

## Luis Ignacio Rivas López

Investigador Científico  
luis.rivas@cib.csic.es



**PhD, 1984**  
Universidad Complutense de Madrid  
**Postdoctoral, 1984-1986**  
Weizmann Institute of Science (IS)  
Yale University (USA)  
**Científico Titular, 1986**  
IPBLN  
**Jefe de Grupo, 1991**  
**Investigador Científico, 2006**  
CIB, CSIC

### Investigadora del equipo | Staff scientist:

Pilar Fernández de Palencia Delgado

### Otros miembros | Other lab members:

Maria de los Angeles Abengózar Infantes  
Montserrat Nacher Vázquez  
Margarita Arroyo Nombela

@ <http://www.cib.csic.es/en/grupo.php?idgrupo=42>

# Péptidos Antibióticos Eucarióticos

El objetivo es definir nuevas alternativas quimioterapéuticas en tripanosomátidos por: 1) Búsqueda y optimización de péptidos membrano-activos. 2) Conjugados péptido penetrante -fármaco que solventa resistencias por baja acumulación del mismo; su localización intracelular por secuencias de importación organelar. 3) Búsqueda de fármacos inhibidores del metabolismo energético de *Leishmania*.

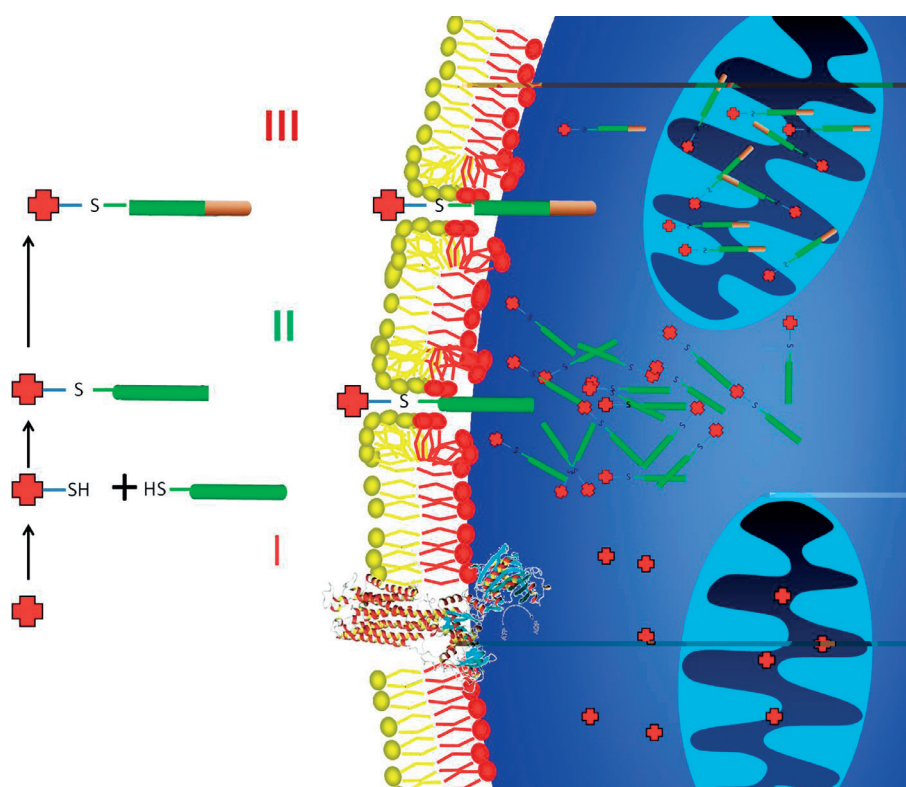
Nuevos péptidos membrano-activos como agentes leishmanicidas. Se ha estudiado la actividad leishmanicida de péptidos diseñados por interrogación de genomas de vertebrados, así como otros péptidos bacterianos. Su actividad está intrínsecamente ligada a la permeabilización de la membrana plasmática. Se han establecido relaciones estructura-función para carga, hidrofobicidad, momento hidrofóbico, estructura secundaria e índice de selectividad para su posterior optimización. Los mejores análogos consiguen índices de selectividad superiores a 20.

Péptidos penetrantes celulares (PPCs) en la quimioterapia contra *Leishmania*. Se ha

caracterizado la actividad leishmanicida de diversos PPCs conjugados a doxorubicina y miltefosina. Se han utilizado tanto para revertir resistencias basadas en una acumulación subtóxica del fármaco, como para incremento de la cinética de entrada de fármacos respecto a su forma libre. Se ha caracterizado la actividad leishmanicida de diversas RNAsas A de vertebrados, que requieren su internalización en el parásito para ser efectivas.

Búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas. Se ha concluido el estudio de un conjunto de  $\beta$ -aminoalcoholes cuyo mecanismo letal varía desde la inhibición de la fosforilación oxidativa a la interferencia en el tráfico intracelular

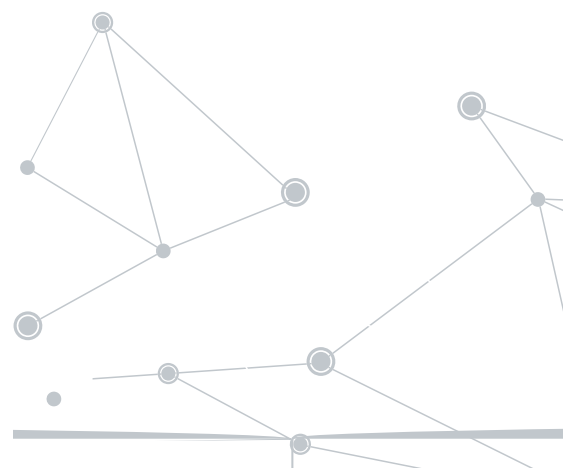
de membranas del parásito. Se ha continuado en la búsqueda de nuevos fotosensibilizadores de riboflavina y de compuestos metálicos orgánicos de  $Ru^{2+}$  para fototerapia dinámica de leishmaniasis cutánea. Dentro de la Unidad Mixta UMIB (CIB-CEMIBIO) se ha determinado el metaboloma basal de *Leishmania* y los de parásitos tratados in vitro con  $Sb^{3+}$  o miltefosina, así como sus respectivos aislados resistentes. Ambos fármacos inhiben el metabolismo redox del parásito, y desde una perspectiva metabólica, los parásitos resistentes poseerían un fitness superior al de los susceptibles, que concuerda con otros autores respecto a infectividad, con su consecuente incidencia epidemiológica.



**Figura 1 | Figure 1**

Estrategias de administración de fármacos basadas en PPCs. I.- Fármaco libre (rojo) con distribución intracelular dual. II.- Fármaco conjugado a PPC (verde). Incremento en su acumulación intracelular. Entrada a través de la membrana, independiente del transportador. III.- Conjugado fármaco-PPC con secuencia adicional de importación organelar (marrón). Acumulación preferencial del fármaco en el organelo.

Strategies for CPP implementation in drug delivery. I.- Free drug (red) with dual intracellular distribution. II.- CPP-drug conjugate: Improved drug uptake after conjugation to CPP (green). Entry across the membrane, independent of drug transporter. III.- Organelle-specific CPP drug conjugate. Import sequence added to the CPP (brown cylinder): Preferential drug accumulation into the organelle.



# Eukaryotic Antibiotic Peptides



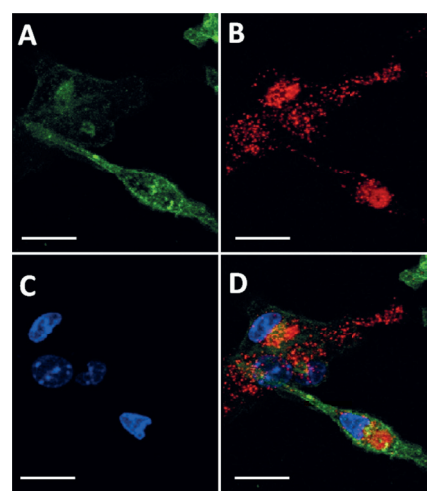
Our group aims to provide new alternatives to the chemotherapy of trypanosomatids by: 1) Search and optimization of membrane-active peptides. 2) Drug conjugation into cell penetrating peptides (CPP) to bypass resistance due to faulty intracellular drug accumulation. Subcellular targeting of these conjugates by fusion of organelle import sequences into the CPP. 3) Quest for new hits based on inhibition of the bioenergetic metabolism of *Leishmania*.

**M**embrane-active peptides as leishmanicidal agents. We have studied the leishmanicidal activity of peptides defined by interrogation of vertebrate genomes, as well as other bacterial peptides. Their activity is intrinsically linked to the permeabilization of the plasma membrane. Optimization was carried out according to SAR for charge, hydrophobicity, hydrophobic moment, secondary structure and selectivity index. The best analogues showed selectivity index over 20.

Cell penetrating peptides (CPPs) in chemotherapy against *Leishmania*. We have characterized the leishmanicidal activity of several CPPs conjugated to doxorubicin or miltefosine. These conjugates were used either to abrogate the resistance due to a faulty accumulation of the drug, or just to increase the uptake kinetics by the parasite. In both cases their performance was higher than the free drug. Several members of the RNase A family have been characterized as leishmanicidal agent. For that, their enzymatic activity and

internalization into the parasite were required to kill *Leishmania*.

