

4.03.99 – Farmácia

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ANÁLOGOS HÍBRIDOS DA AFN-1252 COMO POTENCIAIS INIBIDORES DE ENOIL-ACP-REDUTASE (FABI).

Ícaro F. Protti¹; Nicole F. Moreira²; Ygor F. G. da Costa³; Giovana G. Garcia²; Wesley G. de Moraes³; Maria S. Alves⁴; Vinicius G. Maltarollo⁵; Renata B. de Oliveira⁶.

1. Estudante da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR-UFMG)
2. Estudante da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)
3. Aluno do Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas (UFJF)
4. Professora da Faculdade de Farmácia - UFJF
5. Professor da Faculdade de Farmácia - UFMG/Coorientador
6. Professora da Faculdade de Farmácia-UFMG / Orientadora

Resumo

A resistência aos antibacterianos representa uma grave ameaça à saúde global tornando mandatória a busca por novos fármacos. *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* possuem uma via de síntese de ácidos graxos denominada FAS II. O AFN-1252 é um inibidor da enzima FabI, isoforma do complexo FAS II, que encontra-se em estudos clínicos com resultados promissores. No presente trabalho, foi proposta a síntese de análogos da AFN-1252 planejados a partir de estudos de modelagem molecular. Nesses estudos utilizou-se a estrutura da FabI de *S. aureus* cristalografada com a AFN-1252 e, avaliou-se as possíveis interações das moléculas propostas no sítio ativo da enzima. Dentre os compostos avaliados *in silico*, o derivado com substituinte isopropila ligado ao grupo amida foi escolhido como modelo para o delineamento das etapas de síntese. Os compostos sintetizados foram testados contra *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que cinco compostos foram ativos, com CIM de 125 a 500 µg/mL.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Resistência; FAS II

Apoio financeiro: PIBIC/CNPQ - Nº 800521/2018-8

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade Federal de Minas Gerais.

Introdução

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva oportunista que faz parte da microbiota humana sendo encontrada principalmente nas fossas nasais, porém pode ser patogênico se migrar para superfícies não íntegras do epitélio ou outras regiões da mucosa. O *S. aureus* apresenta alta resistência aos beta-lactâmicos e glicopeptídeos mesmo quando usados em associação (JUTKINA, et al., 2018). Dessa forma, a busca por alvos moleculares diferentes daqueles já conhecidos para os fármacos antibacterianos comumente utilizados na clínica, torna-se de grande relevância, pois abre a possibilidade de um novo mecanismo de ação, diminuindo, assim, as chances de resistência cruzada.

Uma alternativa para novos antibióticos é o estudo de novos mecanismos de ação como a inibição da via de síntese de ácidos graxos (BANIN, et al, 2017). Em seres humanos e nos fungos essa via é denominada FAS I (fatty acid synthase), sendo uma única proteína multifuncional capaz de regular todas as etapas da síntese de ácidos graxos. Bactérias da espécie *S. aureus* obtêm ácido graxo através da FAS II que é constituída de uma série de isoformas de uma proteína denominada como Fab. A isoforma FabI é uma enoil ACP-redutase responsável pela redução de instaurações formadas no processo de alongamento da cadeia dos ácidos graxos (SEEFELD, et al, 2003). A inibição da FabI resultaria na interrupção desse ciclo, levando a um déficit na produção de ácidos graxos e, conseqüentemente, acarretaria em danos à bactéria uma vez que são altamente dependentes de ácido graxos para funções vitais como formação da membrana celular (SCHIEBEL, et al, 2015).

A AFN-1252 é um candidato a fármaco em fase de estudos clínicos que é capaz de inibir a isoforma FabI (JACKSON, et al, 2018). Entretanto ainda é necessário compreender melhor o mecanismo de ação e a forma de ligação da molécula ao alvo molecular para que possam ser feitas otimizações a fim de produzir um novo fármaco eficaz e seguro para combater as bactérias resistentes aos antimicrobianos atuais. Neste contexto, objetivou-se no presente trabalho, com o auxílio da modelagem molecular, a síntese de análogos híbridos e análogos simplificados da AFN-1252 para avaliação da atividade antimicrobiana (KRONENBERGER, et al., 2017).

Metodologia

Para prever as interações intermoleculares de cinco derivados propostos e cinco análogos da AFN-1252 com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da FabI foi realizado um estudo de ancoragem molecular

utilizando o programa GOLD 5.6 (VERDONK et al., 2003). A estrutura tridimensional da FabI foi obtida por difração de raios-X e está disponível no site *Protein Data bank* (<https://www.rcsb.org/>) (BERMAN et al., 2002) sob o código de identificação 4FS3 (KAPLAN et al., 2012). A pose do ligante co-cristalizado (AFN-1252) foi comparada com o resultado experimental para validação do protocolo de ancoragem molecular (*redocking*). Nesse estudo foram geradas 100 poses (modo de ligação predito) utilizando o algoritmo genético, as quais foram ranqueadas de acordo com a função de pontuação GOLDScore (estima a afinidade do ligante pela proteína).

