

## Triagem virtual de inibidores da proteína Filamentosa termossensível Z (FtsZ) de *Staphylococcus aureus*

Matheus V. A. Cruz<sup>1,2</sup>; Humberto F. Freitas<sup>1,2</sup>

1- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia;

2- Núcleo de Pesquisa em Biomoléculas (NuPeqBio), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

**Palavras-Chave:** SBVS, resistência bacteriana, divisão celular.

### Introdução

Fármacos antibióticos têm sido empregados para o tratamento de infecções bacterianas desde o início do século XX, desempenhando um papel fundamental na redução dos índices globais de morbidade e mortalidade. Entretanto, nos últimos anos, tem sido observada uma disseminação alarmante da resistência global a esses agentes, sobretudo entre as bactérias Gram-negativas (DA SILVA, 2022). Como resultado dessa situação preocupante, estimou-se que, em 2019, aproximadamente 4,95 milhões de pessoas vieram a óbito devido a doenças associadas à resistência antimicrobiana, e esse índice poderá aumentar para 10 milhões até 2050 (MURRAY et al, 2022).

Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta para a possibilidade de infecções bacterianas resistentes se tornarem uma nova pandemia. Essa perspectiva exige a adoção de medidas urgentes, por meio da inibição dos atuais mecanismos de resistência, ou pela identificação de alvos terapêuticos que possibilitem o desenvolvimento de novos fármacos com mecanismos de ação distintos, capazes de contornar os diversos mecanismos de resistência (KIM et al, 2020). Para enfrentar esses desafios, a investigação de proteínas-alvo que atuem por vias bioquímicas distintas e não apresentem mecanismos de resistência conhecidos pode ampliar o acervo de antibióticos atualmente disponíveis, bem como, identificar novas maneiras de enfraquecer as bactérias patogênicas.

Neste contexto, existe uma crescente expectativa em relação às proteínas-alvo que desempenham funções na divisão celular, como as proteínas filamentosas termossensíveis (Fts - Filamentous Temperature-Sensitive proteins) (ROEMER et al, 2011). As Fts compõem um complexo formado por dezesseis proteínas que desempenham um papel essencial na divisão binária bacteriana, também conhecido como divisoma. Entre essas proteínas, a FtsZ é a proteína mais abundante e conservada em quase todas as espécies de bactérias, pois atua desde as fases iniciais da formação do septo até ao desfecho da citocinese. Pesquisas recentes também sugerem que inibidores da FtsZ impactam na localização de vários componentes da maquinaria de divisão celular. Isto permite uma atuação sinérgica com antibióticos beta-lactâmicos capaz de reduzir as chances de resistência microbiana (CHAN et al, 2015, FERRER-GONZALES et al, 2021).

Devido a importância dessa proteína na viabilidade celular bacteriana, esforços para descobrir novos inibidores sintéticos têm sido feitos, como zantrinas e benzamidas, além de produtos naturais, incluindo a doxorrubixina, curcumina, berberina, cinamaldeídos e seus derivados (TRIPATHY; SUSANTA, 2019). Diante do panorama acima, tornou-se imperativo

empreender esforços para o planejamento de fármacos que sejam tanto seguros quanto eficazes contra FtsZ. (LU et al, 2020). Neste sentido, a disponibilidade de estruturas tridimensionais da enzima resolvidas por difração de raios-X, ampliou as perspectivas de identificação e otimização de moléculas bioativas por meio de estratégias computacionais (GONZÁLEZ-BELLO et al, 2020). Dessa forma, nos últimos anos diversos derivados de benzamidas foram sintetizados e avaliados contra de FtsZ de *Staphylococcus aureus* (SaFtsZ). Estes derivados permitiram a construção de modelos robustos de triagem virtual por acoplamento molecular (CRUZ; PITA; FREITAS, 2023). Nesse trabalho objetivamos apresentar as estratégias empregadas para a seleção de possíveis inibidores de SaFtsZ.

