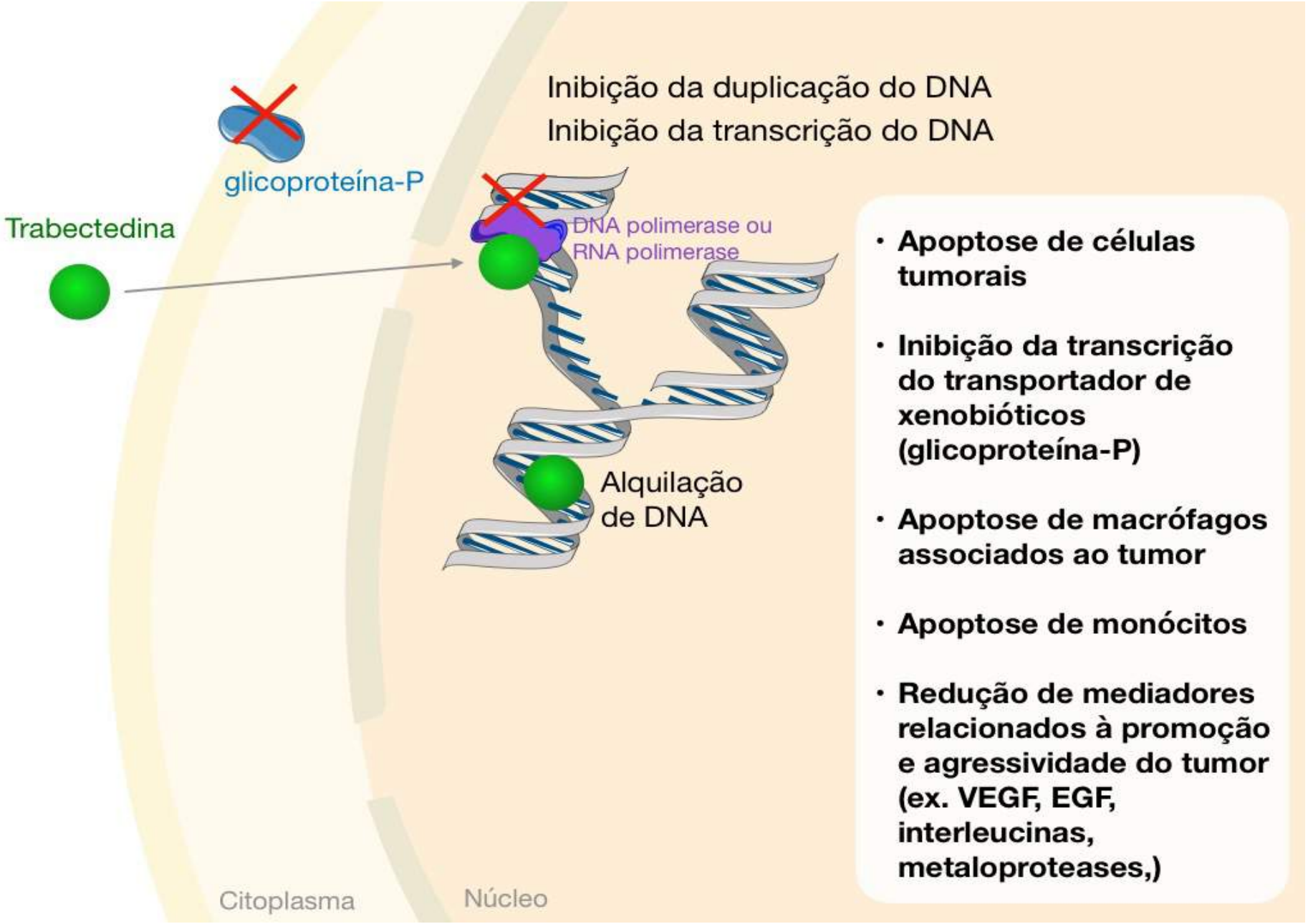


Larsen et al., Cancer Chemother Pharmacol (2016) 77:663–671

Mechanism of Action



D'Inalci and Galmarini ., 2010, Mol Cancer Ther; 9(8); OF1–7.


Inibição da duplicação do DNA
Inibição da transcrição do DNA
glicoproteína-P
Trabectedina
DNA polimerase ou
RNA polimerase
Alquilação
de DNA
Citoplasma
Núcleo
• Apoptose de células tumorais
• Inibição da transcrição do transportador de xenobióticos (glicoproteína-P)
• Apoptose de macrófagos associados ao tumor
• Apoptose de monócitos
• Redução de mediadores relacionados à promoção e agressividade do tumor (ex. VEGF, EGF, interleucinas, metaloproteases,)

Características únicas:

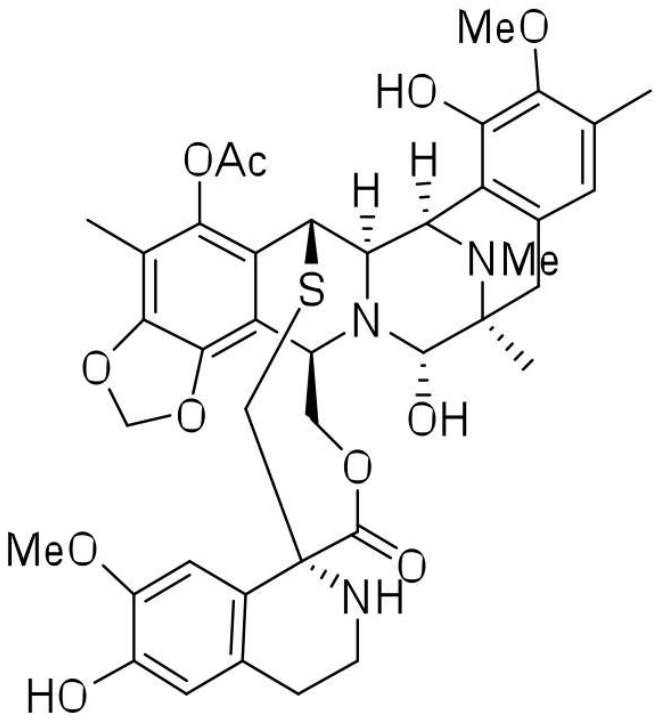
- Trabectedina - primeira substância descrita capaz de deslocar fatores de transcrição oncogênico de seus promotores
- Células deficientes no sistema de reparo (*nucleotide excision repair* – NER) são geralmente mais sensíveis a cisplatina enquanto são resistentes a trabectedina
- Células deficientes no sistema de recombinação heteróloga (HR) (por ex., com mutação nos genes BRCA1 ou BRCA2) são sensíveis a trabectedina assim como a compostos de platina

D'Inalci et al., 2014, British J Cancer 111: 646

Pharma Mar

http://www.pharmamar.com

Sede: Madrid - Espanha



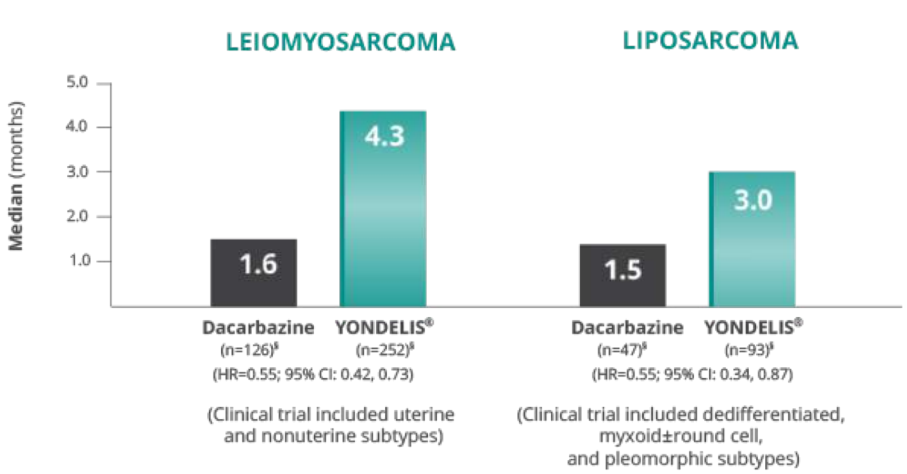
Trabectedina

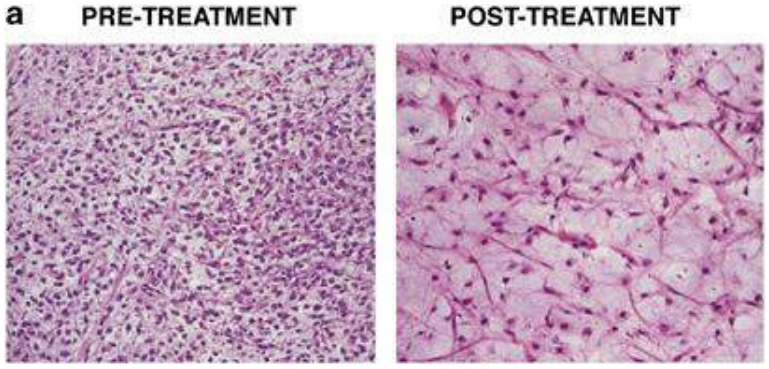
(ET-743, Ecteinascidina)

USO CLÍNICO:

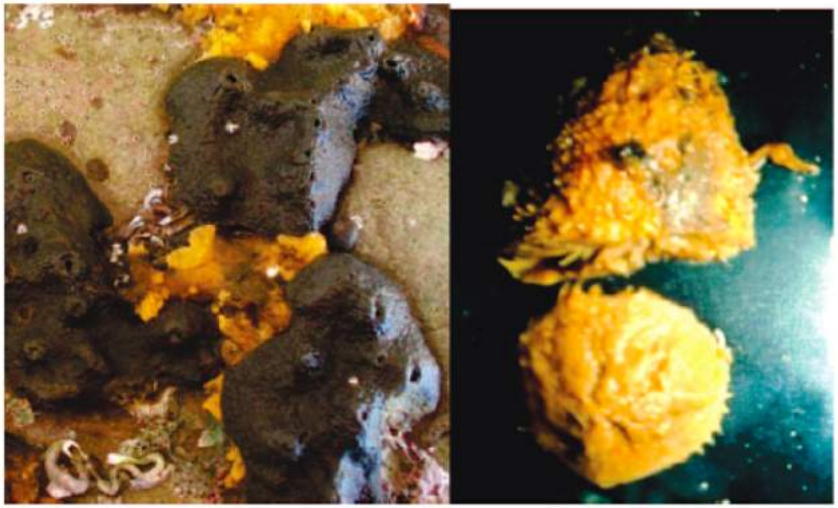
YONDELIS® é o único tratamento recentemente aprovado especificamente para liposarcoma inoperável ou metástico ou leiomiosarcoma após tratamento com antraciclina

Presença da proteína quimérica FUS-CHOP ou EWS-CHOP – atuam como fatores anormais de transcrição. A trabectedina bloqueia a habilidade dessas quimeras de ativar a transcrição, reativando a rediferenciação.





HALICONDRINA



Halichondria okadai *Lissodendoryx*

- 1985 - Uemura et al. – 600 Kg de esponja
- 1987 – Munro & Blunt – encontram halicondrinas em esponjas do gênero *Lissodendoryx* (200Kg)
- 1 tonelada de esponja – 310 mg de halicondrina B

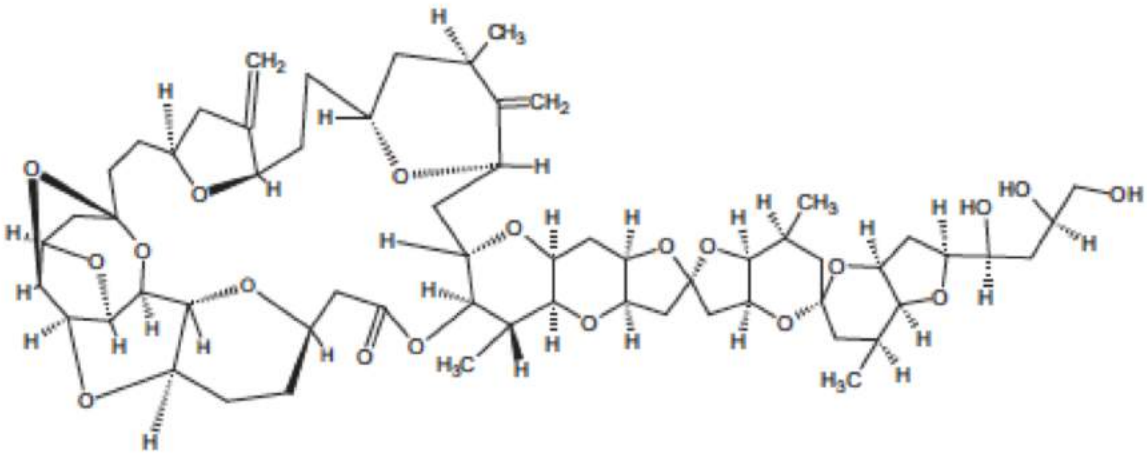


Fig. 1. Chemical structure of halichondrin B.

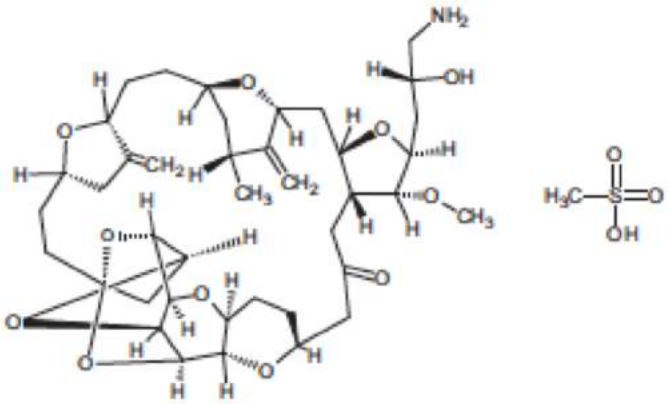


Fig. 2. Chemical structure of eribulin mesylate.

Chem. Rev. **2009**, *109*, 3044–3079

The Halichondrins and E7389

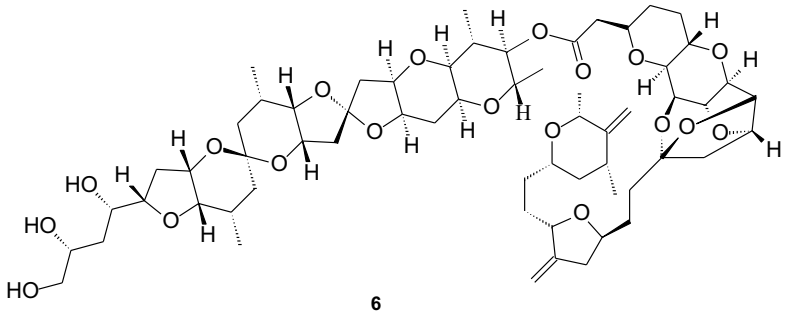
Katrina L. Jackson, James A. Henderson, and Andrew J. Phillips*

Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, Colorado 80309-0215

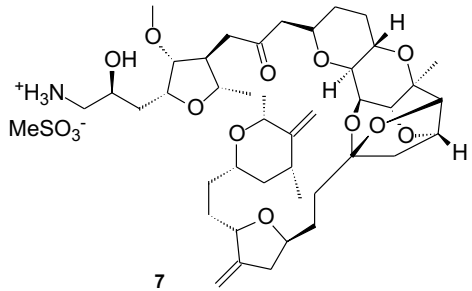
Halaven®

Halichondria okadai *Lissodendoryx*

- 1985 - Uemura et al. – 600 Kg de *H. okadai*
- 1987 – Munro & Blunt – *Lissodendoryx* (200Kg)
- 1 ton de esponja – 310 mg de halicondrina B

