



Metalo-aminopeptidasas de parásitos como dianas en enfermedades infecciosas humanas

Línea de Investigación: Inhibidores de metalo-aminopeptidasas con potenciales aplicaciones en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas

DrC. Mirtha Elisa Aguado Casas

mirthaelisa23@gmail.com

La Habana, Junio 2025

Main line of research: Drug discovery for neglected infectious diseases such as Chagas disease and Leishmaniasis.

- La enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, causadas por los parásitos protozoos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*, representan importantes preocupaciones de salud pública debido a su elevada morbilidad y mortalidad. Asociadas a la pobreza y con aumento significativo en el número de casos a nivel global
- Existe una limitada eficacia de los tratamientos actuales. Sin vacuna disponible, y los dichos agentes terapéuticos en uso son altamente tóxicos, y se ha reportado resistencia parasitaria a estos.
- Dada la creciente resistencia a los fármacos existentes, se están explorando nuevas dianas terapéuticas, destacando las **metaloaminopeptidasas M17**, debido a su rol en el desarrollo y la nutrición del parásito.



(S. Sundar, 2016; S. Mohapatra, 2014)

(Izquierdo et al., 2024: PNTDs; Aguado et al., 2024: ACS Infectious Disease)

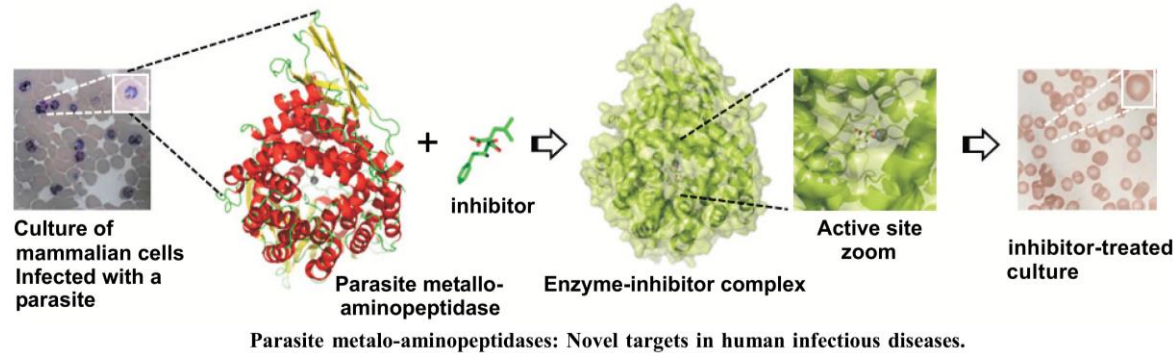
Las peptidasas de los *Trypanosomatidos* se encuentran entre los factores de virulencia más estudiados.

- Se expresa en todos los estadios del parásito.
- Implicadas en la patogenia y la nutrición de los parásitos, probablemente esencial para su supervivencia.
- Remodelación celular de las etapas del ciclo de vida del parásito

(Knowles, 1993, Rogers *et al.*, 1998, Stack *et al.*, 2007, Skinner-Adams *et al.*, 2012)

(Sajid *et al.*, 2011; De Almeida Nogueira *et al.*, 2013)

(Timm *et al.*, 2017)



Inhibidores de las LAPs que demuestren potencial inhibitorio en el parásito, podrían ser puntos de partida para desarrollar fármacos antileishmaniásicos

Validar a las LAPs M17 como un objetivo farmacológico en *L. major* y *T. cruzi* mediante la identificación de inhibidores potentes y selectivos

Nuevas dianas terapéuticas:

Chagas Disease Targets

- La Tc-LAP, una aminopeptidasa M17, es esencial para el suplemento nutricional de *Trypanosoma cruzi*.
- La inhibición de la Tc-LAP puede afectar significativamente el ciclo de vida del parásito, lo que resulta en resultados terapéuticos eficaces.
- El enfoque en la Tc-LAP permite el desarrollo de tratamientos específicos que pueden detener la progresión de la enfermedad.

(Cadavid-Restrepo *et al.*, 2011; Timm *et al.*, 2017)

Leishmaniasis Targets

- Lm-LAP, otra aminopeptidasa M17, se expresa en todos los estadios del parásito *Leishmania major*.
- Participa en la nutrición del parásito y es probablemente esencial para su supervivencia.
- Los inhibidores de Lm-LAP han demostrado potencial in vitro, lo que abre el camino a nuevas estrategias terapéuticas.

(Morty and Morehead, 2002)

➤ En nuestro grupo se obtuvieron variantes recombinantes de estas enzimas en *Escherichia coli* como modelo de las enzimas nativas, lo que ha llevado al descubrimiento de compuestos sintéticos con actividad antiparasitaria, con alta selectividad y baja toxicidad en modelos celulares.