Search for new leishmanicidal drugs. We have concluded the characterization of the leishmanicidal activity for a set of  $\beta$ -amino alcohols. Their lethal mechanisms, highly dependent on the nature of the scaffold substituents, vary from the inhibition of the oxidative phosphorylation to interference on membrane traffic. Work has continued in search of new riboflavin and metallo organic  $\text{Ru}^{2+}$  photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. Under the activity of the Mixed Unit UMIB (CIB-CEMBIO-CEU), we have analyzed the metabolomes of *Leishmania* parasites treated or not with  $\text{Sb}^{3+}$  or miltefosine. They were compared with the metabolomes of their respective resistant isolates. Both drugs inhibit the redox metabolism of the parasite, and from a metabolic perspective, resistant parasites possess a higher fitness compared with the susceptible ones, in agreement with previous data reported by other groups.



**Figura 2 | Figure 2**

Distribución del PPC NrTP5 en macrófagos peritoneales murinos. Las células fueron incubadas con NrTP5 (20  $\mu\text{M}$ ) y con la subunidad B de la toxina del cólera (2  $\mu\text{M}$ ) (37°C, 4h). Tinción de núcleos con DAPI (1  $\mu\text{M}$ ). Paneles: A.-Toxina del cólera. B.-NrTP5. C.-DAPI. D.-Imágenes solapadas. El experimento demuestra la entrada de NrTP5 por ruta diferente a la endocitosis por caveolina. Barra = 15  $\mu\text{m}$ .

Intracellular distribution of NrTP5, a CPP, in murine peritoneal macrophages. Cells were incubated with 20  $\mu\text{M}$  NrTP5 plus subunit B of the cholera toxin (2  $\mu\text{M}$ ) (37°C, 4h). Nuclei were stained with DAPI. Panels: A.-Cholera toxin. B.-NrTP5. C.-DAPI. D.-Merge. The experiment evidenced that NrTP5 enters the cell by a pathway different from caveolin endocytosis. Magnification bar = 15  $\mu\text{m}$ .

## Financiación | Funding

- P12/02706 (ISCIII-FEDER)
- RD12/0018/0007 (ISCIII-FEDER)
- RD06/0021/06 (ISCIII-FEDER)

## Publicaciones Seleccionadas Selected Publications

- Moreira, D., Abengózar, M.A., Rivas, L., Rial, E., Laforge, M., Li, X., Foretz, M., Viollet, B., Estaquier, J., Cordeiro da Silva, A., Silvestre, R [2015] *Leishmania infantum* modulates host macrophage metabolism by hijacking the SIRT1-AMPK-axis. **PLOS Pathog.** 11:e1004684.
- Abengózar, M.Á., Bustos, L.A., García-Hernández, R., Fernández de Palencia, P., Escarcena, R., Castany, S., Del Olmo, E., Gamarro, F., San Feliciano, A., Rivas L. [2015] *Mechanisms of Action of Substituted  $\beta$ -Amino Alkanols on Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother.** 59:1211-8.
- Vieira Silva, A., López-Sánchez, A., Couto Junqueira, H., Rivas, L., Baptista, M. A., Orellana, G. [2015] *Riboflavin derivatives for enhanced photodynamic activity against Leishmania parasites*. **Tetrahedron**, 71:457-62.
- Canuto, G.A., Castilho-Martins, E.A., Tavares, M.F., Rivas, L., Barbas, C., López-González, Á. [2014] *Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in Leishmania*. **Anal Bioanal Chem.** 406:3459-76.
- de la Torre, B.G., Hornillos, V., Luque-Ortega, J.R., Abengózar, M.A., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Rivas, L., Andreu, D. [2014] *A BODIPY-embedding miltefosine analog linked to cell-penetrating Tat(48-60) peptide favors intracellular delivery and visualization of the antiparasitic drug*. **Amino Acids.** 46:1047-58.
- Vincent, I.M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T.K., Ouellette, M. [2013] *Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in Leishmania infantum reveals changes to the internal lipid metabolism*. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.** 4:20-7.
- Carrión, J., Abengozar, M.A., Fernández-Reyes, M., Sánchez-Martín, C., Rial, E., Domínguez-Bernal, G., González-Barroso, M.M. [2013] *UCP2 deficiency helps to restrict the pathogenesis of experimental cutaneous and visceral leishmaniasis in mice*. **PLoS Negl Trop Dis.** 7:e2077.

