

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da
Saúde

RENATA BOLDIN

**OTIMIZAÇÃO, ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E
FARMACODINÂMICA *IN SILICO* E EXPERIMENTAL DE
UM NOVO PEPTÍDEO INIBIDOR DE BETA-SECRETASE-1
PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Bragança Paulista
2023

RENATA BOLDIN - RA: 202127431

**OTIMIZAÇÃO, ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E
FARMACODINÂMICA *IN SILICO* E EXPERIMENTAL DE
UM NOVO PEPTÍDEO INIBIDOR DE BETA-SECRETASE-1
PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani

Bragança Paulista
2023

WT 155 Boldin, Renata
B672o Otimização, análise farmacocinética e farmacodinâmica in
sílico e experimental de um novo peptídeo inibidor de beta-
secretase-1 para o tratamento da doença de Alzheimer /
Renata Boldin. – Bragança Paulista, 2023.
43 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.
Orientação de: Juliana Mozer Sciani.

1. Doença de Alzheimer. 2. Peptídeos. 3. Animais
Marinhos. 4. Farmacodinâmica. 5. Farmacocinética. I. Sciani,
Juliana Mozer. II. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF
Ficha catalográfica elaborada por: Camila de Moraes Cruz / CRB-8/10665

FOLHA DE APROVAÇÃO E ASSINATURA DA BANCA



Educando
para a paz

BOLDIN, Renata. "Otimização, análise farmacocinética e farmacodinâmica in silico e experimental de um novo peptídeo inibidor de beta-secretase-1 para o tratamento da doença de Alzheimer". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 28 de junho de 2023 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Catarina Raposo Dias Carneiro
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

Ao meu amado marido Paulo, por todo amor, companheirismo e apoio incondicional.

Ao meu filho Pedro, meu grande amor, pelo carinho, paciência e pela alegria que me traz todos os dias.

Aos meus pais, João e Diná, pelo constante incentivo e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À professora Juliana, pela orientação, dedicação, apoio e por todo conhecimento compartilhado.

À UNIFAG pelo fornecimento de equipamentos e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe da etapa analítica de bioequivalência da UNIFAG, pela compreensão e apoio, em especial à Amanda, Bruna e Karine, que sempre estiveram prontas a me ajudar.

Ao meu marido Paulo, meu guia, e ao meu filho Pedro, meu príncipe, que sempre me incentivaram nos momentos difíceis e por todo amor, carinho e compreensão demonstrado todos os dias. Sem vocês nada disso teria sentido na minha vida.

Aos meus pais, à minha irmã e à minha sobrinha Sara, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e me apoiando em todos os momentos.