Identificación y validación de inhibidores de las leucil-aminopeptidasas M17

RapidFire-MS: David Gray, PhD (University of Dundee)
Parasite assays: Mark Field, PhD (University of Dundee)

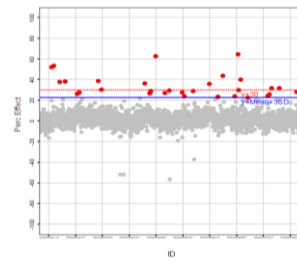
Tamizaje de alto flujo por el método cinético RapidFire-MS



- + 6000 compuestos en menos de 24h
- Sustrato peptídico



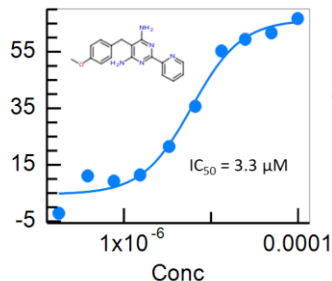
Tamizaje de la biblioteca de inhibidores de proteasas frente a TcLAP y Lm-LAP



- Identificándose 30 inhibidores vs LAPs

Estudio dosis-respuesta de los inhibidores seleccionados

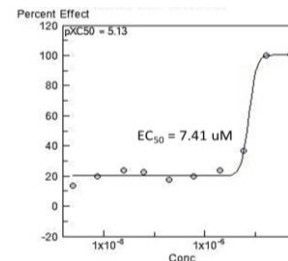
Percent Effect



- Identificándose 12 inhibidores con IC₅₀ < 50 μM



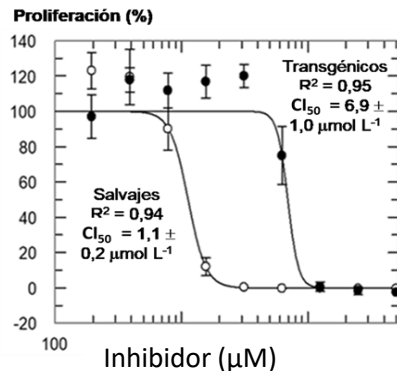
Efecto inhibitorio (%) sobre cultivos intracelulares de *Leishmania* y *T. cruzi*



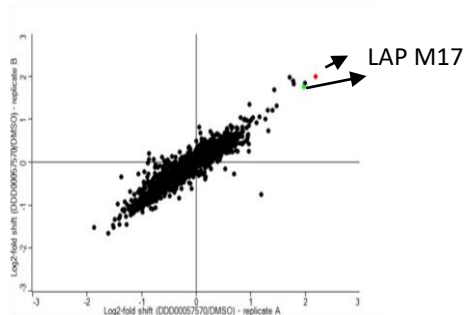
Se identificaron dos compuestos inhibidores de las Tc-LAP y Lm-LAP con actividad antileishmaniasica y anti chagásica *in vitro*

Validación de la Lm-LAP como blanco terapéutico

Lm-LAP over-expression



Isothermal proteome profiling

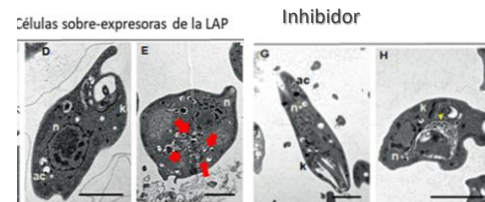


M17 LAP: objetivo de la actividad antiparasitaria

cambio de ~ 4 veces en las CI_{50}

Microscopía electrónica y Microscopía Confocal

- La sobreexpresión de Lm-LAP afecta la morfología del parásito.
- Los inhibidores interactúan con Lm-LAP y revierten parcialmente el fenotipo morfológico parental.

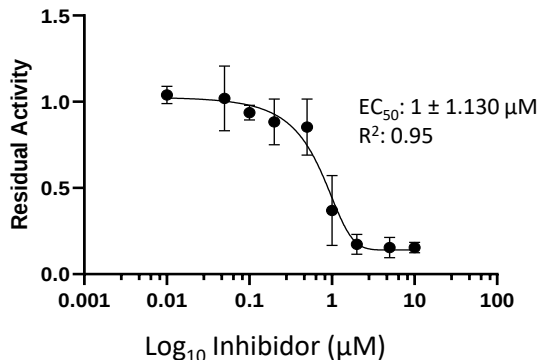


(Aguado et al., 2024. ACS Infect. Dis. 10.1021/acsinfectdis.4c00009)

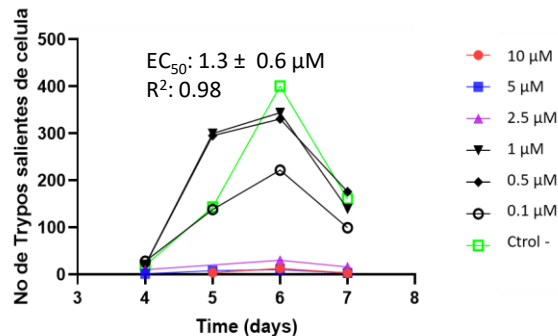
La actividad antiparasitaria se debió al efecto inhibitorio de los compuestos sobre la LAP endógena del parásito, validando la enzima como un objetivo terapéutico para el tratamiento de la leishmaniasis.