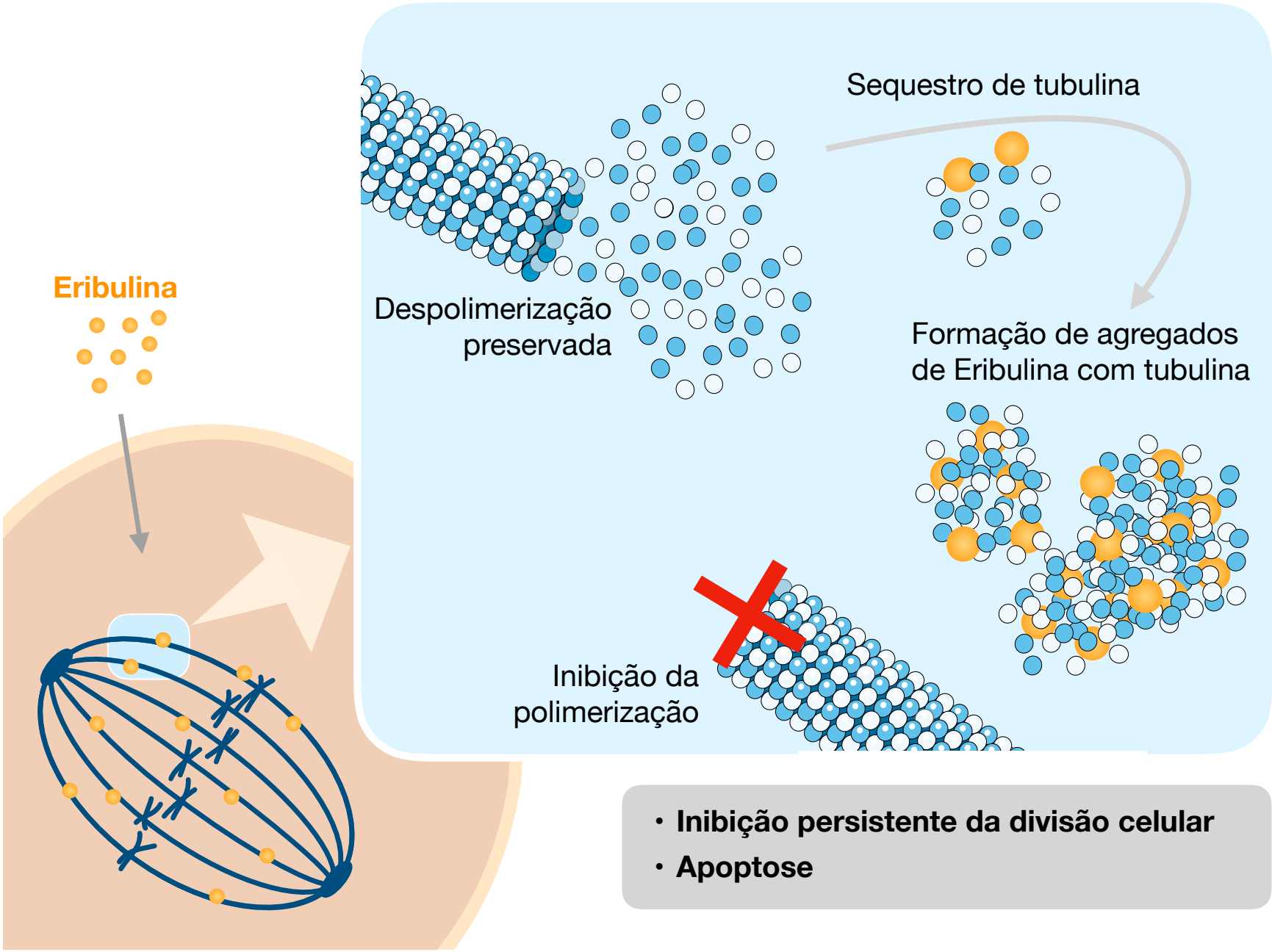


6



7

2011– Aprovado para tratamento de cancer de mama metastático



- **Inibição persistente da divisão celular**
- **Apoptose**

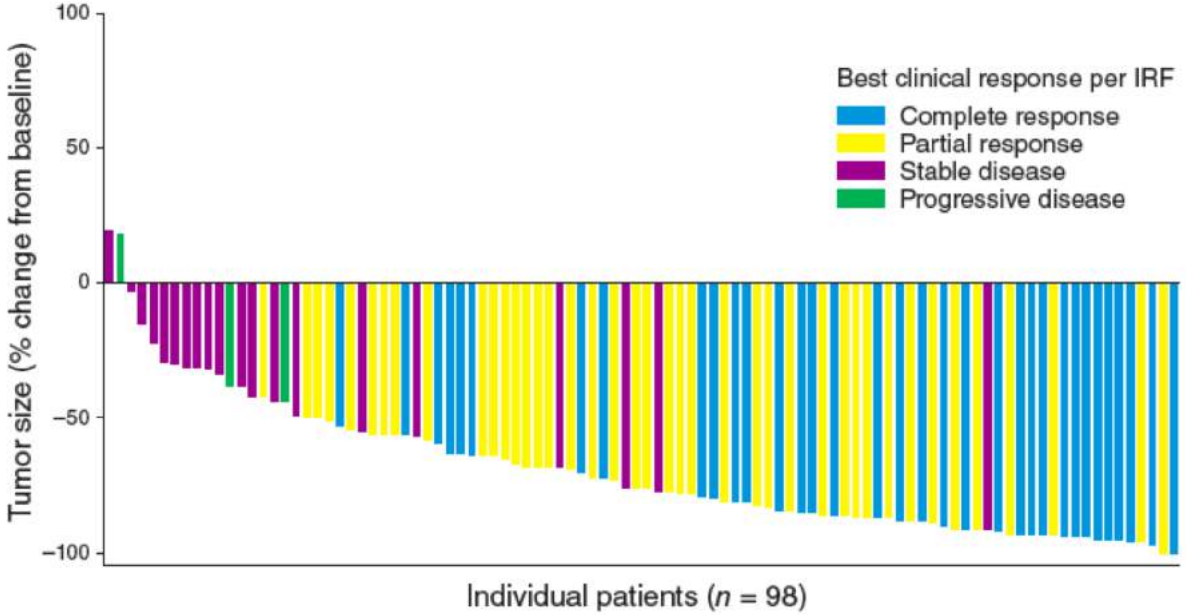
HALAVEN®

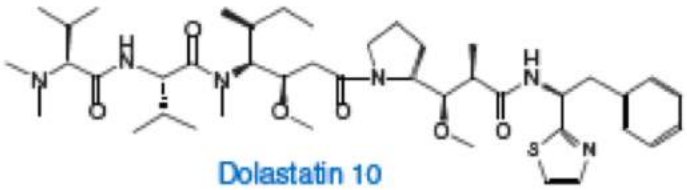
Indicação: câncer de mama refratário a quimioterapia com antraciclinas e taxanos.

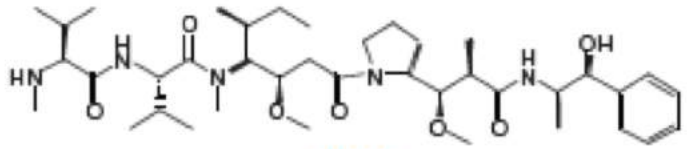
A Eisai está comercializando o mesilato de eribulina desde 2010 nos EUA;

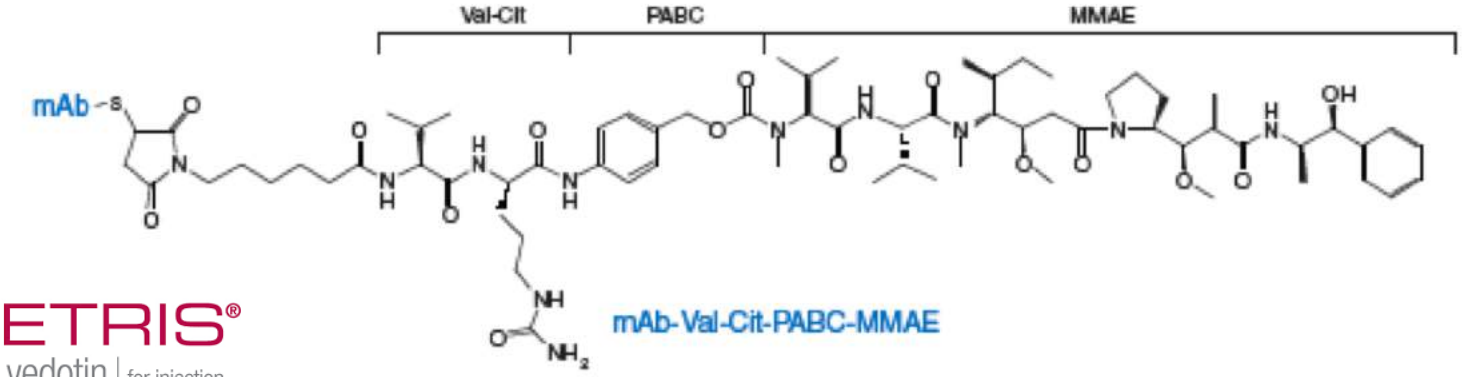
Em 2011, o Halaven foi aprovado na europa, Singapura e Japão.

Adcetris®



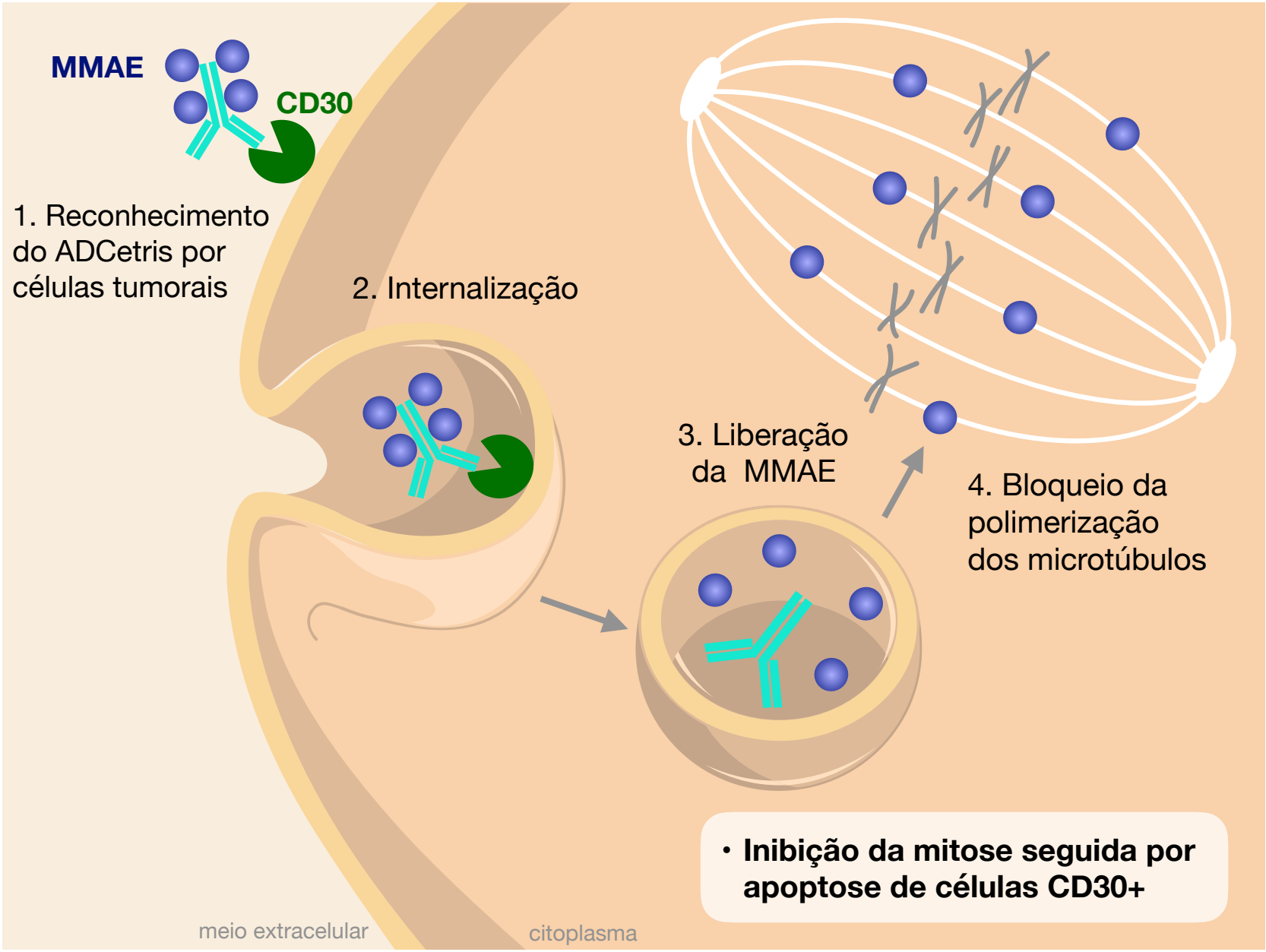






ADCETRIS®
brentuximab vedotin | for injection

Senter & Sievers, 2012. Nature Biotechnology, 30, 631.

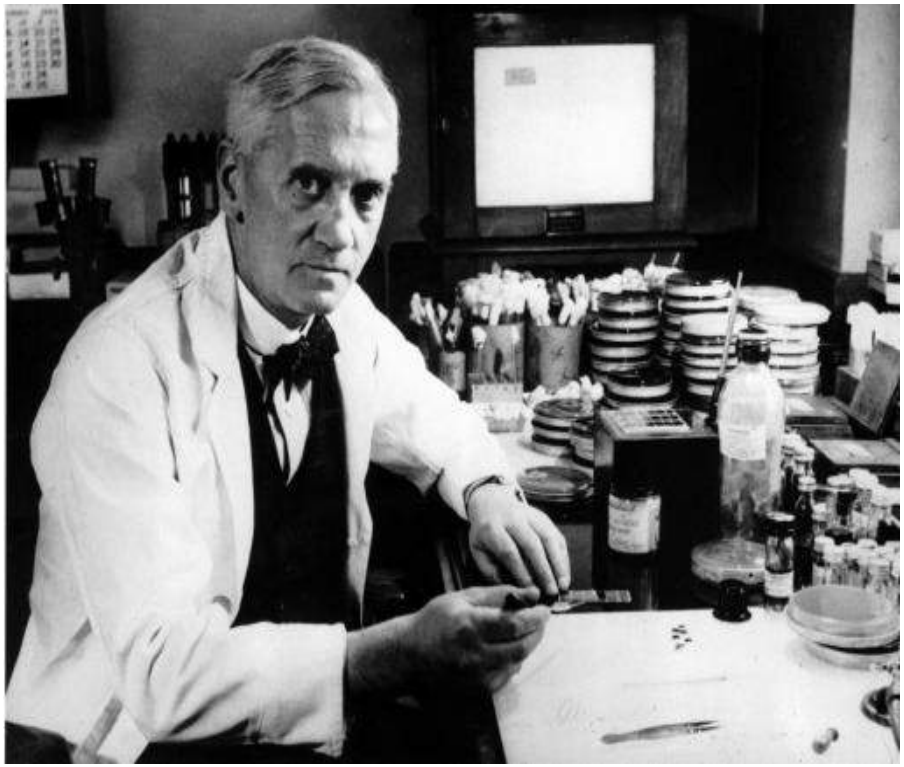

MMAE
CD30
1. Reconhecimento do ADCetris por células tumorais
2. Internalização
3. Liberação da MMAE
4. Bloqueio da polimerização dos microtúbulos
• Inibição da mitose seguida por apoptose de células CD30+
meio extracelular
citoplasma