### Material e Métodos

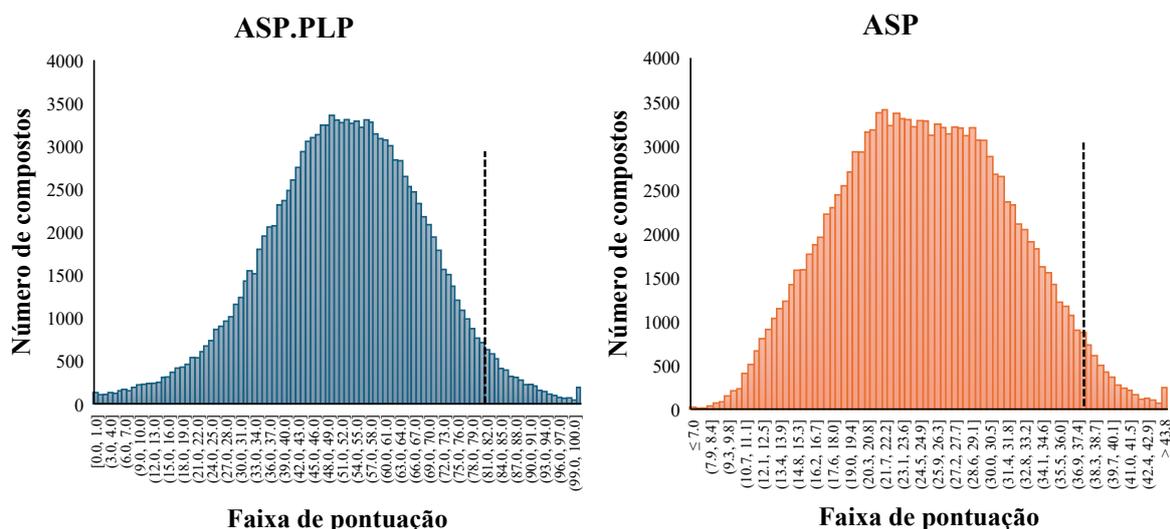
A estrutura 3D da SaFtsZ (código 5XDU, 2,0 Å), obtida do banco de dados de proteína (PDB, rcsb.org), foi preparado no programa Sybyl-X 2.1.1 (Tripos, Certara USA, inc.) utilizando o seguinte protocolo: extração das águas, ligantes e artifícios de cristalização (Ex. glicerol), adição de átomos de hidrogênios, ajuste de protonação dos resíduos de aspartato, glutamato e histidinas, e adição de cargas parciais MMFF02.

Em seguida, um conjunto de 220 mil compostos comercialmente disponíveis no catálogo Sigma-Aldrich foram obtidas do repositório ZINC database (<https://zinc.docking.org>) em formato 2D e convertidas em formato 3D através da ferramenta *translate* disponível no programa Sybyl-X 2.1.1. Os compostos foram submetidos à simulação de acoplamento molecular no programa Gold 2024.1 (CCDC), segundo padronização previamente realizada (CRUZ; PITA; FREITAS, 2023): Eficiência de busca (30%) e funções de pontuação usadas (ASP e ASP com reavaliação da pontuação com ChemPLP ou ASP.PLP).

Os compostos que obtiveram pontuação acima de 37,6 (ASP) e 81,6 (ASP.PLP) foram empregados ao servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA et al, 2017) para a predição de diversas propriedades físico-químicas e estruturais usados como critérios para seleção dos melhores candidatos: 1- propriedades “drug-like” segundo a regra de Muegge e Egan; 2- similaridade estrutural inibidores de CYPs; 3- presença de características descritas como PAINS (BAELL ; HOLLOWAY, 2010) ou pertencente a regra de Brenk (BRENK et al, 2008); 4- Solubilidade em água; 5- biodisponibilidade segundo modelo Abbot; e 6- acessibilidade sintética. Uma vez que se busca compostos com atividade antibacteriana, foi aplicado a regra descrita por Richter et al (2017)( para seleção dos compostos com maior capacidade de atuar em bactérias gram-negativas e positivas contendo bombas de efluxo. As moléculas selecionadas tiveram seus perfis de interação visualmente inspecionadas no programa Pymol 0.99 e PoseView disponível na plataforma (proteins.plus) (SCHÖNING-STIERAND et al, 2022) a fim de identificar padrões de interação similares ao observado em complexos inibidor-SaFtsZ co-cristalizados. Ao final, disponibilidade de informação sobre atividade biologia das moléculas foi investigada no servidor PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