Efecto antiparasitario de un inhibidor potente de la Tc-LAP y Validación como blanco terapéutico

EC₅₀_Epimastigote_*T.cruzi*



Trypomastigotes salientes de CHO-K1
infectadas y tratadas

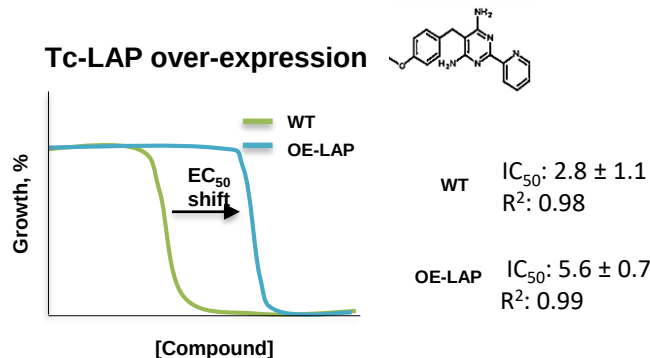


Mammalian Cell Viability Assay

EC ₅₀ (μM) <i>T. cruzi</i>	CC ₅₀ (μM) CHO_48 h	Selectivity Index_48 h
1.03 ± 1.13	173.59	168.5

*Cell Selectivity Index = CC₅₀ (CHO)
/ EC₅₀ (*Epis_T. cruzi*)

Tc-LAP over-expression



**Tc-LAP es un objetivo atractivo
para el desarrollo de nuevos
fármacos antichagásicos**

**Las metaloaminopeptidasas son buenos objetivos
para desarrollar fármacos antiparasitarios**

Conclusiones:

Contribuyendo a los avances terapéuticos para enfermedades infecciosas:

- Se obtuvo de forma recombinante a la Tc-LAP y Lm-LAP, en *Escherichia coli*, como modelo de las enzimas nativas para el descubrimiento de nuevos fármacos para tratar la leishmaniasis y la enfermedad del Chagas.
- Se identificaron inhibidores selectivos contra ambas LAPs con efecto antiparasitario, que representan nuevas posibilidades para combatir la leishmaniasis y la enfermedad del Chagas.
- Validamos a la Tc-LAP y la Lm-LAP como dianas terapéutica en *L. major* y *T. cruzi*

Publicaciones:

ACS Infectious Diseases

pubs.acs.org/journal/infdis

Identification and Validation of Compounds Targeting *Leishmania major* Leucyl-Aminopeptidase M17

Mirtha E. Aguado¹, Sandra Carvalho, Mario E. Valdés-Tresanco, De Lin, Norma Padilla-Mejía, Victoriano Corpas-Lopez, Martina Tesarová, Julius Lukeš, David Gray, Jorge González-Bacero,^{*} Susan Wyllie,^{*} and Mark C. Field^{*}

Cite This: ACS Infect. Dis. 2024, 10, 2002–2017

Read Online



Protein Expression and Purification
Volume 183, July 2021, 105877



Expression in *Escherichia coli*, purification and kinetic characterization of LAP_{Lm}, a *Leishmania major* M17-aminopeptidase

Mirtha Elisa Aguado^{1,2}, Maikel González-Matos², Maikel Izquierdo²,
Juan Quintana^{1,3}, Mark C. Field³, Jorge González-Bacero²

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Identification of a potent and selective LAP^{Tc} inhibitor by RapidFire-Mass Spectrometry, with antichagasic activity

Maikel Izquierdo¹, De Lin², Sandra O'Neill², Lauren A. Webster², Christy Paterson², John Thomas², Mirtha Elisa Aguado¹, Enrique Colina Araujo², Daniel Alpizar-Pedraza², Halimatu Jeji², Lorna MacLean², Anthony Hope², David W. Gray², Martin Zoltner^{2,3}, Mark C. Field^{2,3}, Jorge González-Bacero^{2,4}, Manu De Rycker^{2,4}

Open Access | Feature Paper | Article

KBE009: A Bestatin-Like Inhibitor of the *Trypanosoma cruzi* Acidic M17 Aminopeptidase with In Vitro Anti-Trypanosomal Activity

by Jorge González-Bacero^{1,2,3}, Irina Arocha³, Mirtha Elisa Aguado², Yanira Méndez⁴, Sabrina Marsicobetre^{3,5}, Maikel Izquierdo², Daniel G. Rivera⁴, Katherine Figarella^{3,6} and Néstor L. Uzcátegui^{7,8}

Home > The Protein Journal > Article

High-Level Expression in *Escherichia coli*, Purification and Kinetic Characterization of LAP^{Tc}, a *Trypanosoma cruzi* M17-Aminopeptidase

Published: 23 March 2019
Volume 18, pages 107–105, (2019) | Cite this article



Maikel Izquierdo, Mirtha Elisa Aguado, Martin Zoltner & Jorge González-Bacero

Agradecimientos



MCF group:

Mark C Field

Pax Zhang

Norma Padilla-Mejia

Rapid Fire-MS:

De Lin

David Gray

MOA group:

Susan Wyllie

Sandra

Carvalho

**ICB-USP | Institute of Biomedical
Sciences of the University of São
Paulo**

LabTryps:

Ariel Silber

Janaina Nascimento

Mayke Alencar

Gracias!