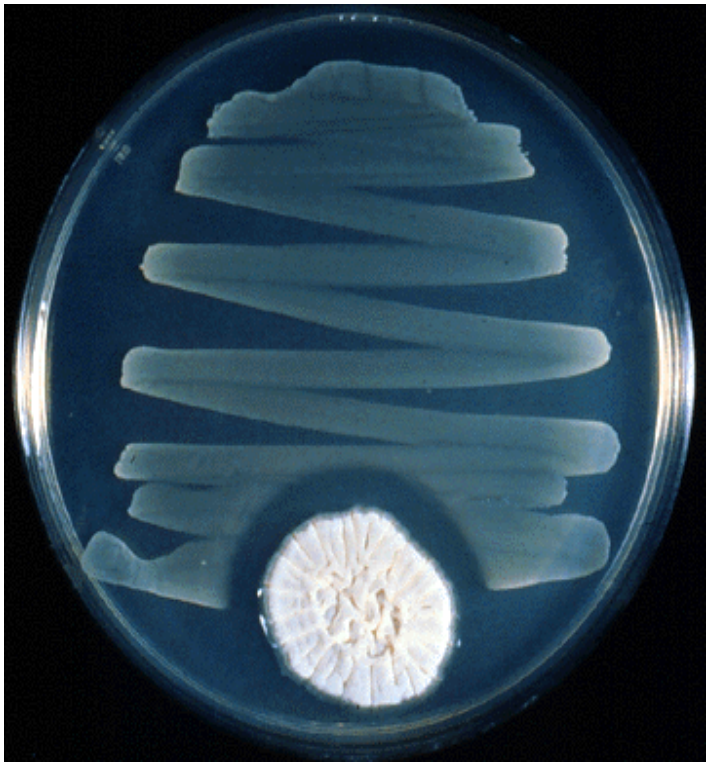
Compound Name	Trademark (FDA Approved Year)	Marine Organism	Chemical Class	Molecular Target	Disease Area
Plinabulin (NPI-2358)	NA	Fungus	Diketopiperazine	Microtubules	Cancer: Non-Small Cell Lung Cancer, Brain Tumor
Tetrodotoxin	Halneuron™	Pufferfish	Guanidinium alkaloid	Sodium Channel	Pain: Chronic Pain
Lurbinectedin (PM01183)	NA	Tunicate	Alkaloid	RNA Polymerase II	Cancer: Ovarian Cancer, Breast Cancer, SCLC
Depatuxizumab mafodotin (ABT-414)	NA	Mollusk/ cyanobacterium	ADC (MMAF)	EGFR & microtubules	Cancer: Glioblastoma, Pediatric Brain Tumors
Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A)	NA	Mollusk/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	CD79b & microtubules	Cancer: Non-Hodgkin lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia, Lymphoma, B-Cell, lymphoma, Follicular

http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinical_pipeline.html

MICRORGANISMOS MARINHOS

FLEMING E A DESCOBERTA DA PENICILINA





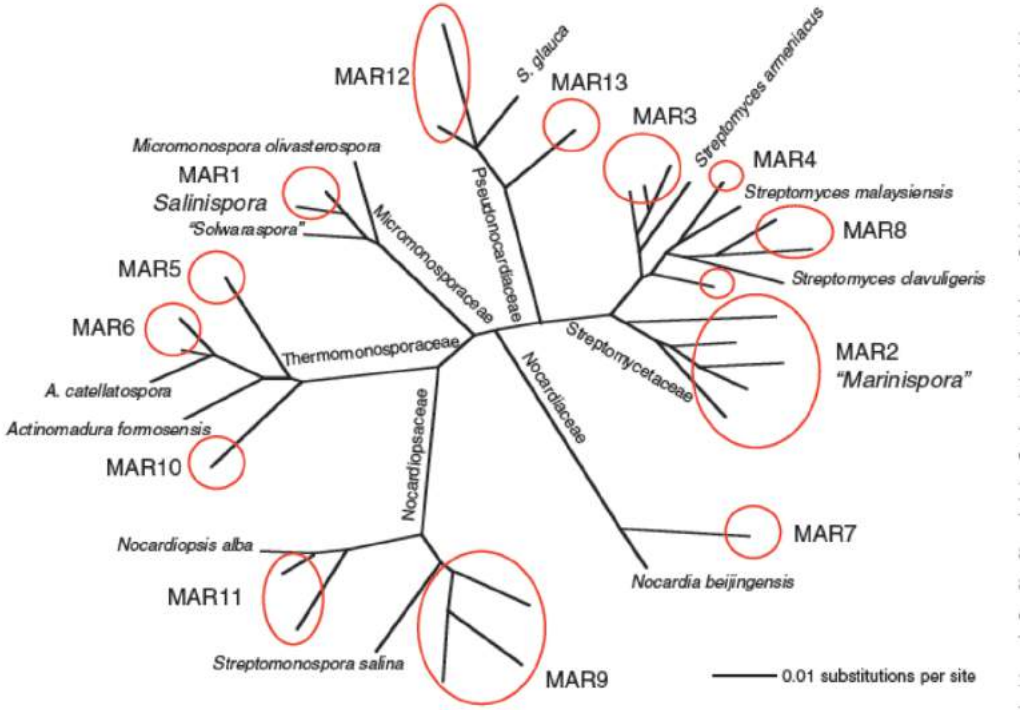
Tudo começou com a descoberta da penicilina, um importante antibiótico, por Alexander Fleming em 1929. Nos últimos 60 anos, entre 30.000 e 50.000 produtos naturais foram descobertos a partir de microrganismos. Mais de 10.000 destes compostos são biologicamente ativos e mais de 8.000 são compostos antitumorais e antibióticos (Fenical, 1993; Fenical & Jensen, 1994, Fenical, 2006).

MICRORGANISMOS MARINHOS

BIOIVERSIDADE:

abundâncias estimadas em 10^6 microorganismos/mL de água do mar e $10^9/cm^3$ de sedimento (Fenical & Jensen, 2006).

- compreendem diferentes habitats, incluindo a interface água-ar, a coluna d'água que pode chegar a 10.000 metros, e os complexos sedimentos do assoalho marinho (Ward & Bora, 2006).



MICRORGANISMOS MARINHOS

DIVERSIDADE QUÍMICA

SUSTENTABILIDADE

Fermentação líquida

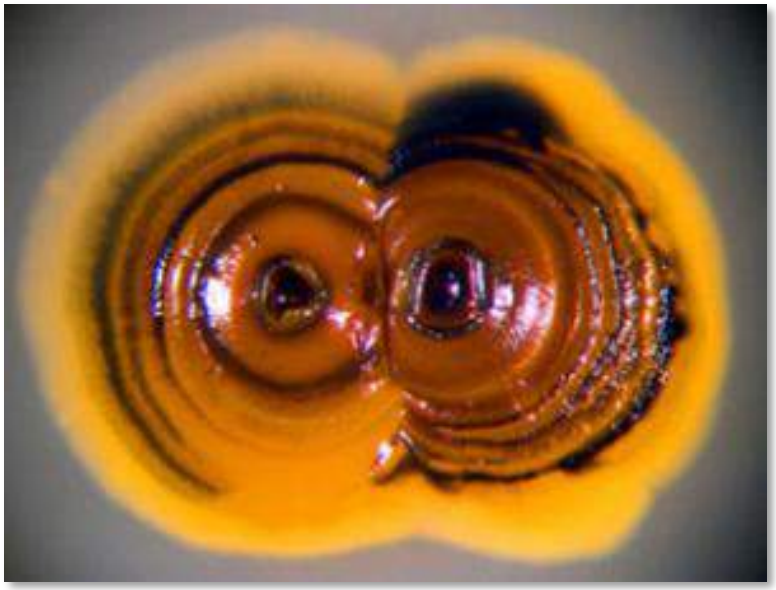
PROSPECÇÃO GENÔMICA

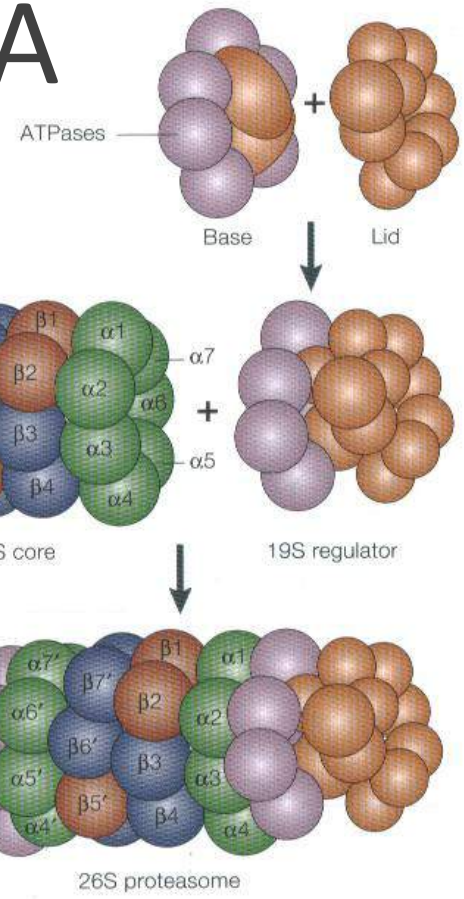
20% do genoma – produção de metabólitos secundários

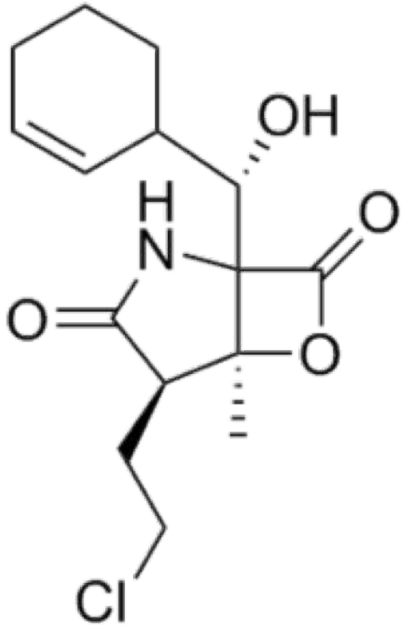
SALINOSPORAMIDA A

Mecanismo de ação:
Inibição da função catalítica do proteossomo

Origem:
Actinomiceto *Salinispora tropica*



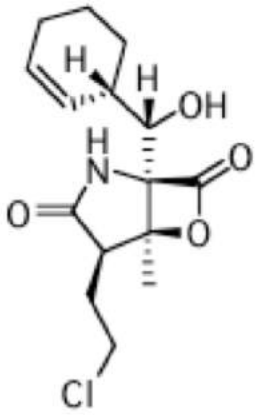




Salinosporamida A

Usos:
Tratamento em potencial de NSCLC, melanoma e linfomas em combinação com vorinostat e de tumores sólidos avançados e mieloma múltiplo (Fase I).

SALINOSPORAMIDA A



DESENVOLVIMENTO PRÉ-CLÍNICO

Modelos pré-clinicos (in vitro/in vivo
Fermentação salina
Formulação
Toxicologia

DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO INIBIDOR DE PROTEOSSOMO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER

Out 2002:
Descoberta do actinomiceto marinho obrigatório *Salinispora*

Fevereiro 2003:
Elucidação estrutural e descrição do Mecanismo de ação

Março 2003:
FDA aprova Velcade® para tratamento de mieloma múltiplo

Abril 2004 & Maio 2005:
Síntese Total

Dec 2005:
Autorização para testes em humanos

Dez 2005:
Eficácia comprovada em modelo xenográfico de mieloma múltiplo

2006:
Fase 1 em tumores sólidos e linfomas

Maio 2006:
Estrutura cristalográfico do complexo fármaco-proteossomo

2007:
Fase 1 em Mieloma múltiplo

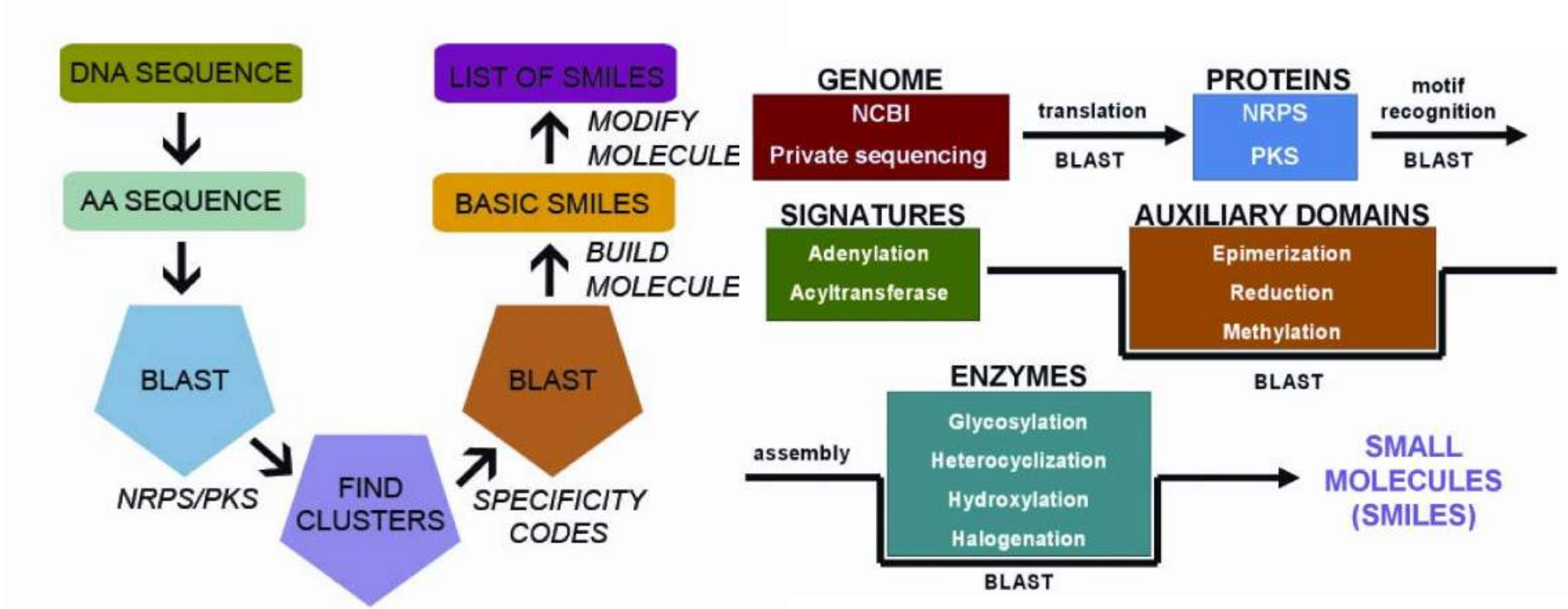
Nov 2008:
Eficácia comprovada em modelo xenográfico de câncer de cólon

Maio 2007:
Síntese Total

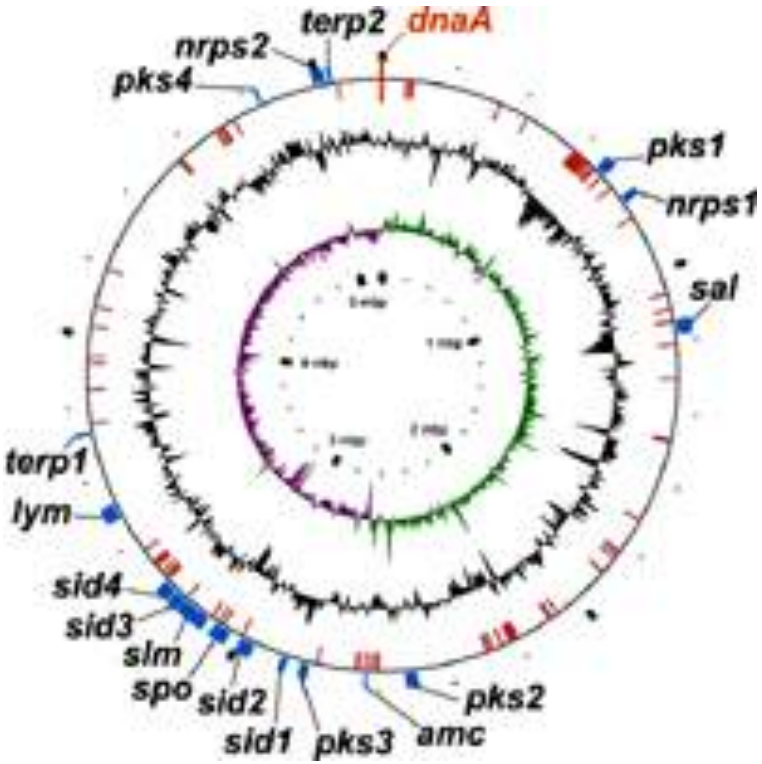
Junho 2007:
Sequenciamento do genoma da *Salinispora*