A análise com os derivados, variando-se apenas o substituinte R na estrutura da AFN-1252, teve como objetivo avaliar as interações do substituinte do grupo amida e, para isso, foram feitas variações alterando o volume e o comprimento do substituinte R. Para fins de comparação, os mesmos substituintes "R" foram considerados no grupo amida dos análogos híbridos propostos (Figura 1),

As substâncias a serem sintetizadas foram propostas utilizando a estratégia de hibridação molecular considerando a estrutura da AFN-1252 e da curcumina, ambos inibidores conhecidos da FabI (YAO, et al., 2010) (Figura 1A). O objetivo da síntese dos análogos foi validar os estudos de modelagem molecular e avaliar atividade teórica contra a enzima FabI. Em razão das dificuldades sintéticas para obtenção dos análogos híbridos, análogos da AFN-1252 planejados por simplificação molecular foram, também, sintetizados (Figura 1B).

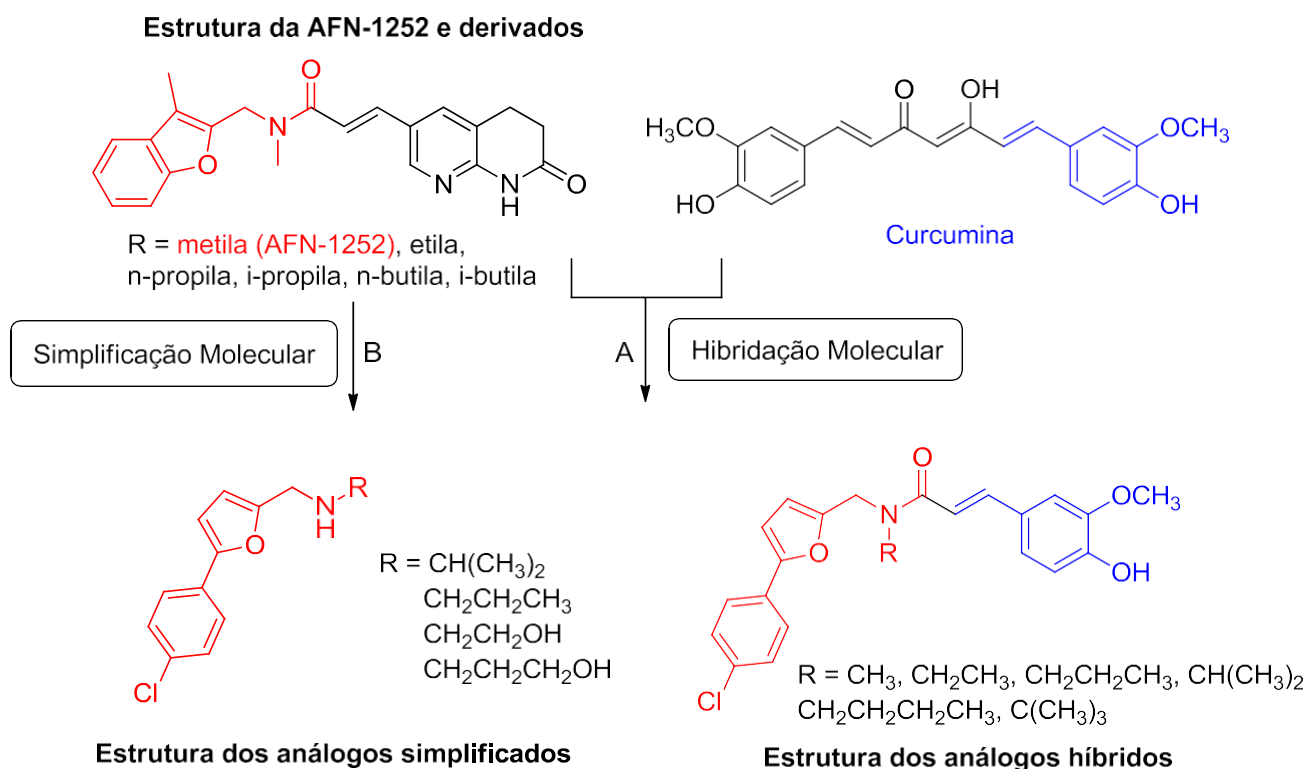


Figura 1: Estruturas químicas e estratégias utilizadas no planejamento das moléculas. A) Hibridação Molecular e estruturas químicas dos análogos híbridos; B) Simplificação molecular e estrutura química dos análogos simplificados.