Agradeço ao fomento obtido pela FAPESP em forma de auxílio regular do orientador, para a execução da pesquisa.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é a 7^a causa de morte no mundo, sem cura até o momento, sendo o principal tratamento clínico disponível baseado em anticolinesterásicos, que somente aumenta a expectativa de vida do paciente. Acredita-se que a atividade de β e γ -secretases sobre a proteína APP (peptídeo precursor da placa amiloide) gera peptídeos β -amiloides ($A\beta$) que se agregam e acumulam em regiões do cérebro, causando disfunção mitocondrial, lisossomal, inflamação e apoptose. Inibidores de β -secretases têm sido estudados como alternativa ao tratamento, na tentativa de inibir a formação de peptídeos amiloides causadores da DA. No entanto, muitos inibidores estudados têm demonstrado alta toxicidade ou falta de eficácia. Apesar disso, ainda são consideradas bons alvos terapêuticos e continuam em estudo para um possível tratamento para a DA. Para a obtenção de novas entidades moleculares, a biodiversidade brasileira representa uma excelente alternativa, em particular o ambiente marinho, que é pouco explorado do ponto de vista molecular, e já forneceu muitas moléculas que hoje são comercializadas para o tratamento de dor, câncer e infecções virais. Nesse sentido, venenos animais são misturas ricas em peptídeos, que são moléculas altamente seletivas e potentes, ideais para medicamentos, pouco exploradas pela indústria farmacêutica. Neste trabalho, um novo peptídeo inibidor de beta-secretase foi desenhado a partir de peptídeos identificados previamente pelo grupo e na literatura, com o auxílio de ferramentas *in silico* (ancoragem molecular, ADME - absorção, distribuição, metabolismo e excreção - e toxicidade). O peptídeo foi sintetizado e testado em modelo de cinética enzimática, utilizando a β -secretase comercial e substrato sintético específico. Para avaliação da farmacocinética, o peptídeo foi administrado em camundongos e o sangue e órgãos foram coletados em diferentes tempos para determinação de parâmetros cinéticos e biodistribuição, por espectrometria de massas, e avaliação histológica. O peptídeo ainda foi incubado em cultura de neurônios SH-SY5Y diferenciados para avaliação da redução da geração de $A\beta$ *in vitro*. Foi visto que o peptídeo foi posicionado no sítio ativo da β -secretase, com distâncias curtas entre os aminoácidos adjacentes à díade catalítica, caracterizando uma inibição. Experimentalmente, foi visto que o peptídeo foi capaz de inibir competitivamente a enzima, com baixo valor de K_i . No plasma, foi possível verificar uma curva plasmática típica de uma injeção intravenosa, com decaimento até o ponto máximo analisado, de 24 horas. Além disso, o peptídeo foi encontrado no pulmão, baço, fígado e rins, com perfil de eliminação diferente, porém sem demonstrar acúmulo em nenhum dos órgãos, evidenciado por análises histológicas, que não demonstraram qualquer sinal de inflamação, necrose ou alteração morfológica. O peptídeo também foi encontrado no cérebro 6 horas após a injeção, mostrando a sua capacidade de permear a barreira hematoencefálica. Quando incubado em neurônios com produção de $A\beta$ induzida por H_2O_2 , o peptídeo foi capaz de diminuir a produção de peptídeos amiloides. Dessa forma, foi obtido um peptídeo inédito, passível de ser sintetizado, inibidor competitivo de β -secretase, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sem causar sinais de toxicidade sistêmica, o que representa uma possibilidade de tratamento para a Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Novos peptídeos. Animais marinhos. Farmacodinâmica. Farmacocinética.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the 7th leading cause of death in the world, with no cure so far, and the main clinical treatment available is based on anticholinesterase agents, which only increase the patient's life expectancy. It is believed that the activity of β and γ -secretases on the APP protein (amyloid plaque precursor peptide) generates β -amyloid ($A\beta$) peptides that aggregate and accumulate in brain regions, causing mitochondrial and lysosomal dysfunction, inflammation and apoptosis. β -secretase inhibitors have been studied as an alternative to treatment, in an attempt to inhibit the formation of amyloid peptides that cause AD. However, many studied inhibitors have demonstrated high toxicity or lack of efficacy. Despite this, they are still considered good therapeutic targets and are still under study for a possible treatment for AD. For obtaining new molecular entities, Brazilian biodiversity represents an excellent alternative, in particular the marine environment, which is little explored from a molecular point of view, and has already provided many molecules that are commercialized today for the treatment of pain, cancer and infections. In this sense, animal venoms are mixtures rich in peptides, which are highly selective and potent molecules, ideal for medicines, little explored by the pharmaceutical industry. In this work, a new beta-secretase inhibitor peptide was designed from peptides previously identified by the group and in the literature, with the aid of *in silico* tools (molecular anchorage, ADME - absorption, distribution, metabolism and excretion - and toxicity). The peptide was synthesized and tested in an enzymatic kinetics model, using commercial β -secretase and specific synthetic substrate. To evaluate the pharmacokinetics, the peptide was administered in mice and the blood and organs were collected at different times for determination of kinetic parameters and biodistribution, by mass spectrometry, and histological evaluation. The peptide was further incubated in culture of differentiated SH-SY5Y neurons to assess the reduction in $A\beta$ generation *in vitro*. It was seen that the peptide was positioned in the active site of β -secretase, with short distances between amino acids adjacent to the catalytic dyad, characterizing an inhibition. Experimentally, it was seen that the peptide was able to competitively inhibit the enzyme, with low K_i value. In the plasma, it was possible to verify a plasmatic curve typical of an intravenous injection, with a decay up to the maximum analyzed point, of 24 hours. In addition, the peptide was found in the lung, spleen, liver and kidneys, with a different elimination profile, but without demonstrating accumulation in any of the organs, evidenced by histological analyzes, which did not show any signs of inflammation, necrosis or morphological alteration. The peptide was also found in the brain 6 hours after injection, showing its ability to permeate the blood-brain barrier. When incubated in neurons with H_2O_2 -induced $A\beta$ production, the peptide was able to decrease the production of amyloid peptides. In this way, an unprecedented peptide was obtained, capable of being synthesized, a competitive inhibitor of β -secretase, capable of crossing the blood-brain barrier, without causing signs of systemic toxicity, which represents a possibility of treatment for Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease. New peptides. Marine animals. Pharmacodynamics. Pharmacokinetics.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