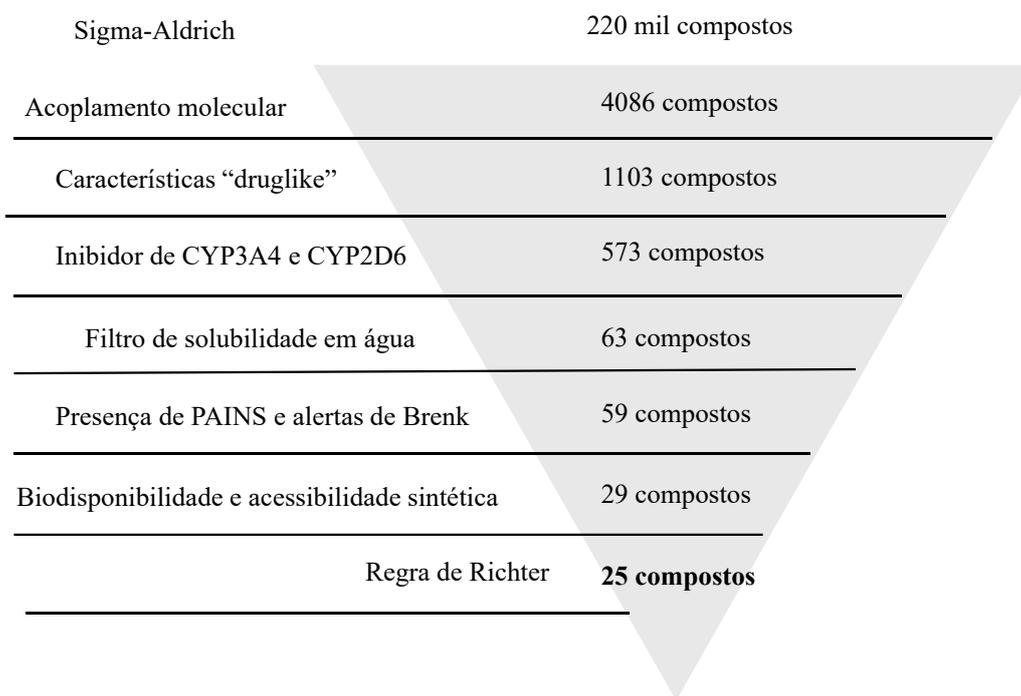
### Resultados e Discussão

Um conjunto de 175 derivados de benzamidas foram previamente catalogados e utilizados para a construção de modelo de triagem por acoplamento molecular no programa Gold (CRUZ; PITA; FREITAS, 2023). Esse modelo destacou que as funções ASP e ASP com reavaliação através da função ChemPLP apresentam excelente capacidade de identificar compostos ativos. Diante disso, esse modelo foi usado para a triagem de 220 mil compostos disponíveis comercialmente na plataforma Sigma-Aldrich (Figura 1).



**Figura 1.** Frequência de compostos acoplados por faixa de pontuação segundo as funções ASP.PLP (Azul) e ASP (Vermelho). A linha tracejada determinar os pontos de corte de cada função.

Utilizando como limites de pontuação 81,6 (ASP.PLP) e 37,6 (ASP), apenas 1,85% (4086 compostos) foram mantidos para as etapas seguintes que seguem o fluxograma apresentado na Figura 2.