A atividade antibacteriana dos análogos simplificados **3-5** e do intermediário de síntese **1** (Figura 3) foi avaliada contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os fármacos cloranfenicol, ampicilina e levofloxacino foram utilizados como controle positivo. Os compostos que apresentaram atividade a 500 µg/mL tiveram a sua concentração mínima inibitória (MIC) determinada.

Resultados e Discussão

Nos estudos de ancoragem molecular, o resultado obtido pela análise de *redocking* apresentou grande semelhança entre a pose calculada e a estrutura experimental co-cristalizada validando o protocolo utilizado. Observou-se que substituintes mais volumosos ligados ao grupo amida prejudicam a interação das moléculas com resíduos de aminoácidos considerados importantes para a ação inibitória, como alanina-97 e tirosina-157 e o cofator NADH. Isso ocorreu devido ao deslocamento da estrutura para fora do sítio ativo. Os análogos foram propostos utilizando a estrutura do híbrido entre a curcumina e um arilfurano (Figura 1A). Na simulação, nenhum dos análogos híbridos da AFN-1252, nem os derivados i-propila, n-butila e i-butila realizou as três interações desejadas simultaneamente em razão de um deslocamento para fora do sítio ou devido à inversão da posição de ligação esperada. Por outro lado, os derivados contendo os grupos menos volumosos como etila e n-propila realizaram todas as interações, sugerindo que substituintes volumosos ligados à amida são prejudiciais para a atividade biológica. O análogo híbrido contendo o substituinte i-propila foi o mais promissor,

pois mesmo não realizando todas as interações de interesse apresentou disposição espacial semelhante à AFN-1252 servindo como delineamento para síntese (**Figura 2**).

Com a estrutura cristalográfica da enzima FabI complexada com seu inibidor foi possível constatar a limitação espacial existente na cavidade de inserção do nitrogênio terciário. Foi utilizada na simulação a estrutura da AFN1-252 para ter um parâmetro de confiabilidade das predições realizadas.

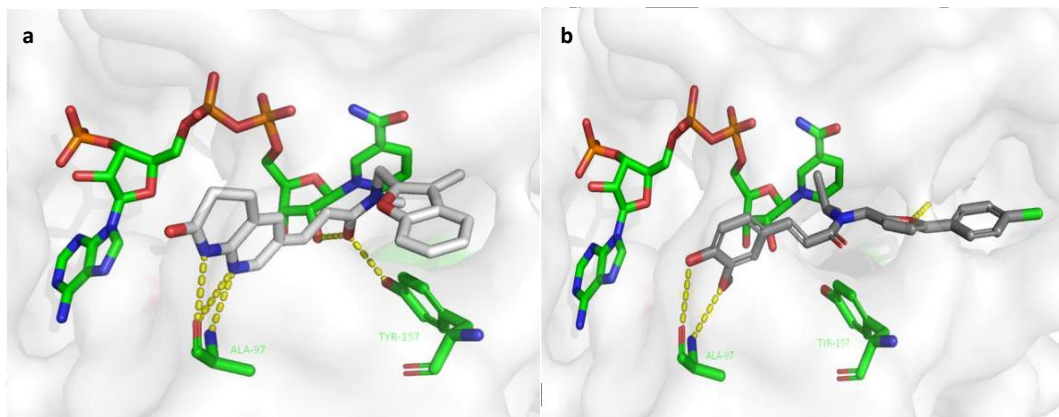


Figura 2: Representação do estudo de modelagem. a) FabI co-cristalizada com inibidor AFN12-52; b) Docking do substituinte com análogo R = i-propila

Em razão da dificuldade sintética, a síntese total dos análogos híbridos planejados ainda não foi finalizada. Entretanto, os intermediários de síntese, identificados como análogos simplificados, foram obtidos com sucesso (**Figura 3**) e tiveram sua atividade antibacteriana avaliada.