aa: aminoácidos

A β : peptídeo beta amiloide

ADME: absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APP (Amyloid precursor protein): proteína precursora do peptídeo β -amiloide
ASC: área sob a curva de concentração

ASC_{0-t}: área sob a curva de concentração ao tempo t, onde t é o tempo relativo à última concentração do analito determinada experimentalmente.

ASC_{0-inf}: área sob a curva de concentração do tempo zero ao infinito

BBB: (*brain-blood barrier*) barreira hematoencefálica

BACE 1 (β -site APP cleaving enzyme 1): β -secretase 1

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

C_{max}: concentração máxima

C_{min}: concentração mínima

C_t: última concentração do analito determinada experimentalmente

DA: Doença de Alzheimer

Da: dalton

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ES: *eletrospray*

EC 50: concentração que causa 50% do efeito farmacológico

E_{max}: efeito máximo

KV: kilovolt

L: litros

LIQ: limite inferior de quantificação

FA (Formic Acid): ácido fórmico

FDA: Food and Drug administrator

g: grama

GRAVY (Grand average of hydropathicity index): Grande media do índice de hidropaticidade h: hora

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IAA: iodoacetamida

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: 10^{-6} mol.L⁻¹

mL: mililitro

mM: 10^{-3} mol.L⁻¹

MS: espectrometria de massas

m/z: massa sobre carga

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS (phosphate-buffered saline): tampão fosfato-salina

PDB (Protein DataBank): banco de dados de proteínas

pH: potencial hidrogeniônico

pI: ponto isoelétrico

PK/PD: farmacocinético/farmacodinâmico

r: coeficiente de correlação linear

RE: resolução

RMSD (Root Mean Square deviation): valor médio para o desvio médio dos átomos de uma estrutura X, relativamente a uma segunda estrutura Y

SPE: extração em fase sólida

Tmax: tempo máximo

V: volt

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 1 - Via não-amiloidogênica e amiloidogênica para a geração de peptídeos amiloides a partir de enzimas secretases.....	14
Figura 2 - Perfil de concentração plasmática versus tempo.	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Doença de Alzheimer	12
1.2 Animais como fonte de peptídeos bioativos	15
1.3 Fármacos peptídicos	17
1.4 Farmacocinética e Farmacodinâmica	18
1.5 Ferramentas in silico para descoberta de novas moléculas e alvos terapêuticos.....	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	26
4. CAPÍTULO 1	27
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência caracterizada principalmente por perda de memória e déficit cognitivo, em que alterações microscópicas no cérebro começam a acontecer muito antes do primeiro sintoma da doença, que progride até alcançar diversas áreas do cérebro. O cérebro tem cerca de 100 bilhões de células nervosas, conectadas por meio de sinapses, formando redes de comunicação. Em pacientes com DA, essas células se tornam comprometidas, e à medida que o dano se espalha, perdem a conexão e a capacidade de realizar seu trabalho e, eventualmente, morrem, o que leva a mudanças irreversíveis no cérebro (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023).

