



XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024

**PLANEJAMENTO DE POTENCIAIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTI-
ALZHEIMER COM AFINIDADE FRENTE A BACE-1 HUMANA**

Alice Carvalho Barros¹; Mayra Ramos do Bomfim²; Franco Henrique Andrade Leite³

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

alcecary@gmail.com

2. Doutoranda em Biotecnologia, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

mayramosbonfim@hotmail.com

3. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: fhenrique@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Alzheimer; Beta-secretase 1; Dinâmica molecular

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa associada com um declínio cognitivo, motor e afetivo (Brem *et al.*, 2023). A principal hipótese para a patogênese da DA é a da cascata amiloide, que propõe o acúmulo de peptídeos beta amiloides (β A) leva a formação de placas no ambiente extracelular dos neurônios e contribuem para eventos como neuroinflamação, excitotoxicidade, hiperfosplilação da proteína, tau e déficits de neurotransmissores (Lopez, González, Léger, 2019). A BACE-1 é a primeira enzima no processo de formação dos peptídeos β A e por isso tem sido alvo validado na pesquisa e desenvolvimento de fármacos para o tratamento de pacientes com DA (Moussa-Pacha *et al.*, 2020). Entretanto, a BACE-1 possui uma isoforma a BACE-2, que cliva a Proteína Precursora Amiloide em local diferente da BACE-1 e não está relacionada com a DA (Wang *et al.*, 2019). Por esse motivo, a busca por candidatos a fármacos seletivos frente a BACE-1 é essencial para minimizar efeitos adversos graves. Uma forma de alcançar isso é através de ferramentas computacionais capazes de priorizar potenciais inibidores seletivos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, identificar os requisitos estruturais e estéreo-eletrônicos para inibição seletiva da BACE-1 frente a BACE-2.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo farmacofórico

Um conjunto de 24 inibidores de BACE-2 ($IC_{50} < 200\text{nM}$) foram divididas em conjuntos de treinamento ($n=5$) e teste ($n=19$). O conjunto de treinamento foi usado para criar modelos farmacofóricos com o auxílio do módulo GALAHAD no SYBYL®-X 2.0. O conjunto teste foi usado para validação dos modelos farmacofóricos, no qual o modelo farmacofórico com melhores parâmetros estatísticos e internos e área sob a curva (AUC) $ROC > 0,70$ foi usado para triagem virtual de moléculas remanescentes da filtragem por modelo farmacofórico de BACE-1. Aquelas com QFIT no modelo de BACE-2 igual a zero foram selecionados para etapa de acoplamento molecular

Acoplamento molecular

A eficiência do acoplamento molecular frente a BACE-2 no GOLD v 4.2.1 foi avaliada através do reacoplamento com o ligante cristalográfico (PDB ID 7N4N). As funções de pontuação que apresentaram $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$ foram avaliadas com o auxílio do cálculo da AUC. A função de pontuação que apresentou $\text{AUC} > 0,7$ foi selecionada. As moléculas selecionadas na etapa anterior foram submetidas ao acoplamento molecular frente a BACE-1 e BACE-2.

Priorização de moléculas seletivas para simulações de Dinâmica Molecular

Um conjunto de moléculas ativas e inativas frente a BACE-1 foram selecionadas e submetidas ao acoplamento molecular. O maior valor de escore obtido no conjunto de moléculas ativas frente a BACE-1 foi usado como ponto de corte para priorização de moléculas. Desse conjunto, a molécula com menor valor de escore frente a BACE-2 foi selecionada.

Dinâmica molecular

A molécula selecionada pela etapa anterior foi submetida a simulações de dinâmica molecular frente às enzimas BACE-1 e BACE-2, ambas foram analisadas em suas formas APO e complexo com o auxílio do GROMACS. A BACE-1 já foi previamente submetida a dinâmica molecular em sua forma APO (do Bomfim *et al.*, 2023).

Cálculo da energia livre de ligação

O cálculo da energia livre de ligação foi usado para avaliação da afinidade de ligação da molécula selecionada frente a BACE-2. A energia livre de ligação dos complexos foi calculada utilizando o método Mechanics Poisson – Boltzmann surface area (MM/PBSA) implementado na ferramenta g_mmpbsa.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Modelos farmacofóricos

Dos 10 modelos farmacofóricos construídos com o auxílio do módulo GALAHAD, o modelo farmacofórico 1 que apresentou $\text{AUC} > 0,7$ e maior soma dos parâmetros internos (Sterics + Hbond + Mol_Qry) foi selecionado para triagem virtual dos bancos de moléculas. Aquelas pontuadas com $\text{QFIT} > 0,0$ (BACE-1) e $\text{QFIT} = 0,0$ (BACE-2) foram selecionadas para acoplamento molecular.