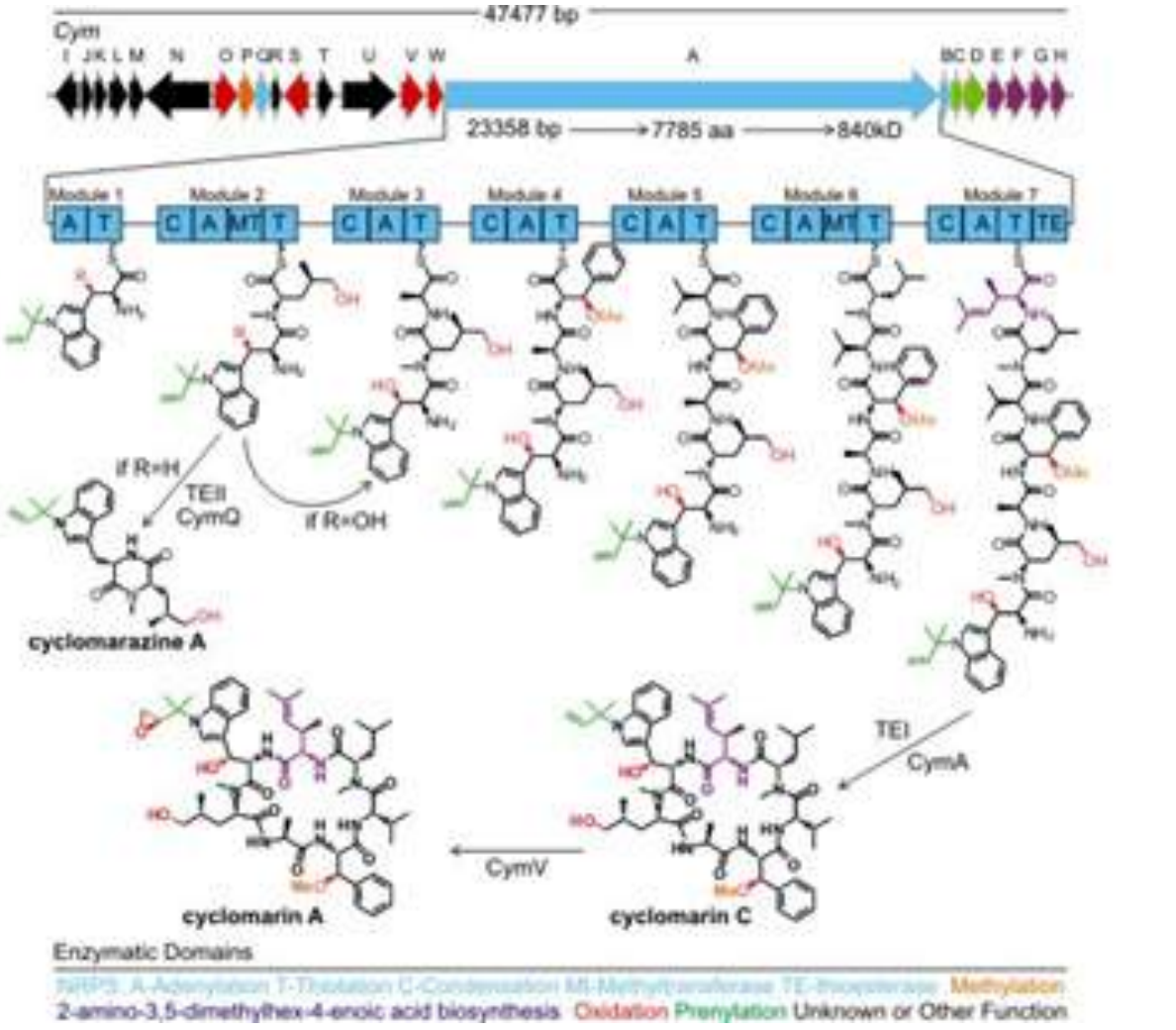
PROSPECÇÃO GENÔMICA

Previsão dos metabólitos produzidos pelo microrganismo a partir de suas seqüências genômicas, independente de seu cultivo

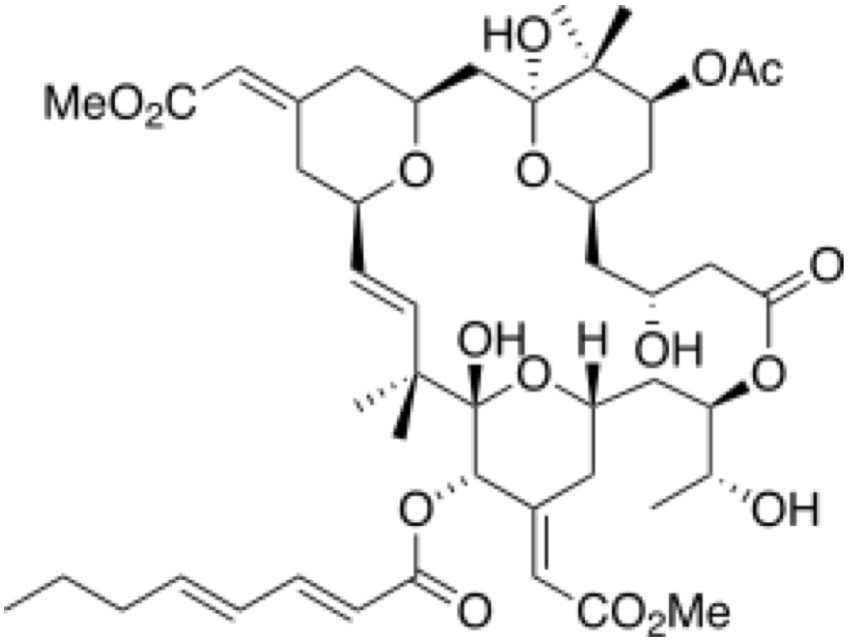


PROSPECÇÃO GENÔMICA



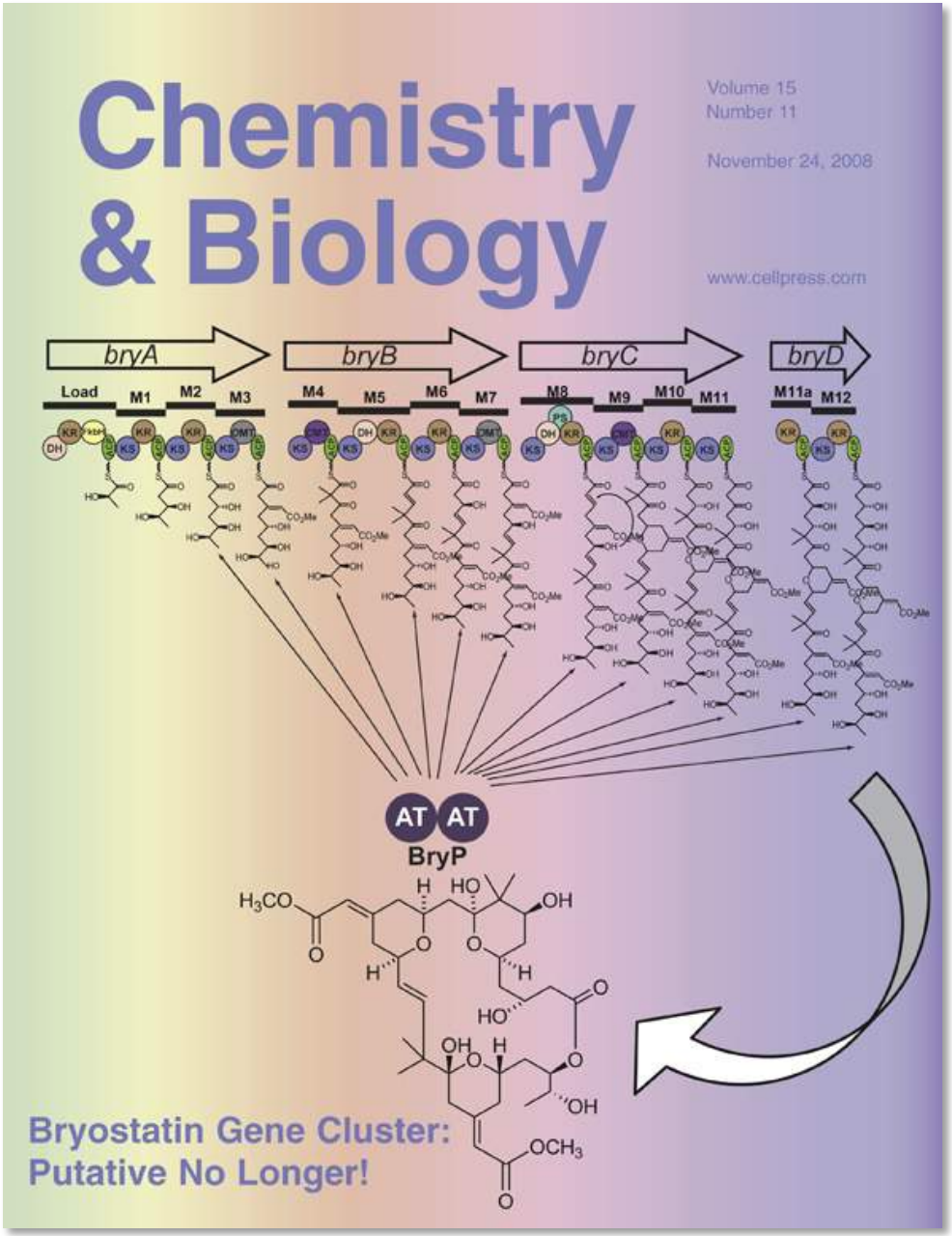


PROSPECÇÃO GENÔMICA



Briostatina 1

Pettit *et al*., 1982



4 November, 2008

Volume 15, Issue 11, pp. 1139-1240

OS PNM SÃO UM BOM NEGÓCIO?

Pharma Mar

Grupo Zeltia

Espanha, 1986

Aquapharm BIODISCOVERY

Reino Unido, 2000

nereus

Estados Unidos, 1998

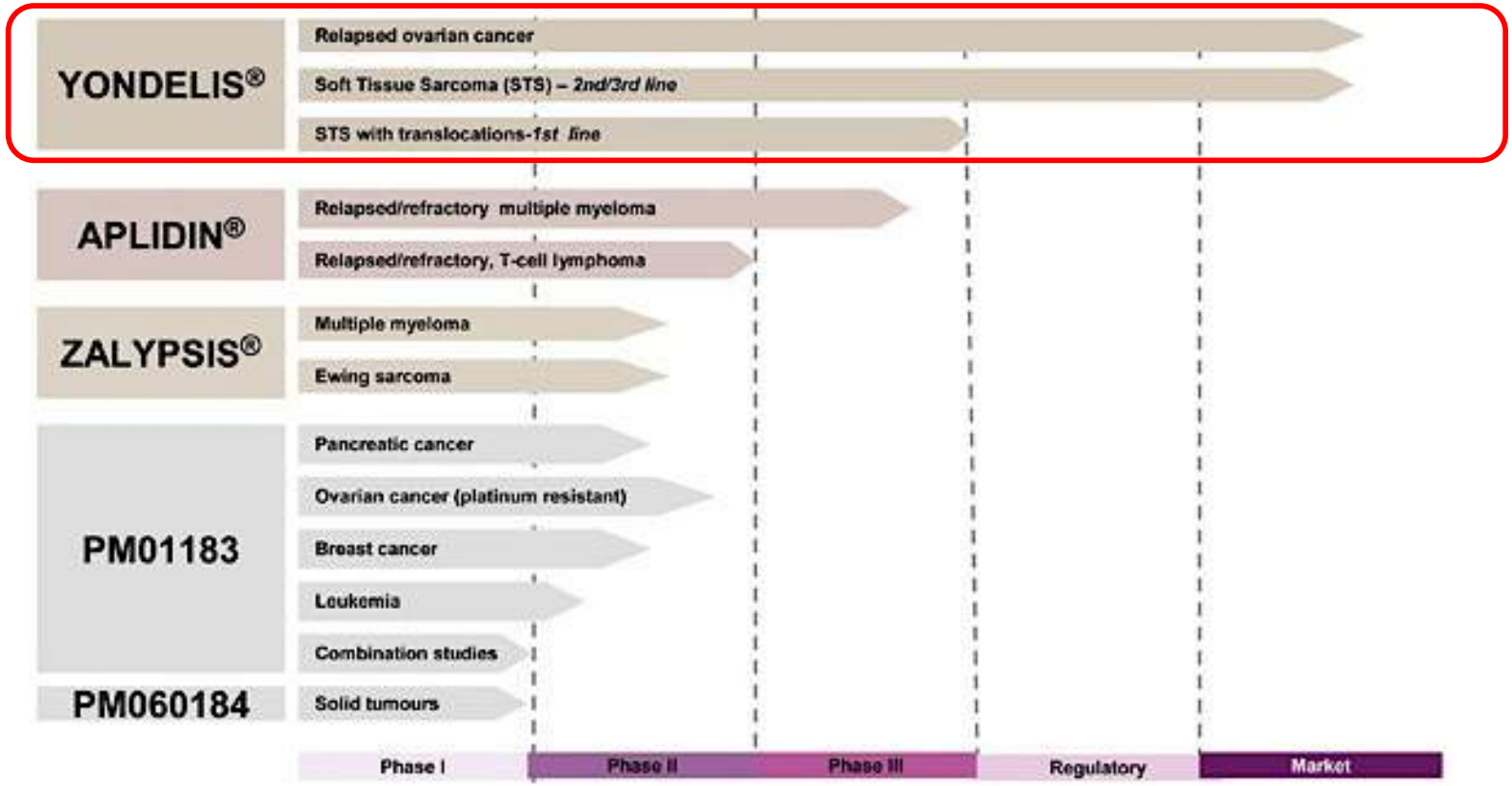
GlycoMar

Reino Unido, 2005

Pharma Mar

Grupo Zeltia

- Fundada: 1986
- Investimento: € 420 milhões
- Coleção: 65 mil organismos marinhos
- Substâncias novas isoladas: 700
- Substâncias em fase clínica: 5



Major Products

	Sales Regions
Aricept (Anti-Alzheimer's agent)	Japan, US, EU, Asia
Pariet/AcipHex (Proton pump inhibitor)	Japan, US, EU, Asia
Oncology-related Products	
Halaven (Anticancer agent)	Japan, US, EU, Asia
Aloxi (Antiemetic agent)	US
Dacogen (DNA hypomethylating agent)	US
Fragmin (Injectable anti-clotting agent)	US
Epilepsy Products	
Zonegran (Anti-epileptic agent)	US, EU, Asia
Inovelon/Banzel (Anti-epileptic agent)	US, EU, Asia
Zebinix (Anti-epileptic agent)	EU
Humira (Fully-human anti-TNF-alpha monoclonal antibody)	Japan, South Korea, Taiwan

GlycoMar's primary focus is in the discovery and development of sugar-related compounds derived from a wide range of marine invertebrates and microalgae, providing an array of novel biochemistry.

http://www.glycomar.com

Sede: Oban - Escócia

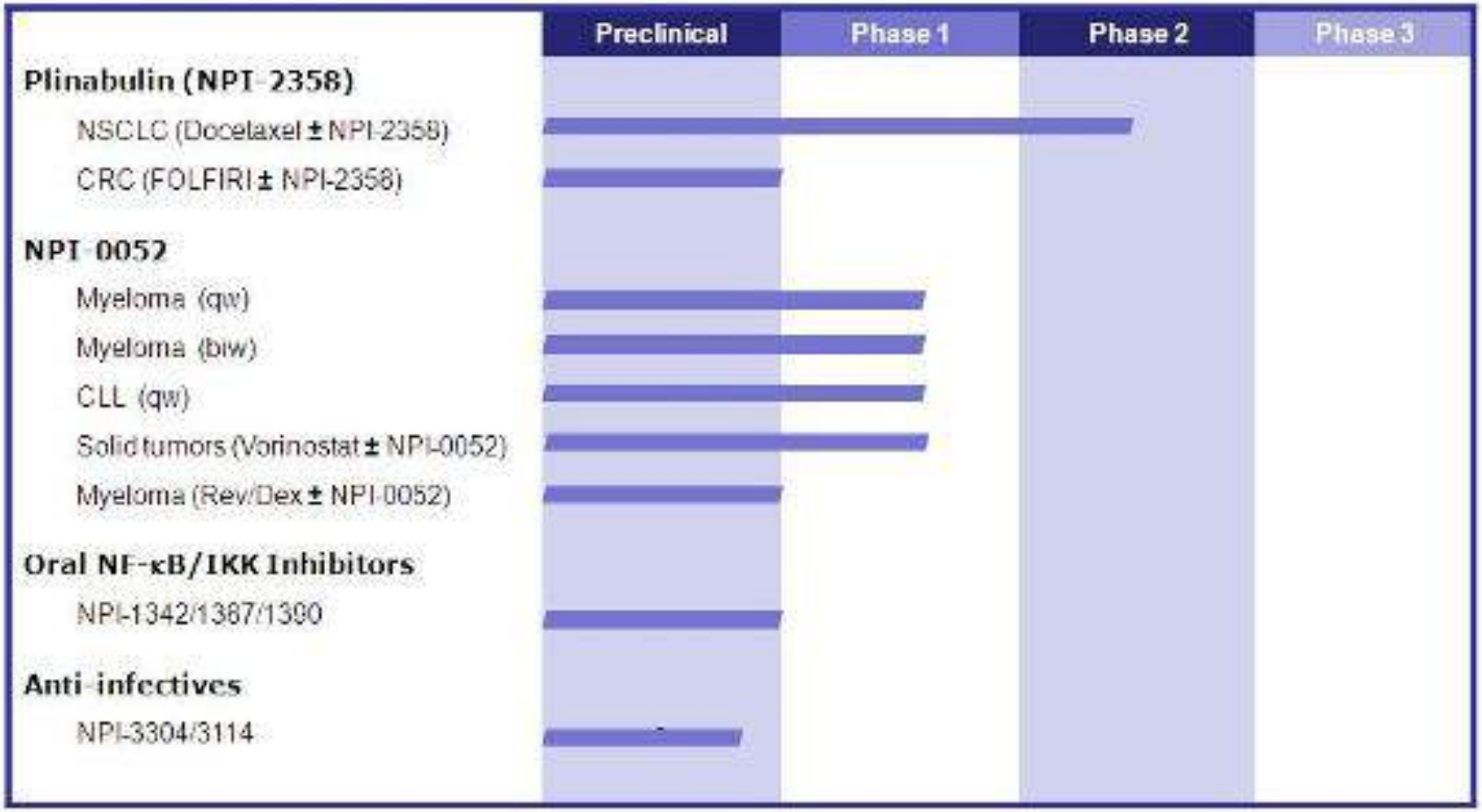
PHARMACEUTICALS	Discovery	Lead Selection	Optimisation	Preclinical	Clinical testing	Industry partner
Anti-inflammatory GLY145						Verona Pharma
GLY079						
Anti-cancer Oligosaccharides						Undisclosed
Anti-infective Oligosaccharides						Undisclosed