**Figura 2.** Sequência de filtragem dos compostos triados por acoplamento

Em seguida, os compostos foram submetidos a análise de propriedades similares a fármacos ou “drug-like”, contudo, muitos antibióticos violam a regra de Lipinsk clássica, assim, foram usados um filtro consensual mais amplo contendo as propriedades descritas nas regras Muegge (MUEGGE et al, 2001) e Egan (EGAN et al, 2000). Assim, 1103 compostos selecionados nesta etapa devem apresentar boa absorção intestinal.

Antibióticos são frequentemente administrados em combinação com outros medicamentos. Assim, a avaliação das moléculas quanto à sua capacidade de inibir as enzimas do citocromo P450, especialmente CYP3A4 e CYP2D6, é de grande importância na triagem virtual de candidatos a fármacos, pois estas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de uma grande variedade de xenobióticos, incluindo muitos fármacos. Essa análise, portanto, contribui para desenvolvimento de fármacos mais seguros, reduzindo probabilidade de falhar em estágios avançados da pesquisa. Nesta etapa da filtragem, os compostos com potenciais característica similares a inibidores das CYPs 3A4 e 2D6 foram eliminados, restando apenas 573 compostos.

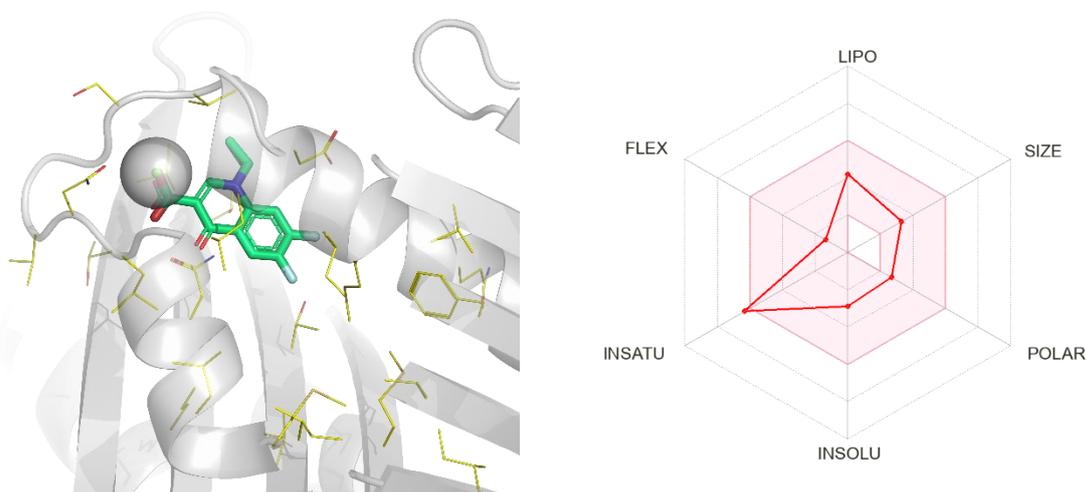
Na sequência do trabalho foram utilizadas várias métricas para estimar a solubilidade dos compostos restantes da etapa anterior. A solubilidade é um parâmetro crítico na triagem virtual de candidatos a fármacos (OTTAVIANI et al, 2010), especialmente para antibióticos, pois a baixa solubilidade implica em severas dificuldades nos ensaios biológicos, especialmente para ensaios diretos com as proteínas alvo. Além disso, ensaios microbiológicos frequentemente falham devido a baixa solubilidade aquosa dos compostos testados. Diante disso, foram utilizados dois modelos topológicos de previsão de solubilidade (ESOL e Ali) e baseado em fragmentos corrigido pelo peso molecular (Silico-IT). Na análise consensual desses preditores, foram descartados compostos insolúveis, pouco solúveis e moderadamente solúveis, restando assim, apenas 63 compostos.