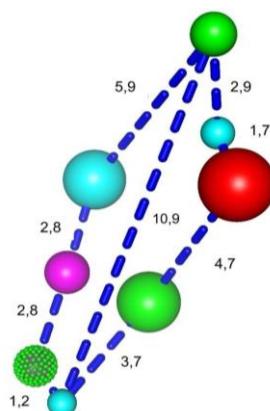


Figura 1 - Representação do modelo farmacofórico para inibidores de BACE-2. Esferas em ciano: centros hidrofóbicos; verde: pontos aceptores de ligação de H; vermelho: centro carregado positivamente; magenta: centro doador de ligação de H.

Acoplamento molecular

A avaliação da eficiência do acoplamento através do RMSD levou a seleção das funções de pontuação ChemPLP e GoldScore, que obtiveram RMSD de 0,86 e 0,38 Å respectivamente. Para distinguir entre as duas funções foi empregado o cálculo da AUC ROC, sendo selecionada a função GoldScore que apresentou $AUC > 0,7$. Um conjunto de 12.749 moléculas foi submetido ao acoplamento molecular para BACE-2 usando a função GoldScore e frente a BACE-1 usando a função ASP previamente validada (do Bomfim *et al.*, 2023).

Utilizando a estratégia de priorização, o maior valor de escore obtido pelo conjunto de moléculas ativas frente a BACE-1 foi de 47,96, esse valor foi usado como ponto de corte. Das moléculas priorizadas, ZINC98228398, oriunda do banco Sigma Aldrich, apresentou o menor valor de escore frente a BACE-2 e, portanto, foi selecionada para a dinâmica molecular

Dinâmica Molecular

Para análise do comportamento da estrutura ao longo da simulação, primeiro foi empregada a avaliação de desvio quadrático médio (RMSD) (Figura 2).

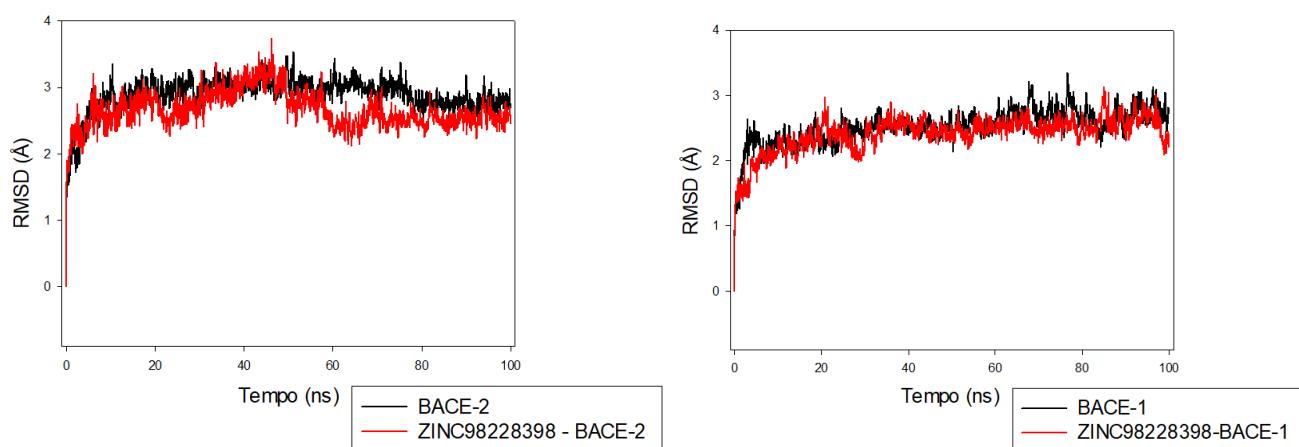


Figura 2 – Valores de RMSD (Å) para a cadeia principal (*backbone*) da BACE-2 e BACE-1 APO e complexos ZINC98228398-BACE-2 e ZINC98228398-BACE-1.

A forma APO da BACE-2 atinge a estabilidade por volta dos 15ns, sem grandes variações a partir desse ponto. Em comparação, o complexo ZINC98228398-BACE-2 só atinge estabilidade após 60ns. Já BACE-1 em sua forma APO atinge estabilidade por volta dos 25ns e o complexo ZINC98228398-BACE-1 por volta 35ns (do Bomfim *et al.*, 2023).