NUTRACEUTICALS	Discovery	Lead Selection	Optimisation	Safety testing	Industry partner
GLY036					**Available**

COSMECEUTICALS	Discovery	Lead Selection	Optimisation	Safety testing	Industry partner
Polysaccharides					**Available**

Nereus Pharmaceuticals is a pioneer in the discovery and development of new therapeutics for cancer, inflammatory and infectious diseases that were derived from marine microbial sources.

http://www.nereuspharm.com



Biodiversidade Marinha no Desenvolvimento de Fármacos

- Estima-se que novos tratamentos para o câncer a partir de organismos marinhos tenham o valor estimado entre U$563 bilhões e U$ 5,69 triilhões
- Existem mais de 550K novas substâncias esperando para ser descobertas
- Podem levar a descoberta de 55 a 214 novos medicamentos para o tratamento do câncer

"Science for Environment Policy": European Commission DG Environment News Alert Service, edited by SCU, The University of the West of England, Bristol

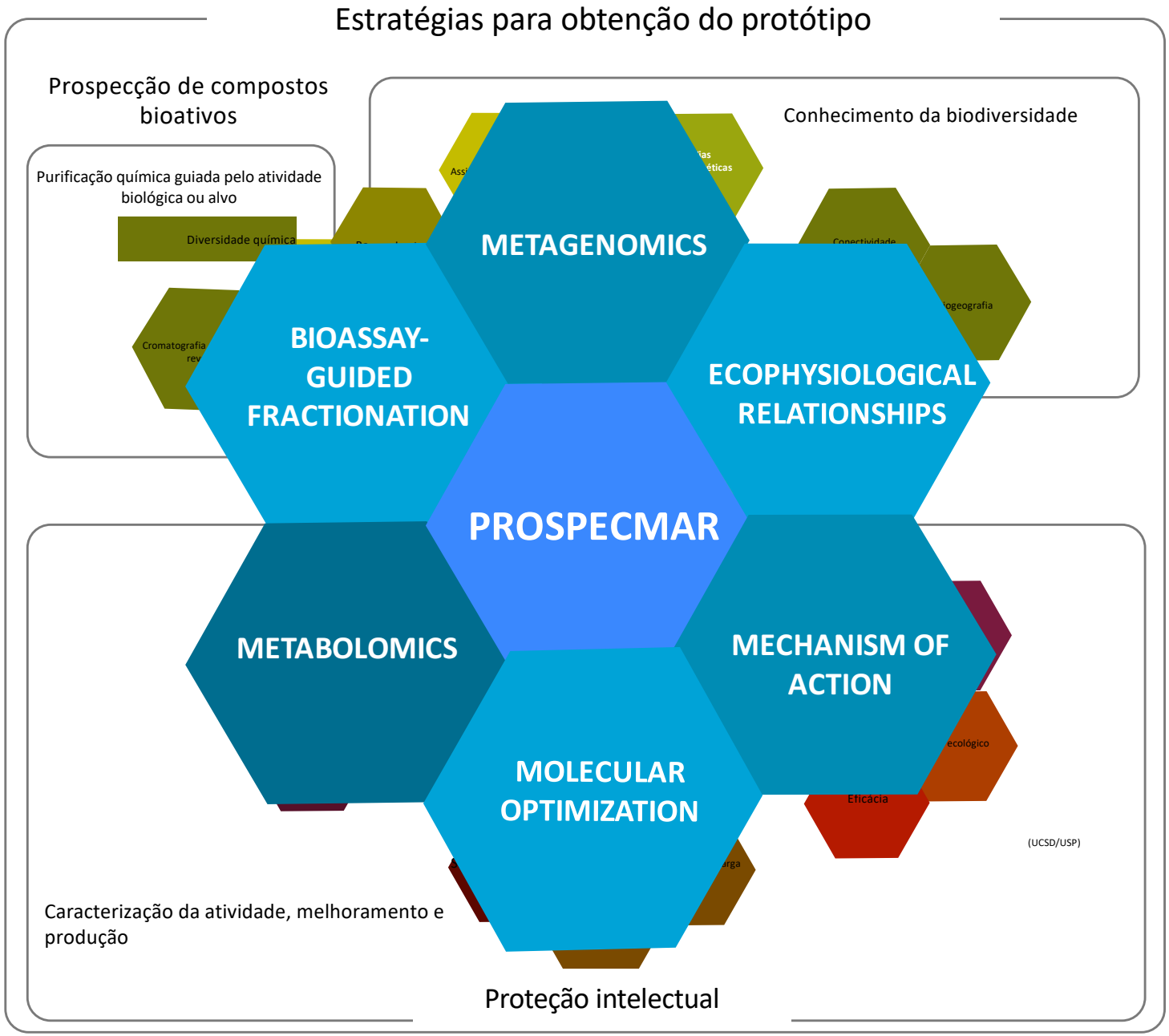
E no Brasil?

- Amazônia Azul
- Extensão da costa 8.500 km
- Mar Territorial Brasileiro + ZEE: 3,5 milhões de km^2
- Maior costa tipicamente tropical do mundo
    - Plataforma continental
    - Ilhas Oceânicas
- Diversidade inestimada

Sumário

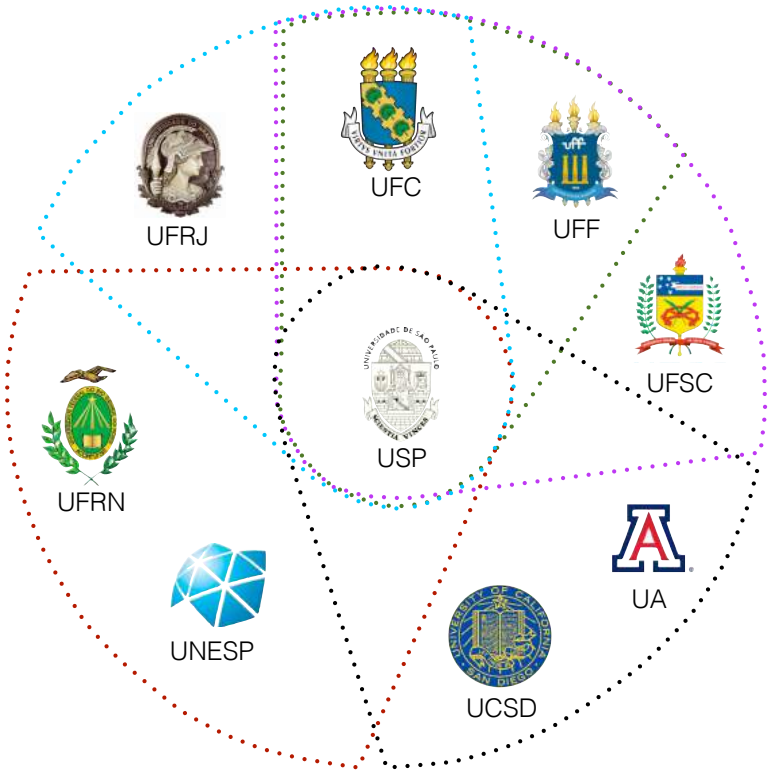
- Produtos naturais no tratamento do Câncer
- Rede ProspecMar – abordagens integrativas na prospecção de substâncias anticâncer
- Estudos Alvo-Direcionados
  - Fator de transcrição TBX2
  - Proteínas inibidoras de apoptose

UMA PROPOSTA DE MODELO DE REDE RACIONAL E SUSTENTÁVEL



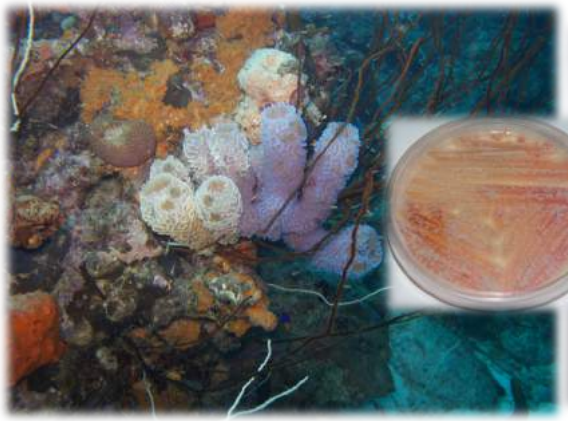
Objetivo da Rede:

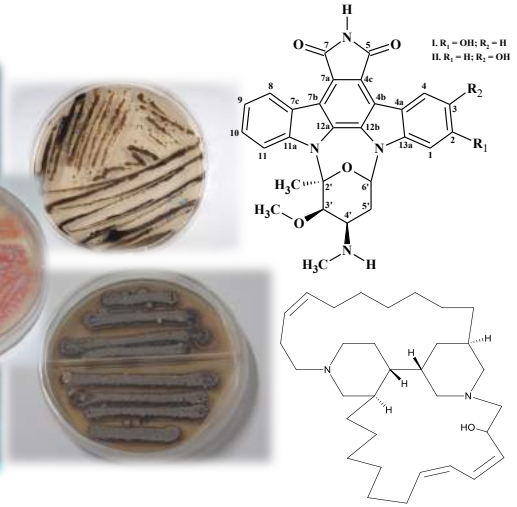
- Realização de prospecção de recursos biológicos nas ilhas brasileiras visando o conhecimento da sua diversidade e seu uso sustentável na identificação de serviços ecossistêmicos e do desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos.

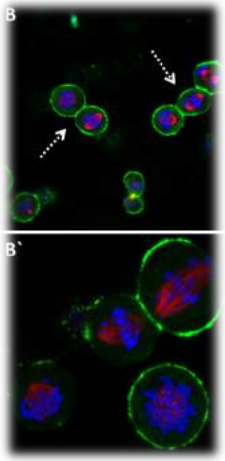


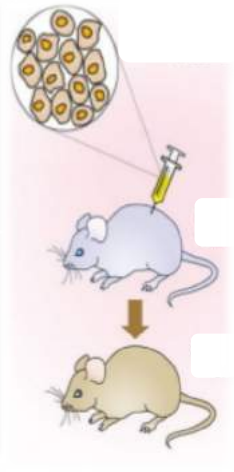
Ideia Central:

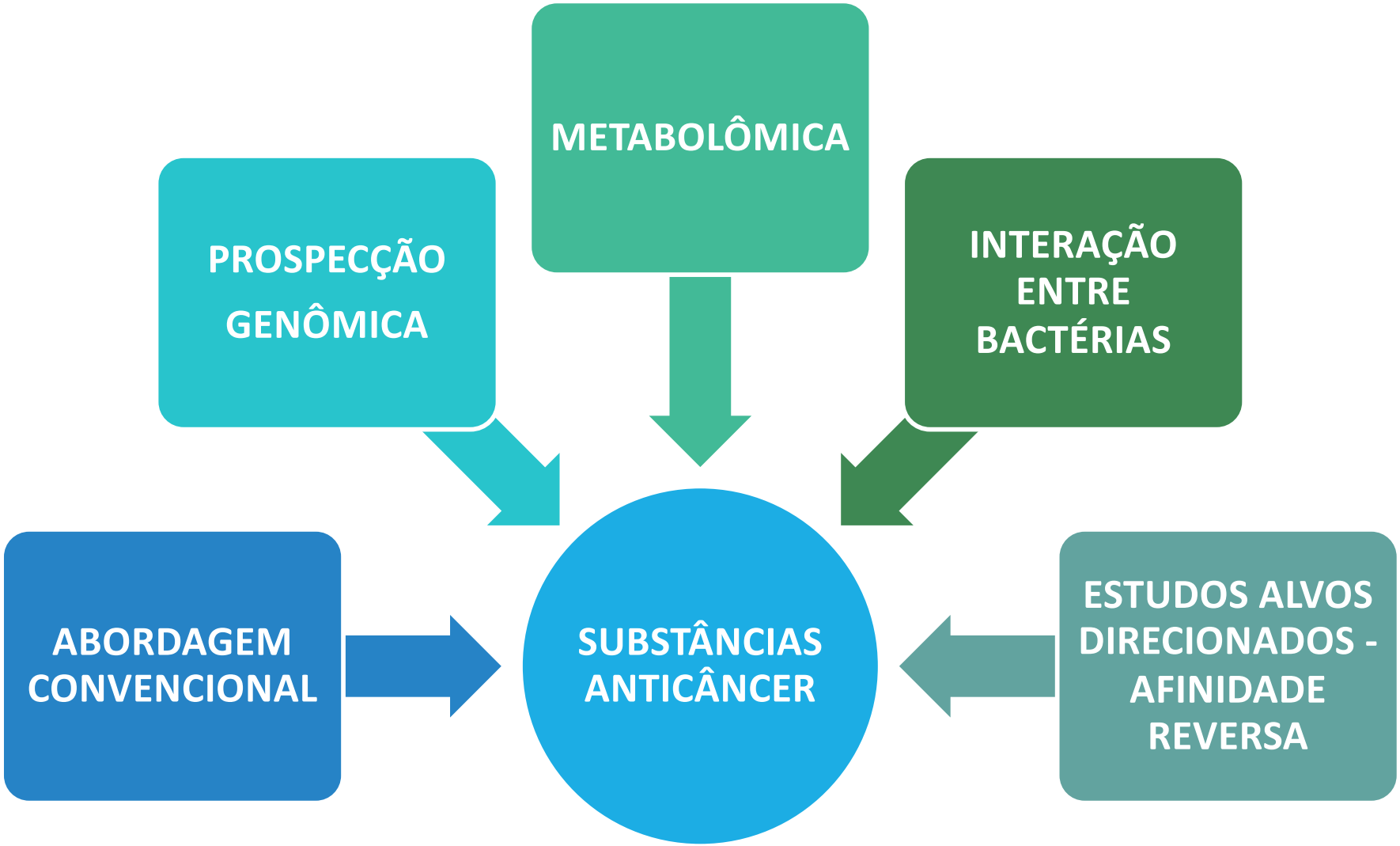
Microrganismos Marinhos → Substâncias Químicas → Modelos de Câncer → Novos Protótipos