Posteriormente, analisou-se a presença de características descritas como promíscuos ou PAINS (*pan assay interference compounds*) pois contém subestruturas que mostram resposta potente em ensaios, independentemente do alvo proteico gerando resultados falso-positivos (BAELL ; HOLLOWAY, 2010). Além disso, existem compostos que podem conter características estruturais putativamente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou portadores de propriedades responsáveis por farmacocinética ruim. Estes compostos foram identificados empregando o filtro de Brenk (BRENK et al, 2008). Assim, três compostos foram excluídos.

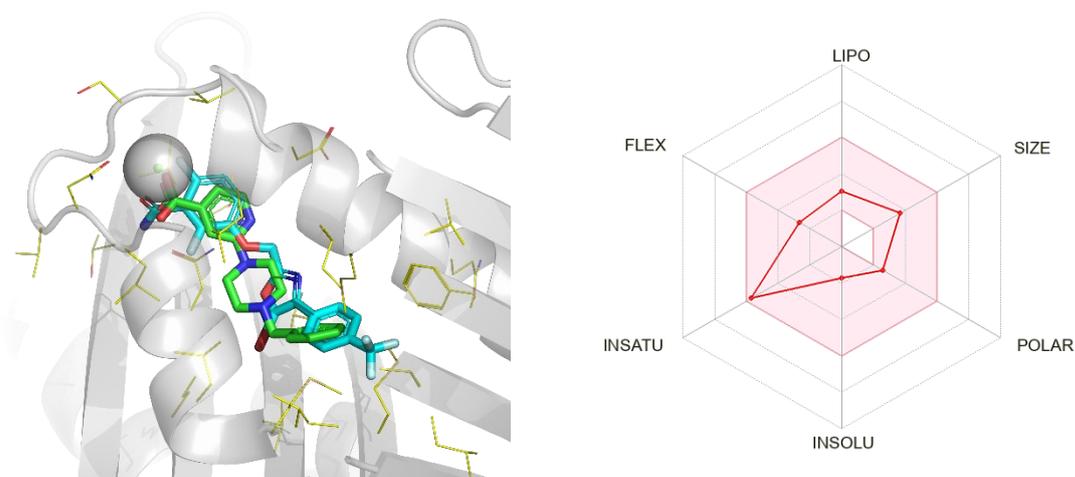
Os 59 compostos restantes foram, então, analisados quanto a biodisponibilidade segundo os critérios da Abbot, que prevê a probabilidade de um composto ter pelo menos 10% de biodisponibilidade oral em ratos ou permeabilidade mensurável em células Caco-2 (MARTIN, 2005). Esta análise permite selecionar compostos que podem ser testados em ensaios de citotoxicidade celular. Nessa análise, foram considerados os compostos com probabilidade superior a 55%. Além disso, esses compostos devem apresentar baixa complexidade sintética o qual pode ser avaliada através da ferramenta baseada em fragmentos moleculares de acessibilidade sintética (AS) cujo valor varia de 1 (muito fácil) até 10 (muito difícil) (FUKUNISHI et al, 2014). Para filtragem foram considerados apenas compostos com  $AS < 5$ , sendo assim, apenas 29 compostos foram mantidos para a etapa seguinte.

Por fim, a penetração celular e a resistência ao efluxo são importantes para todas as classes de antibióticos. De fato, seguindo essa premissa Richter e colaboradores focou na identificação de propriedades moleculares que favorecem a acumulação de compostos em bactérias Gram-negativas, especialmente em relação à resistência ao efluxo (RICHTER et al, 2017). Essa abordagem resultou na seleção de 25 compostos que foram visualmente analisados quanto as suas interações com o sítio da SaFtsZ.

Entre os compostos analisados, valem destacar dois representantes (NPB05 e NPB17). O NPB05 (Figura 3A) é uma quinolona com atividade frente a *S. aureus* MRSA (64 ug/mL, BUESO-BORDILS et al, 2017), sugerindo um possível mecanismo alternativo para a ação desta classe de moléculas. O composto NPB17 apresentou padrão de interação similar ao observado para o inibidor co-cristalizado na SaFtsZ (Figura 4A) e boa ocupação no sítio ativo. Ambos apresentam propriedades físico-químicas ótimas para biodisponibilidade oral, segundo o servidor SwissADME(Figuras 3B e 4B).