Para os complexos BACE-1 e BACE-2 também foram avaliadas a presença e permanência das ligações de hidrogênio durante a fase produtiva de ambas DM. No complexo BACE-2 mantiveram ligações de hidrogênio do ligante com Tyr30, Asn183 e Glu351. Nenhum desses, foi descrito como importante para ligação ao sítio ativo da BACE-2. No complexo de BACE-1 a molécula manteve ligações de hidrogênio com os resíduos localizados no sítio ativo da enzima (Butler *et al.*, 2016)

Cálculo da energia livre de ligação

O método MM/PBSA implementado na ferramenta g_mmpbsa, foi empregado no cálculo da energia livre de ligação do complexo ZINC98228398-BACE-2. O valor de energia livre de ligação (ΔG_{bind}) obtido para o complexo ZINC98228398 foi de -5,13 Kcal/mol. Esse valor quando comparado com outros inibidores potentes da BACE-2 (AZD3293 IC50 BACE-2 = 0,9 nM, $\Delta G_{bind} = -44.15 \pm 0.20$) (Li *et al.*, 2021), demonstra uma

redução do ΔG_{bind} , parâmetro que avalia a espontaneidade da formação do complexo. O parâmetro que mais contribuiu para estabilidade do sistema foi a energia de van der Waals (ΔE_{vdW}) com -17,53 kcal/mol. Ainda assim, quando comparado com uma molécula potente para a BACE-2 (DBO, IC₅₀ BACE-2 = 1100; $\Delta E_{vdW} = -50.35$) (Chen *et al.*, 2019) é um valor de baixa magnitude, o que pode demonstrar que ZINC98228398 não mantém uma ligação espontânea com BACE-2 e por isso pode apresentar seletividade frente a BACE-1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho identificamos as características estruturais, químicas e estéreo-eletrônicas necessárias para inibição da BACE-2 através da construção de um modelo farmacofórico. Esse modelo farmacofórico foi empregado na triagem virtual de bancos de moléculas em conjunto com o acoplamento molecular. Sendo selecionada ZINC98228398, que foi submetida a DM e cálculo de energia livre de ligação. Através da análise de RSMD observamos que o complexo BACE-2-ZINC98228398 se mostrou instável pelos 60ns iniciais da simulação. Além disso, mediante a análise de permanência das ligações de hidrogênio, chegou-se à conclusão de que ZINC98228398 não manteve ligações de hidrogênio significativas com nenhum dos aminoácidos já descritos na literatura como importantes para inibição frente a BACE-2. Por fim, o cálculo de energia livre de ligação de ZINC98228398 frente a BACE-2 demonstrou uma ligação não tão favorável quanto um inibidor potente já descrito na literatura, podendo indicar seletividade frente a BACE-1.

REFERÊNCIAS

- BREM, A. K. *et al.* 2023. Digital endpoints in clinical trials of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: challenges and opportunities. *Front Neurol.* 14:1210974.
- BUTLER, C.R. *et al.* 2016. Aminomethyl-Derived Beta Secretase (BACE1) Inhibitors: Engaging Gly230 without an Anilide Functionality. *J Med Chem.* 60(1):386–402.
- CHEN, J. *et al.* 2019. Molecular Mechanism of Binding Selectivity of Inhibitors toward BACE1 and BACE2 Revealed by Multiple Short Molecular Dynamics Simulations and Free-Energy Predictions. *ACS Chem Neurosci.* 10(10):4303–4318.
- DO BOMFIM, M. R. *et al.* 2023. Identification of potential human beta-secretase 1 inhibitors by hierarchical virtual screening and molecular dynamics. *J Biomol Struct Dyn.* 41(10):4560–4574.
- LI, S. *et al.* 2021. A series of molecular modeling techniques to reveal selective mechanisms of inhibitors to β -Site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 (BACE2). *J Biomol Struct Dyn.* 39(8):2824-2837.
- LOPEZ, J. A. S.; GONZÁLEZ, H. M.; LÉGER, G. C. 2019. Alzheimer's disease. In: ASTHANA, S.; DEKOSKY, S. T. (ed.), *Handbook of Clinical Neurology*, pp. 231-255.
- MOUSSA-PACHA, N. M. *et al.* 2020. BACE1 inhibitors: Status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 40(1):339-384.
- WANG, Z. *et al.* 2019. BACE2, a conditional β -secretase, contributes to Alzheimer's disease pathogenesis. *JCI Insight.* 4(1).