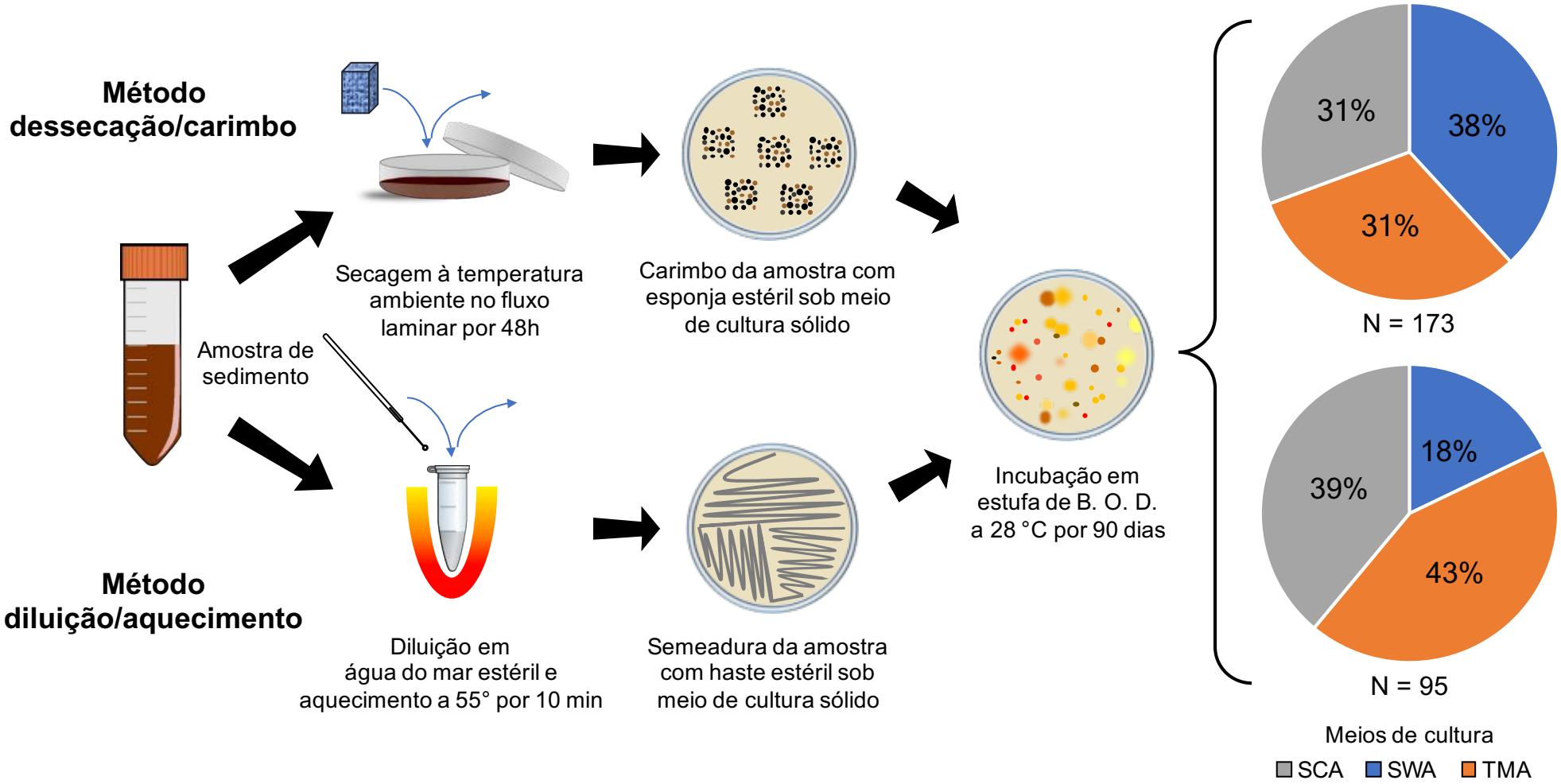




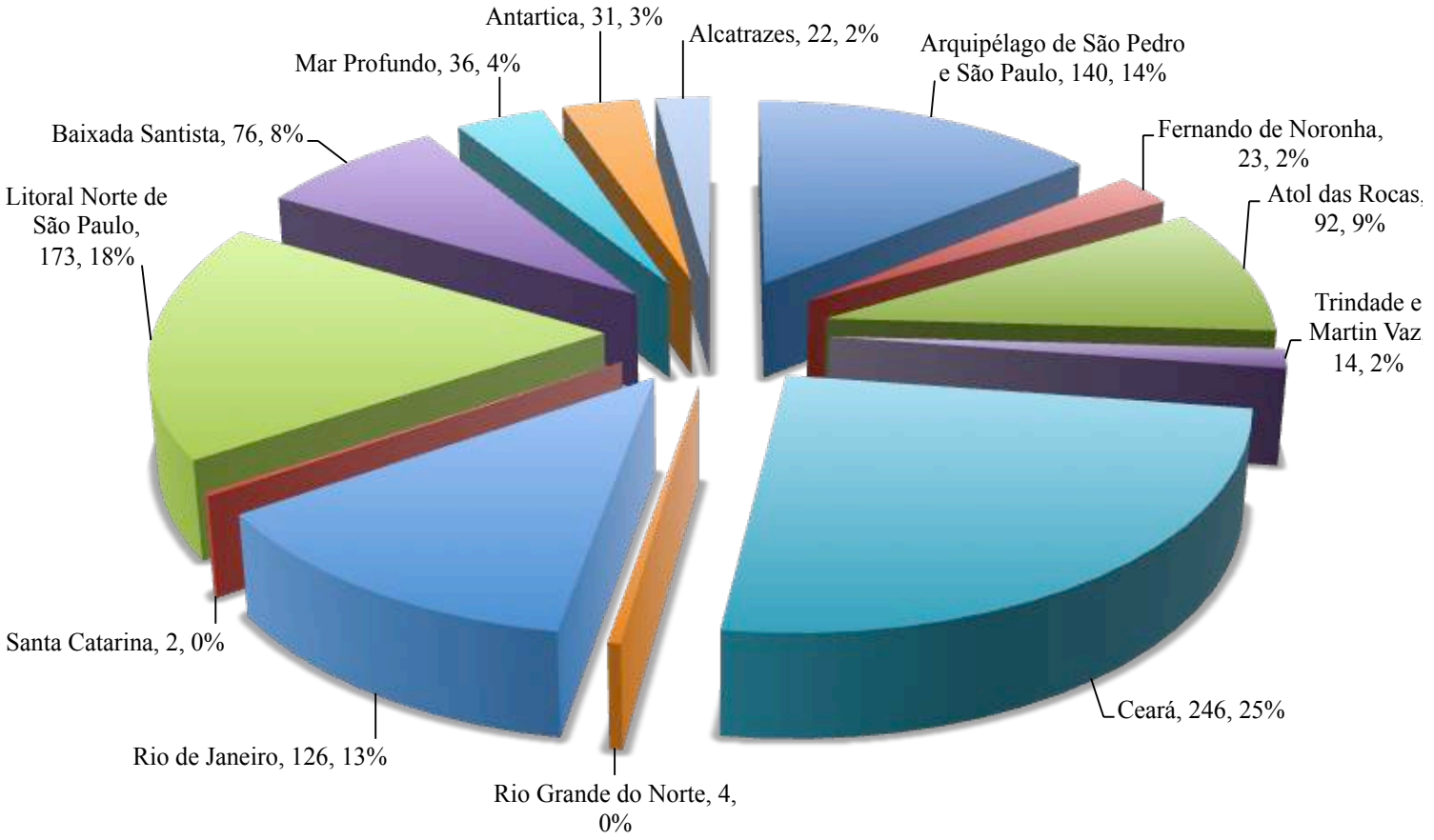



METABOLÔMICA
PROSPECÇÃO GENÔMICA
INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS
ABORDAGEM CONVENCIONAL
SUBSTÂNCIAS ANTICÂNCER
ESTUDOS ALVOS DIRECIONADOS - AFINIDADE REVERSA

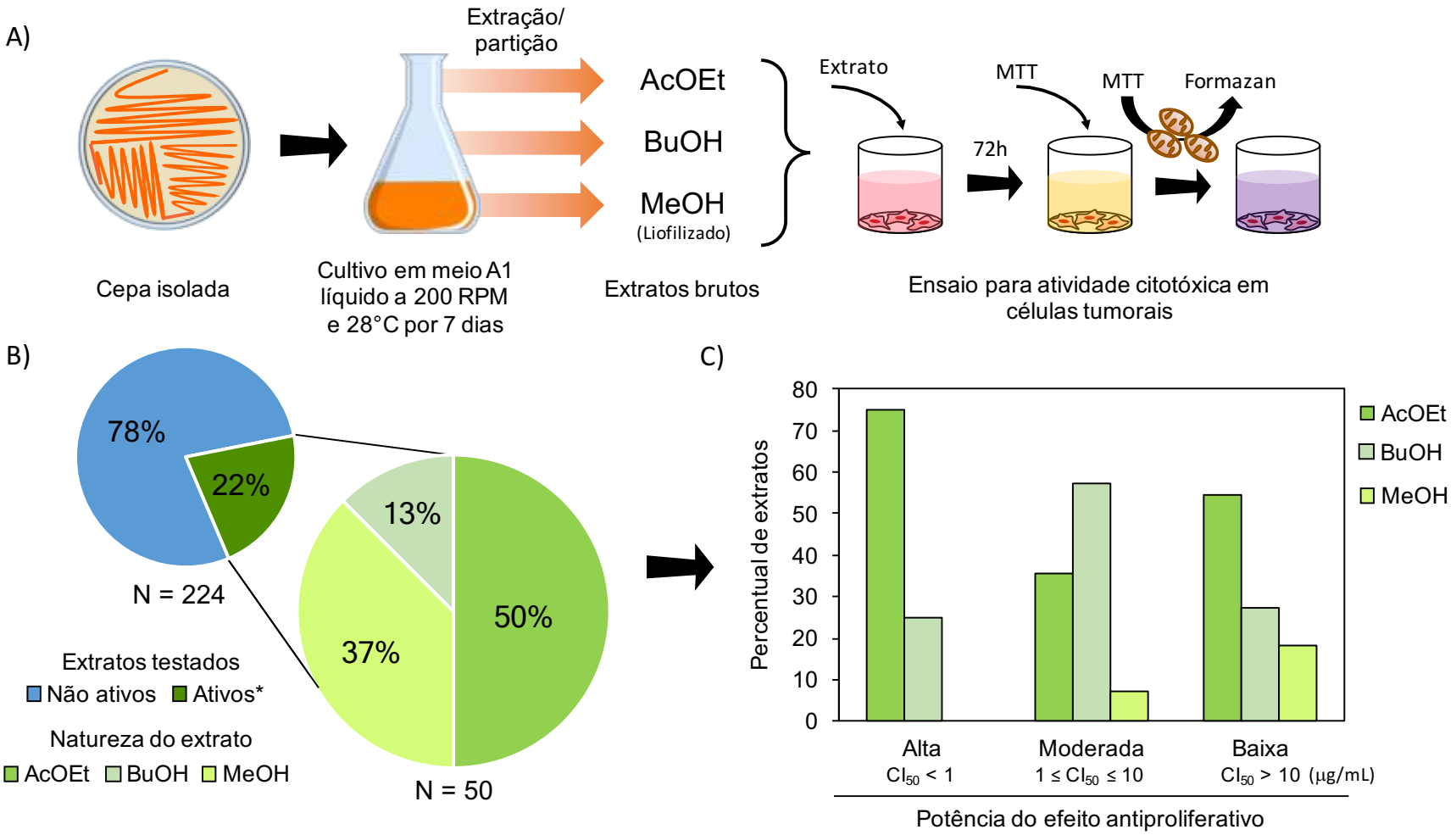
Isolamento de Microrganismos



Banco de Microrganismos

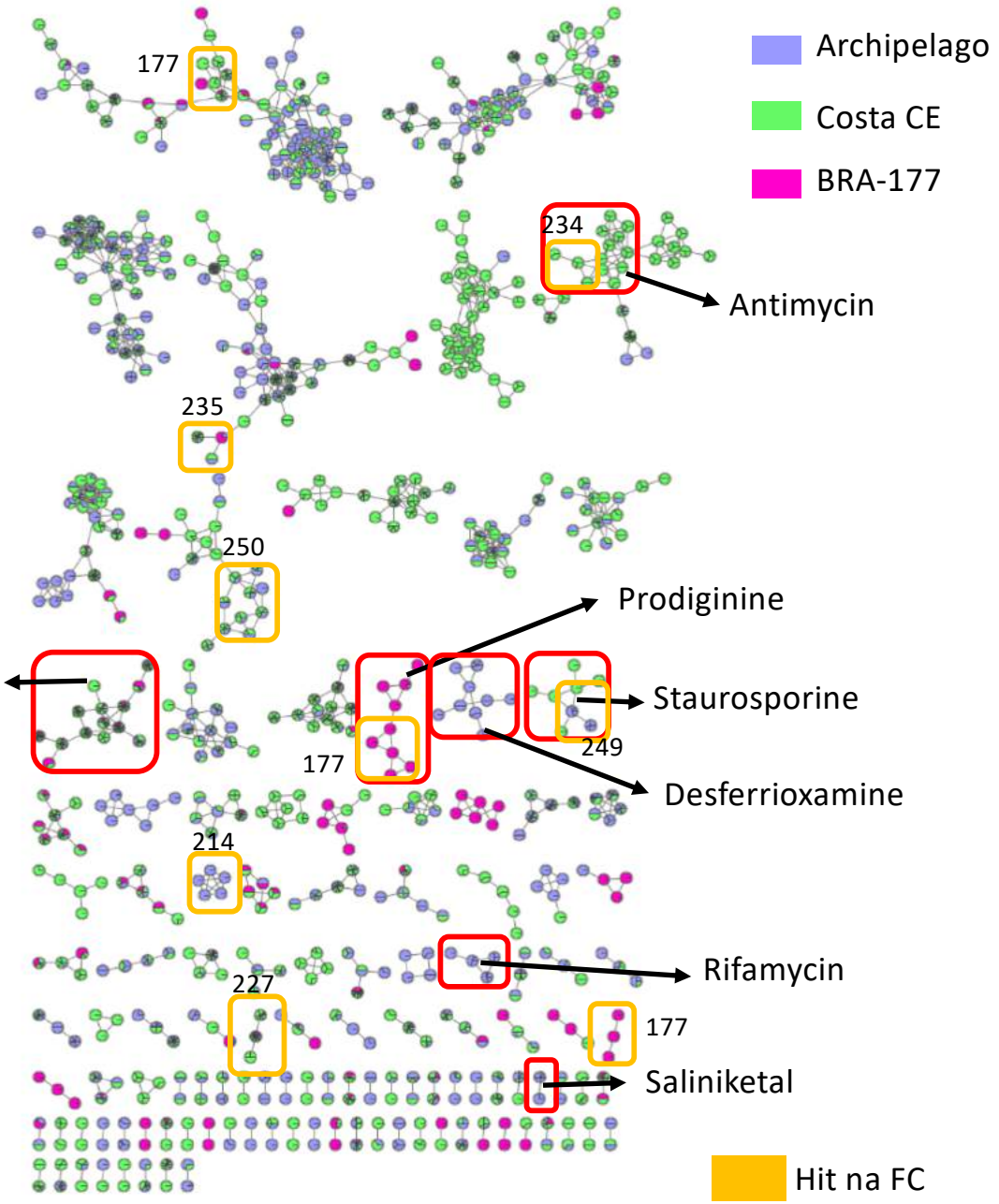


Triagem da Atividade Biológica



Perfil químico:

- Análise por LC-MS
- Redes moleculares - GNPRS



Sumário

- Produtos naturais no tratamento do Câncer
- Rede ProspecMar – abordagens integrativas na prospecção de substâncias anticâncer
- Estudos Alvo-Direcionados
  - Fator de transcrição TBX2
  - Proteínas inibidoras de apoptose

Fator de transcrição Tbx2

- Parte da família de fatores de transcrição T-box com papel bem estabelecido no desenvolvimento embrionário
- Encontra-se superexpresso em vários tipos de câncer, especialmente melanoma, sarcoma e carcinoma de mama, correlacionando com um prognóstico ruim

Table 1
TBX2 and TBX3 expression in human cancers.

Name	Cancer	Ratio (%) elevated in tumor specimens	References
TBX2	Breast	50%–80%	[28,31–33,39,40]
	Pancreas	50%–60%	[36,37]
	Melanoma	63% (12/19 melanoma cell lines)	[3,42]
TBX3	Breast	70%–90%	[30,34,35]
	Ovarian	69%	[35]
	Pancreas	ND	[36,38]
	Melanoma	57% (8/14 melanoma cell lines)	[43]
	Liver	79%–87%	[44]
	Cervical	ND	[45]
	Lung	ND	[47]

ND, not determined.