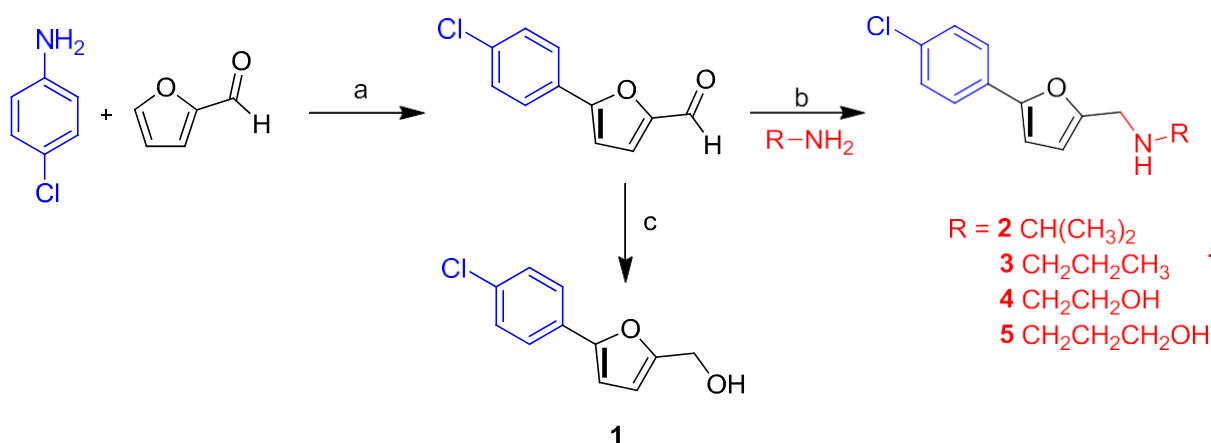


Figura 3: Esquema geral de síntese dos análogos simplificados: a) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}/\text{NaNO}_2, \text{H}_2\text{O}$ (45% de rendimento); b) 1ª etapa: amina correspondente (RNH_2), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaSO}_4$; 2ª etapa: $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ (55 a 67% de rendimento); c) $\text{NaBH}_4/\text{MetOH}$ (62% de rendimento).

Os resultados dos testes biológicos mostraram que dos cinco compostos testados todos foram ativos frente a *S. aureus* (**1**, **4** e **5** com CIM de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **2** e **3** com CIM de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), três mostraram atividade frente a *P. aeruginosa* (**2**, **4** e **5** com CIM de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e quatro foram ativos contra *E. coli* (**2** com CIM de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **1**, **4** e **5** com CIM de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As três espécies de bactérias utilizadas nos ensaios possuem a isoforma FabI (*S. aureus* e *E. coli*) ou isoforma correspondente do complexo FASII (*P. aeruginosa*), o que pode ser um indício de que os compostos estejam atuando como inibidores dessas enzimas. Entretanto é necessário realizar estudos adicionais para confirmação dessa hipótese.

Conclusões

Com a utilização da estratégia de simplificação molecular foi possível sintetizar análogos da AFN1252 apresentando atividade frente a microrganismos que possuem FabI, como potenciais inibidores dessa enzima. Estudos de ancoragem molecular utilizando os compostos simplificados, planejados posteriormente, serão realizados futuramente para avaliar a afinidade de encaixe no sítio ativo da enzima FabI. uma vez que apresentam parte da estrutura originalmente planejada para ação inibitória.

Os resultados desse projeto estimula o planejamento de novos análogos para estabelecer uma relação

estrutura-atividade e otimização da atividade antibacteriana, assim como o estudo dos mecanismos envolvidos. Agradecemos as agências de fomento do laboratório, CNPq e FAPEMIG e ao grupo OpenEye Scientific pela licença dos *software* de modelagem molecular.

Referências bibliográficas

BANIN, Ehud; HUGHES, Diarmaid; KUIPERS, Oscar P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 450-452, 2017.

BERMAN, Helen M. et al. Biological Crystallography The Protein Data Bank. **Acta Crystallographica**, [s. l.], v. 58, p. 899–907, 2002.

JACKSON, Nicole; CZAPLEWSKI, Lloyd; PIDDOCK, Laura JV. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1452-1459, 2018.

JUTKINA, J. et al. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. **Science of the total Environment**, v. 616, p. 172-178, 2018.

KAPLAN, Nachum et al. Mode of action, in vitro activity, and *in vivo* efficacy of AFN-1252, a selective antistaphylococcal FabI inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5865-5874, 2012.

KRONENBERGER, Thales et al. Studies of *Staphylococcus aureus* FabI inhibitors: fragment-based approach based on holographic structure–activity relationship analyses. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 135-151, 2017.

SCHIEBEL, Johannes et al. An ordered water channel in *Staphylococcus aureus* FabI: unraveling the mechanism of substrate recognition and reduction. **Biochemistry**, v. 54, n. 10, p. 1943-1955, 2015.

SEEFELD, Mark A. et al. Indole naphthyridinones as inhibitors of bacterial enoyl-ACP reductases FabI and FabK. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 1627-1635, 2003.

VERDONK, Marcel L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 609–623, 2003.

YAO, Jingjing et al. Novel enoyl-ACP reductase (FabI) potential inhibitors of *Escherichia coli* from Chinese medicine monomers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 56-59, 2010.