**Figura 3.** Complexo do inibidor co-cristalizado com a SaFtsZ (ciano) e NPB05 acoplado no sítio (Verde) (A) e Valor das propriedades físico-químicas de NPB05 (linha vermelha) em relação aos limites de boa biodisponibilidade (zona rosa) (B).



**Figura 4.** Complexo do inibidor co-cristalizado com a SaFtsZ (ciano) e NPB17 acoplado no sítio (verde) (A) e Valor das propriedades físico-químicas de NPB17 (linha vermelha) em relação aos limites de boa biodisponibilidade (zona rosa) (B).

## Conclusões

As estratégias empregadas neste trabalho objetivam racionalizar a seleção de compostos com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas adequadas. Dentre os compostos selecionados, está um representante com atividade antibiótica descrita, sugerindo que a abordagem parece correta. A etapa seguinte deste projeto é investigar o comportamento dinâmico desses compostos dentro do sítio da enzima através de dinâmica molecular e avaliar a atividade frente *S. aureus* MRSA.

## Agradecimentos

CPNq, FAPESB, PPGCF, UEFS

## Referências

- BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 7, p. 2719-2740, 2010.
- BRENK, R. et al. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem*, v. 3, n. 3, p. 435-444, 2008.
- BUESO-BORDILS, J. I. et al. Topological pattern for the search of new active drugs against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 138, p. 807-815, 2017.
- CHAN, F. Y. et al. Antimicrobial activity of a quinuclidine-based FtsZ inhibitor and its synergistic potential with  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Antibiotics*, v. 68, p. 253-258, 2015.
- CRUZ, M. V. A.; PITA, S. S. R.; FREITAS, H. F. Structure-based virtual screening of *Staphylococcus aureus* FtsZ inhibitors. In: 11th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2023, Salvador. Anais [...]. Salvador: [s.n.], 2023.
- DA SILVA, A. E. F.; RODRIGUES JUNIOR, O. M. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado dos carbapenêmicos meropenem e imipenem: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, e37311730033, 2022.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.
- EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 21, p. 3867-3877, 2000.
- FERRER-GONZÁLEZ, E. et al. Impact of FtsZ Inhibition on the Localization of the Penicillin Binding Proteins in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 203, n. 16, e00204-21, 2021.
- FUKUNISHI, Y. et al. Prediction of synthetic accessibility based on commercially available compound databases. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 54, n. 12, p. 3259-3267, 2014.
- GONZÁLEZ-BELLO, C. et al.  $\beta$ -Lactamase Inhibitors To Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, n. 5, p. 1859-1881, 2020.
- KIM, W. et al. On the road to discovering urgently needed antibiotics: so close yet so far away. *ACS Infectious Diseases*, v. 6, n. 6, p. 1292-1294, 2020.
- LU, B. et al. Molecular Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates From Outpatients in Sentinel Hospitals, Beijing, China, 2010-2019. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 586, 2020.
- MARTIN, Y. C. A Bioavailability Score. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 9, p. 3164-3170, 2005.
- MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.
- MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.
- OTTAVIANI, G. et al. What is modulating solubility in simulated intestinal fluids? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 3-4, p. 452-457, 2010.



RICHTER, M. et al. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. *Nature*, v. 545, n. 7654, p. 299-304, 2017.

ROEMER, T. et al. FtsZ inhibitors as potentiators of beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. WO201112435A1, 15 set. 2011.

SCHÖNING-STIERAND, K. et al. ProteinsPlus: a comprehensive collection of web-based molecular modeling tools. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. W1, p. W611-W615, 2022.

TRIPATHY, S.; SAHU, S. K. FtsZ inhibitors as a new generation of antibacterial agents. *Bioorganic Chemistry*, v. 91, p. 103169, 2019.