Sharon Prince
University of Cape Town
África do Sul

Wansleben et al., Biochimica et Biophysica Acta 1846 (2014) 380–391
Lu et al., Biochimica et Biophysica Acta 1806 (2010) 268–274

A superexpressão de TBX2 contribui com a carcinogênese levando a imortalidade das células

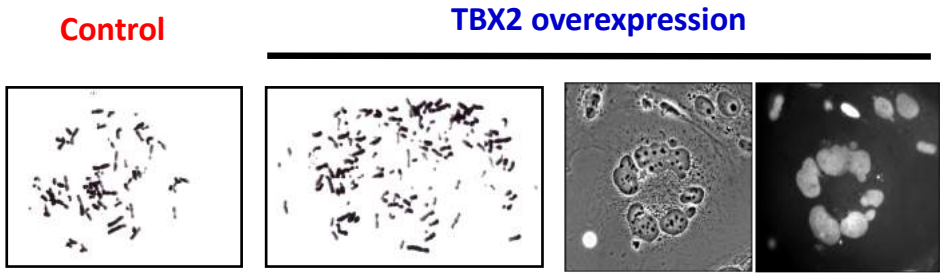
Superexpressão de TBX2 em células normais

↓

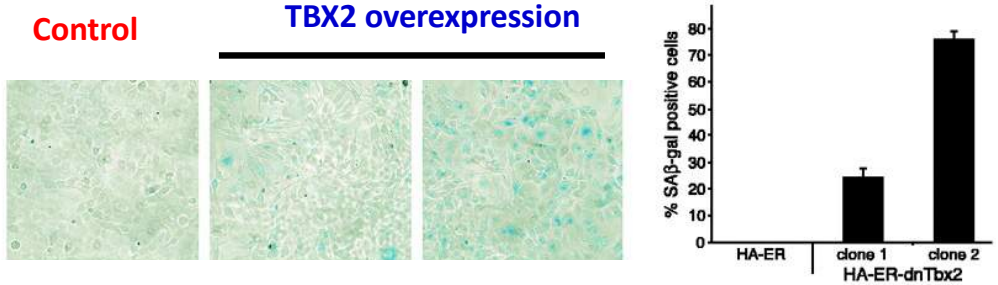
Inibe pontos de checagem do ciclo celular

↙ *Checkpoint* de tetraploidia
Induz aneuploidy/CIN

↘ *Checkpoint* de senescência
(inibe cdki p21 e p14)
Immortalização celular



Davis et al. *Oncogene* (2008)



Prince et al. *Cancer Research* (2004)

Tbx2 é um fator pro-proliferação em câncer de mama e melanoma

Silenciamento do TBX2 diminui proliferação e aumenta senescência (câncer de mama & melanoma)

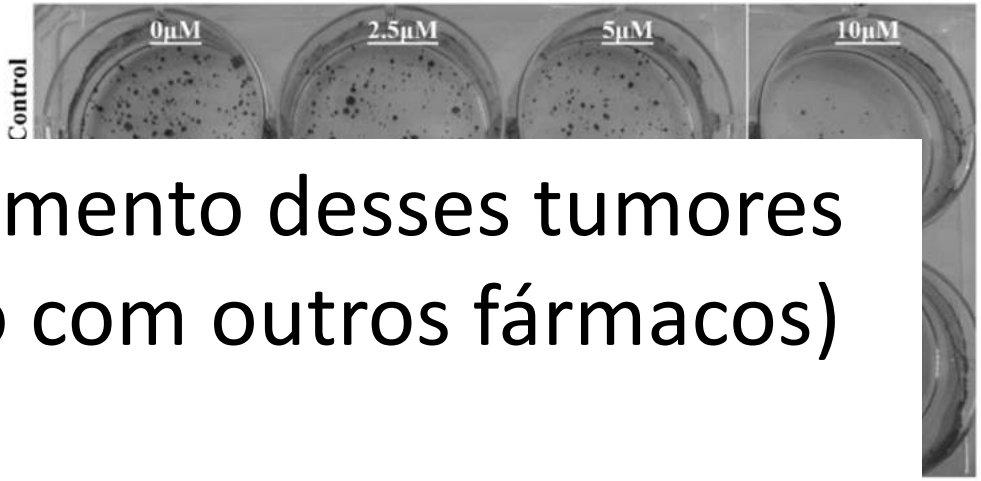
Knocking down de TBX2 induz senescência & resulta na inibição da proliferação

Knocking down de TBX2 sensibiliza células-resistentes ao tratamento com cisplatina

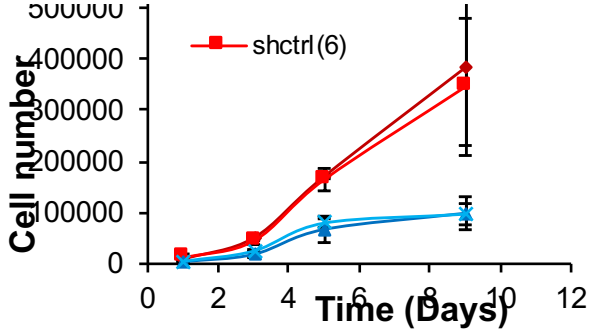
Ensaio da β-galactosidase – senescência

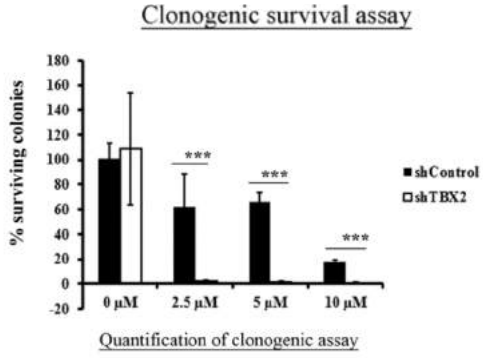
Cisplatina

Células de mamaMCF-7



Potencial alvo para tratamento desses tumores (inclusive em associação com outros fármacos)





Peres et al. *Genes and Cancer* (2010)

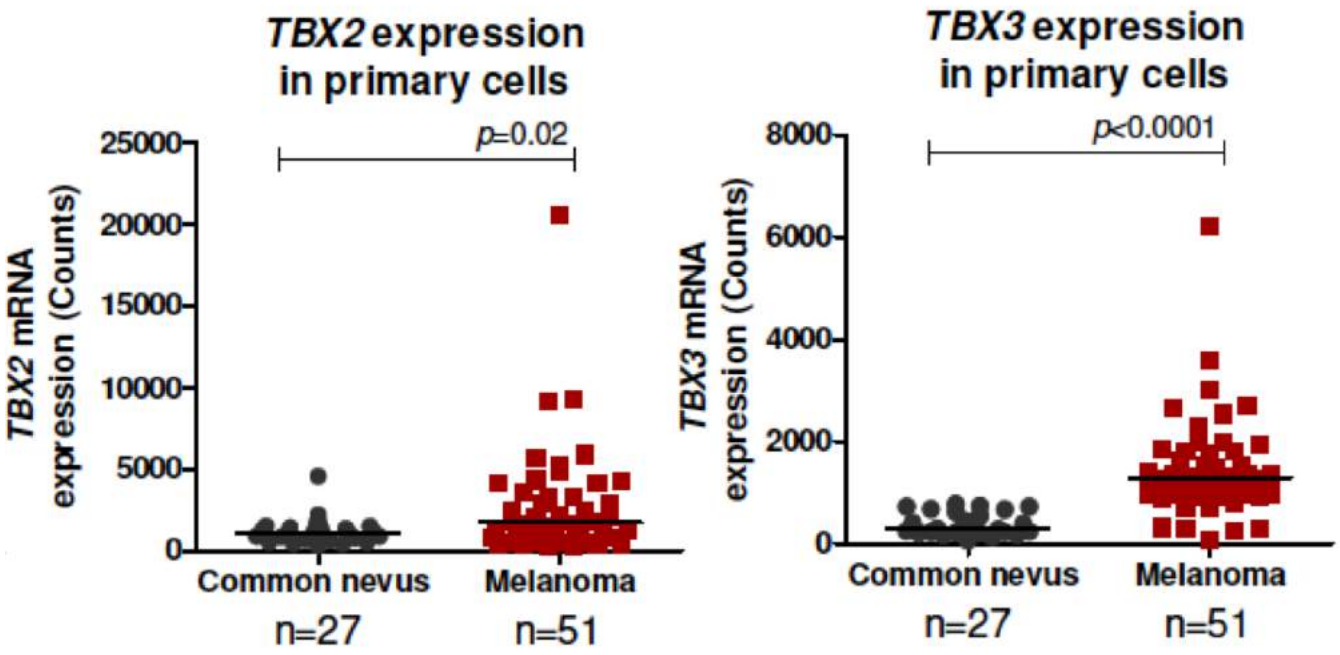
Wansleben et al. *Cell Death and Disease* (2013)

JCI insight

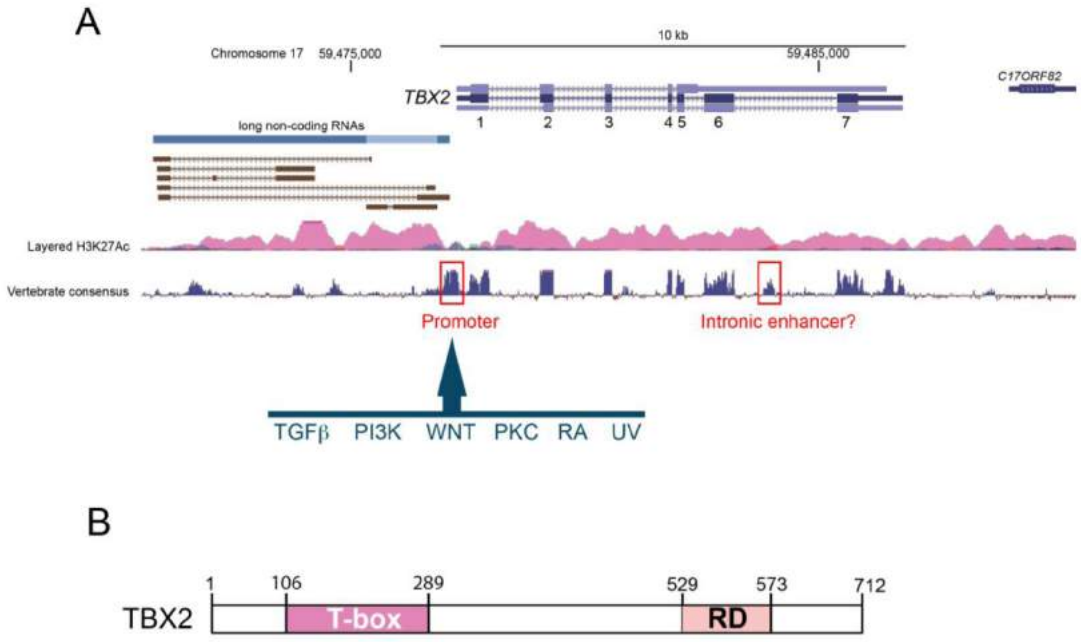
CLINICAL MEDICINE

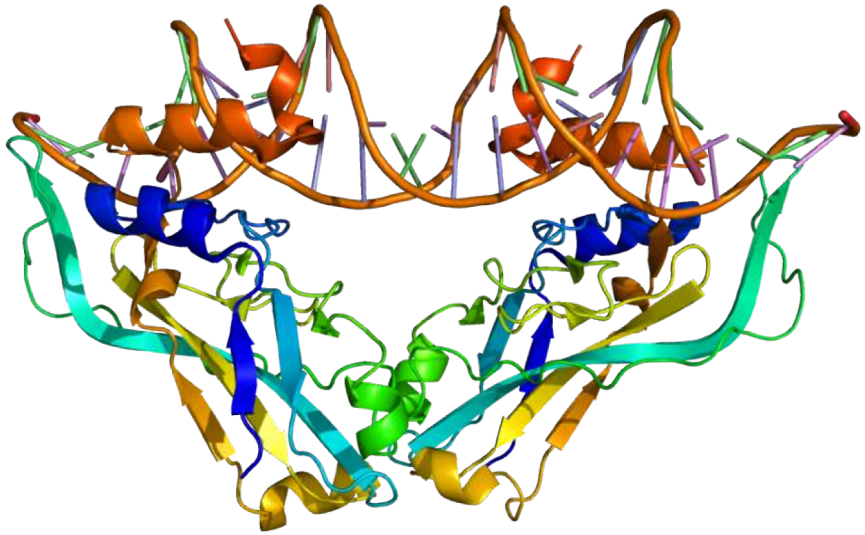
Transcriptional dissection of melanoma identifies a high-risk subtype underlying *TP53* family genes and epigenome deregulation

Brateil Badal,[1,2,3] Alexander Solovyov,[1,3,4] Serena Di Cecilia,[1,2,3] Joseph Minhow Chan,[1,2,3] Li-Wei Chang,[1,2,3] Ramiz Iqbal,[1,2,3] Iraz T. Aydin,[1,2,3] Geena S. Rajan,[1,2,3] Chen Chen,[1] Franco Abbate,[1,2,3] Kshitij S. Arora,[5] Antoine Tanne,[4] Stephen B. Gruber,[6] Timothy M. Johnson,[7] Douglas R. Fullen,[8] Leon Raskin,[3] Robert Phelps,[1,2] Nina Bhardwaj,[4,10] Emily Bernstein,[2,3,10] David T. Ting,[5] Georg Brunner,[11] Eric E. Schadt,[12] Benjamin D. Greenbaum,[1,3,4,10] and Julide Tok Celebi[1,2,3,10]



TBX2: gene e proteína





- Os estudos com Tbx2/3 como alvo é desafiador – não possuem atividade enzimática e são relativamente instáveis
- *Screen* contra o domínio de ligação do DNA?? **Problemas com a seletividade** – domínio altamente conservado na família

Cromatografia de bioafinidade
Screening da biblioteca de extratos marinhos

- Domínio de ligação ao DNA de TBX2 foi clonado com vetor de expressão pET28b – com cauda de histidina
- Obtenção de grandes quantidades de proteínas.

DOI: 10.1002/cbic.201402258

Functional Chromatography Reveals Three Natural Products that Target the Same Protein with Distinct Mechanisms of Action

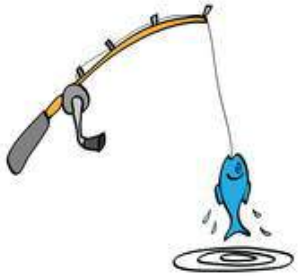
Min Jin Kang,[a] Tongde Wu,[a] E. M. Kithsiri Wijeratne,[b] Eric C. Lau,[a] Damian J. Mason,[a] Celestina Mesa,[a] Joseph Tillotson,[a] Donna D. Zhang,[a] A. A. Leslie Gunatilaka,[b] James J. La Clair,[c] and Eli Chapman*[a]

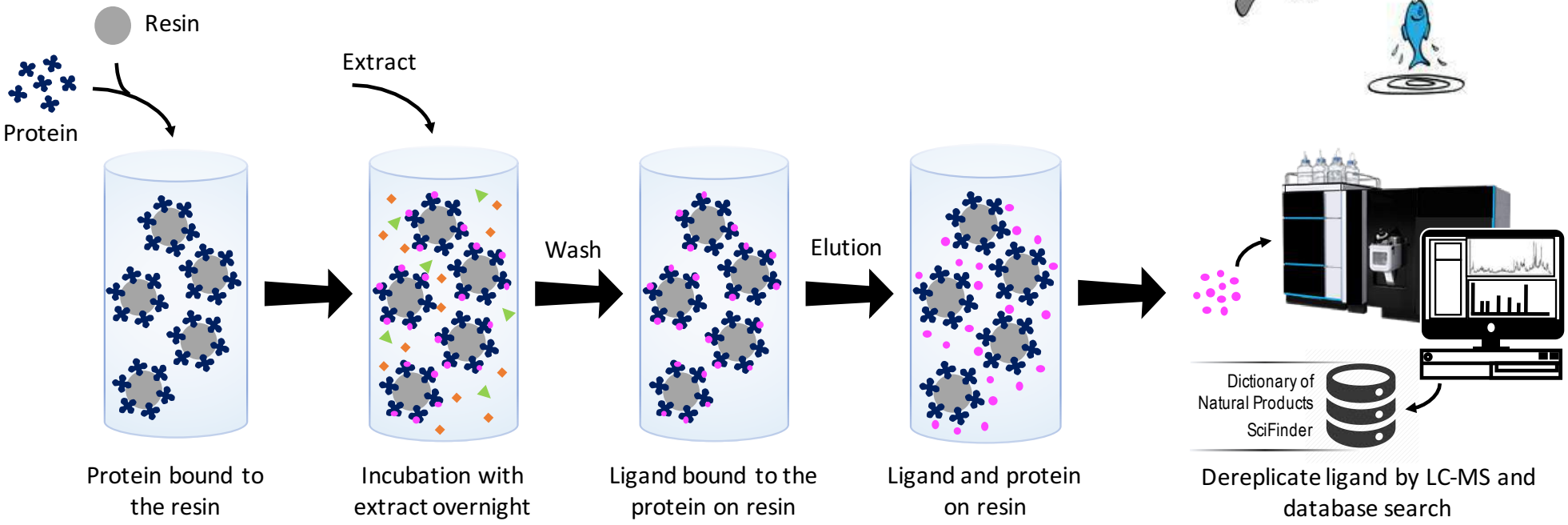
Access to lead compounds with defined molecular targets continues to be a barrier to the translation of natural product resources. As a solution, we developed a system that uses discrete, recombinant proteins as the vehicles for natural product isolation. Here, we describe the use of this functional chroma-

fied rheoemodin, 1-hydroxydehydroherbarin, and phomapyrrolidone A as distinct p97 modulators. Excitingly, each of these molecules displayed a unique mechanism of p97 modulation. This discovery provides strong support for the application of functional chromatography to the discovery of protein modu-

FUNCTIONAL (BIOAFFINITY) CHROMATOGRAPHY

AN OVERVIEW - FISHING MOLECULES!



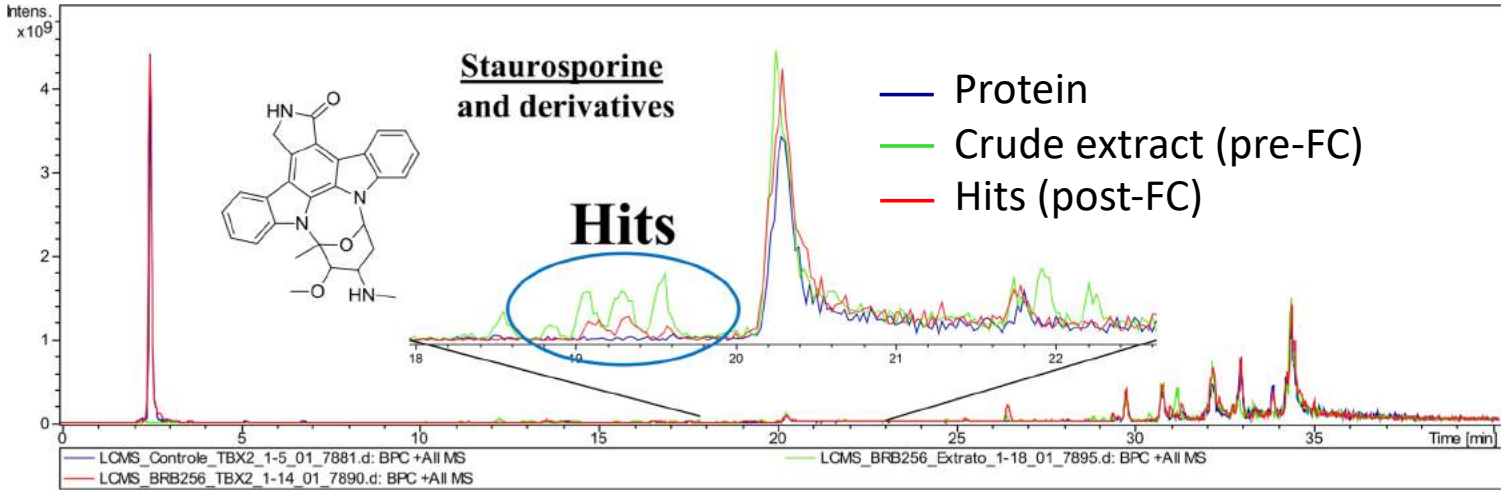


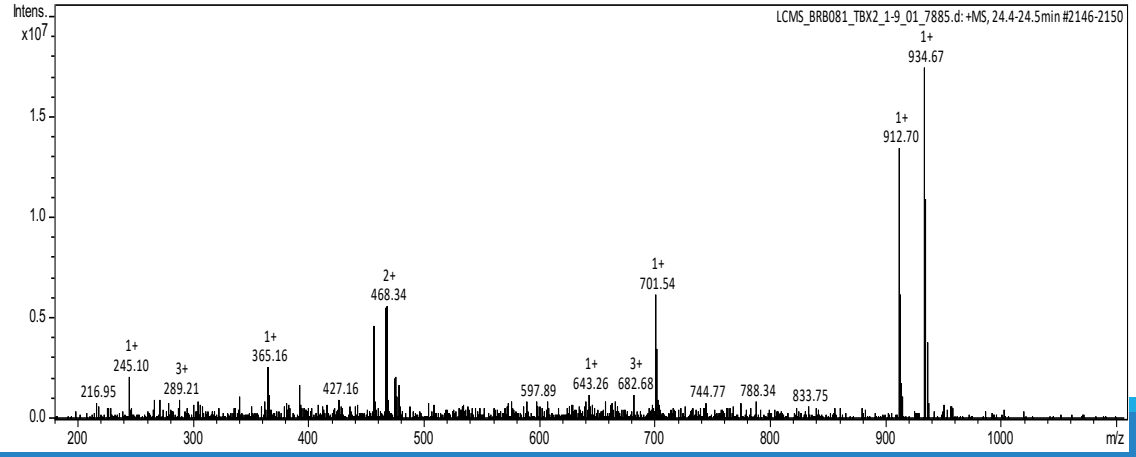
Kang et al., 2014, Chembiochem 14, 2125.
Lau et al., 2015, Org. Biomol. Chem. 13, 2255.

Eli Chapman
University of Arizona
Tucson, EUA

James La Clair
UCSD and Xenobe Institute, EUA

LC-MS ANALYSIS

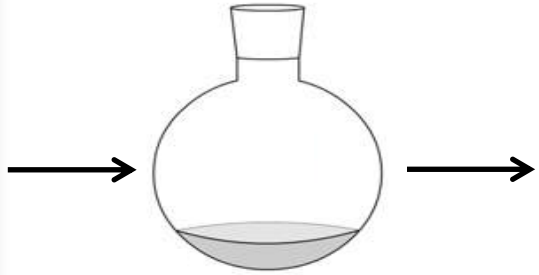


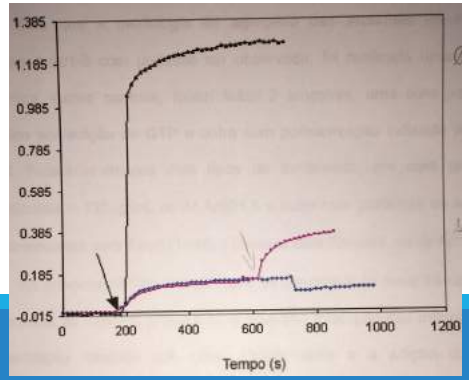


FUNCTIONAL (BIOAFFINITY) CHROMATOGRAPHY

SETTING UP AN EXPERIMENT – POTENTIAL TARGET TUBULIN

Arenosclera brasiliensis

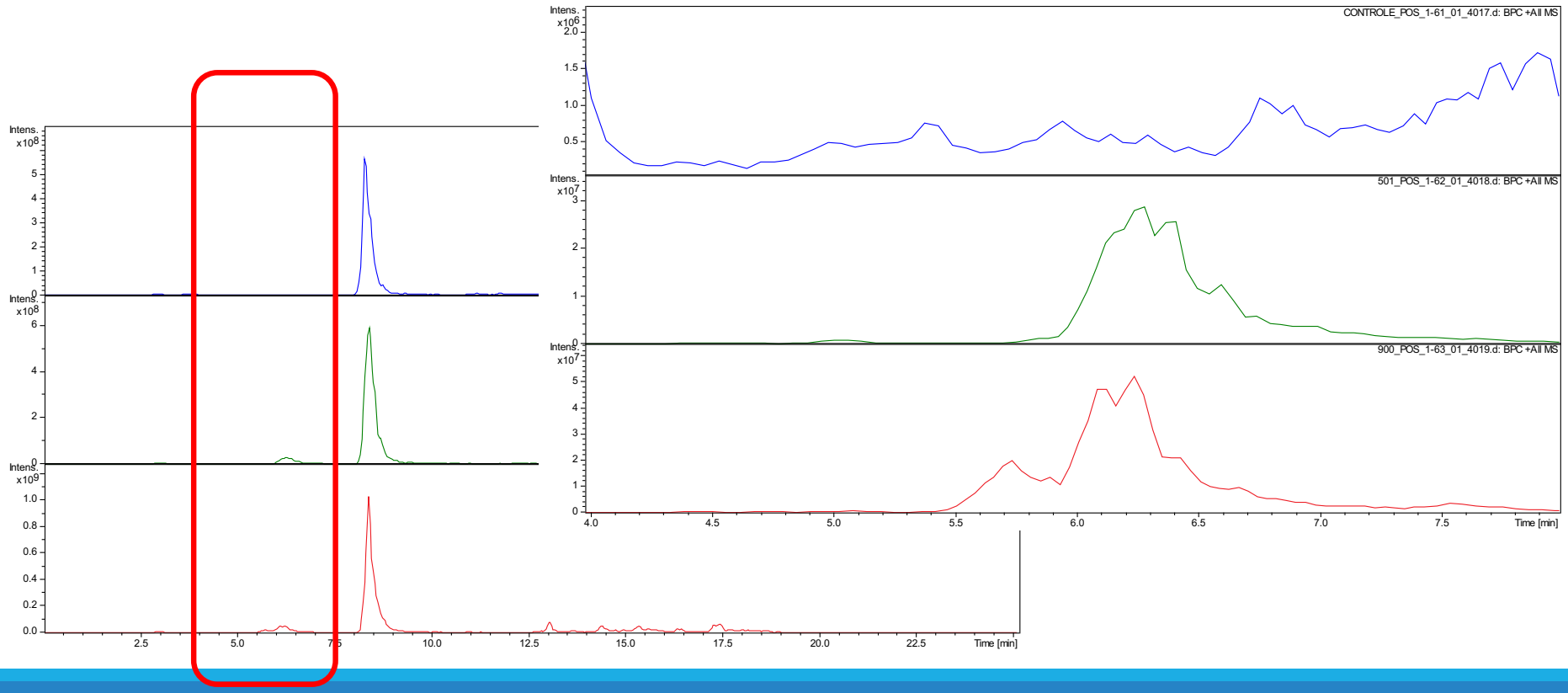


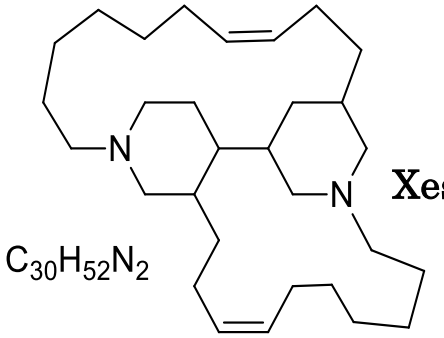


POTENTIAL TARGET - TUBULIN

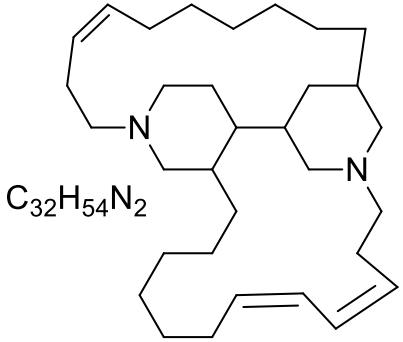
β-Tubulin – commercially available

Positive control – Taxol (Recovered as Taxol-K^+)

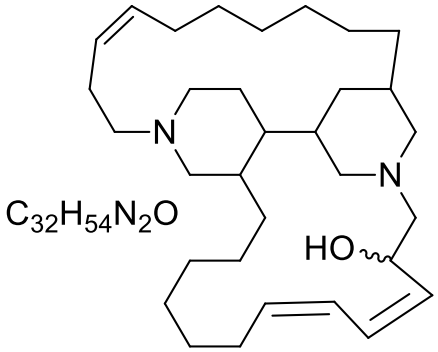




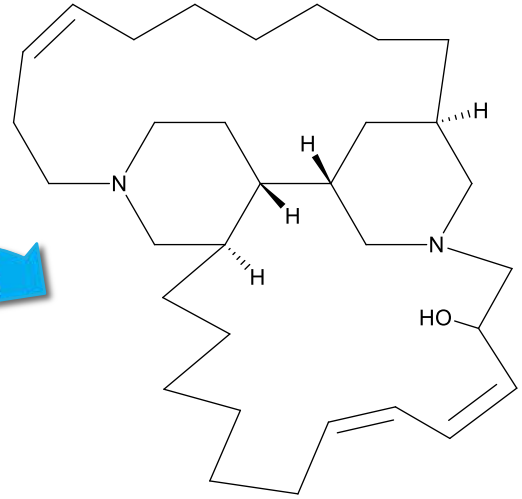
Xestoproxamine (m/z 441)



Haliclocyclamine (m/z 467) and analog (m/z 465)



Arenosclerins (m/z 483) and derivatives (m/z 481, 485 and 497)



Proposed structure for the novel **Arenosclerin F**

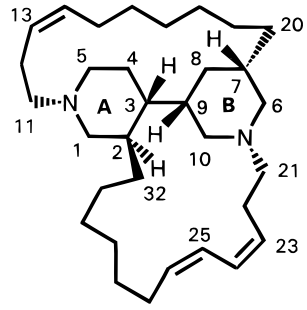
J. Nat. Prod. **2000,** *63,* 1098−1105

Arenosclerins A−C and Haliclonacyclamine E, New Tetracyclic Alkaloids from a Brazilian Endemic Haplosclerid Sponge *Arenosclera brasiliensis*

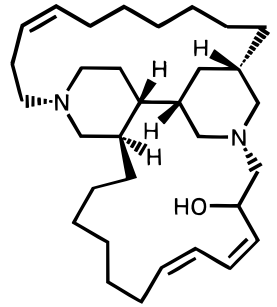
Yohandra R. Torres,[†] Roberto G. S. Berlinck,*[,†] Alviclér Magalhães,[‡] Alexandre B. Schefer,[‡] Antonio G. Ferreira,[‡] Eduardo Hajdu,[§] and Guilherme Muricy[§]

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil, and Museu Nacional, Departamento de Invertebrados, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista s/ n, CEP 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

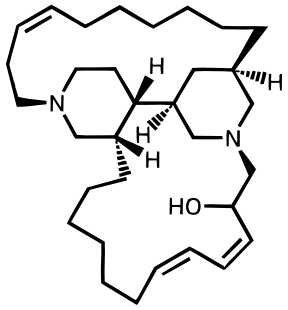
Arenosclera brasiliensis



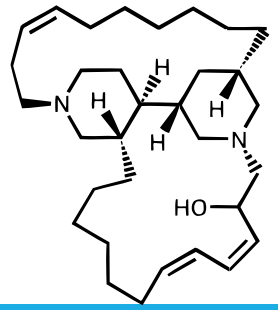
haliclonacyclamine E (**1**)



arenosclerin A (**2**)

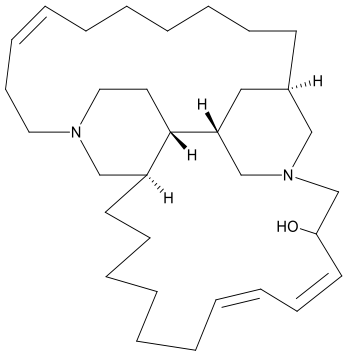


arenosclerin B (**3**)



arenosclerin C (**4**)

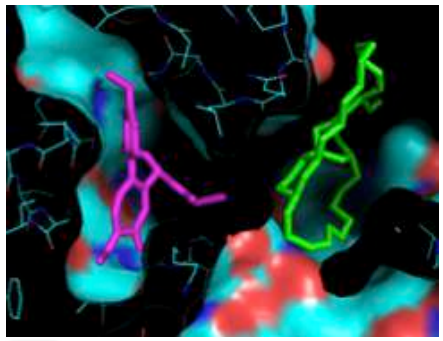
Cytotoxicity



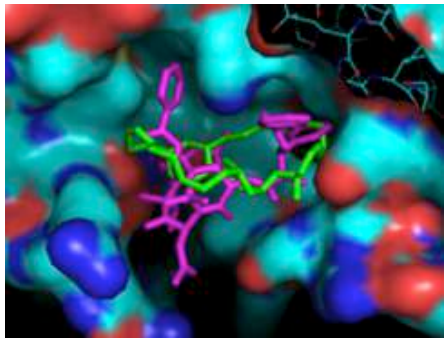
Arenosclerin F

Cell line	IC_{50} (μM)
HCT-116	1.76
MCF-7	0.52
Malme-3M	2.45
MM200	1.61
WM239A	0.68

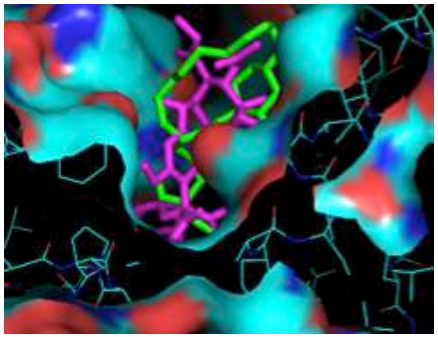
Molecular Docking



colchicine



paclitaxel



vimblastine

Considerações finais:

- Diversidade biológica gera diversidade química – perspectiva de inovação
- Brasil – Megadiversidade biológica
- É preciso estruturar redes de pesquisa com foco no desenvolvimento de fármacos
- Existem centenas de fármacos esperando para serem descobertos
- Descoberta de novos alvos terapêuticos