A DA é responsável por 60-70% dos casos de demência, sendo que a maioria das pessoas com a doença tem 65 anos ou mais. Trata-se de uma doença progressiva, em que os sintomas pioram ao longo dos anos: em estágios iniciais a perda de memória é leve, mas com o avanço da doença, as pessoas perdem a capacidade de manter uma conversa ou realizar tarefas rotineiras (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente, mais de 55 milhões de pessoas vivem com demência em todo o mundo e surgem quase 10 milhões de novos casos a cada ano. Em 2015 o número de casos era de 46,8 milhões de pessoas com DA. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). A expectativa é que em 2050 o número de casos seja cerca de 131,5 milhões (ALZHEIMER'S DISEASE, 2018).

Atualmente, apenas 2 grupos farmacológicos estão aprovados para o tratamento da DA: os inibidores da acetilcolinesterase, que são utilizados na fase inicial da doença e os antagonistas do receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato utilizados no estágio moderado da doença. No mercado estão disponíveis medicamentos licenciados pela ANVISA para o tratamento da DA: tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina e memantina. No entanto, esses medicamentos somente aumentam a expectativa de vida do paciente em alguns anos, não representando uma cura para a doença (JU; TAM, 2022).

Recentemente um anticorpo monoclonal foi aprovado pelo FDA para o tratamento da DA, pois demonstrou ser eficaz na remoção de placas amiloides, no entanto vários

efeitos adversos foram relatados, como dor de cabeça, confusão, tontura, alteração na visão e náuseas (SHI et al, 2022).

As características patológicas da doença incluem a formação e acúmulo de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares, gliose e perda neuronal, acompanhada por amiloidose cerebrovascular, inflamação e modificações sinápticas, como por receptores NMDA e receptores nicotínicos de acetilcolina (GUO et al., 2020).

Para a formação da placa amiloide, a teoria mais aceita é que ocorre a partir da clivagem endoproteolítica de uma glicoproteína transmembrana, a APP (proteína precursora de β amiloide), processada próxima à membrana celular na porção C terminal da proteína por secretases. Essa proteína pode ser processada pela via não-amiloidogênica, gerando peptídeos com ação neuroprotetora, e pela via amiloidogênica, gerando peptídeos tóxicos que causam a DA (WAKABAYASHI; STROOPER, 2008).

Na via não-amiloidogênica, a α -secretase faz um primeiro processamento na APP, gerando o α -CTF, que é clivado pela γ -secretase para gerar o p3. Na via amiloidogênica a APP sofre ação da β -secretase, gerando o β -CTF, que irá sofrer ação da γ -secretase para a geração do peptídeo β amiloides 40 ou 42 ($A\beta$). A Figura 1 mostra esse processamento e parte da sequência da APP, para evidenciar os pontos de clivagem das secretases para formação do $A\beta$.

Esses peptídeos $A\beta$ 40 e 42 são de natureza hidrofóbica e se oligomerizam na presença de um ambiente aquoso, o cerebral. Desta forma, eles são insolúveis e se agregam, conhecidos como placas amiloides, e se acumulam em regiões extracelulares específicas do cérebro, dentro ou fora das células e causam a DA (HARDY; SELKOE, 2002).

A presença das placas amiloides causa a morte neuronal em regiões específicas do cérebro, como o hipocampo (e conseqüentemente perda de contato sináptico), além de inflamação crônica e dano oxidativo (HARDY; SELKOE, 2002).

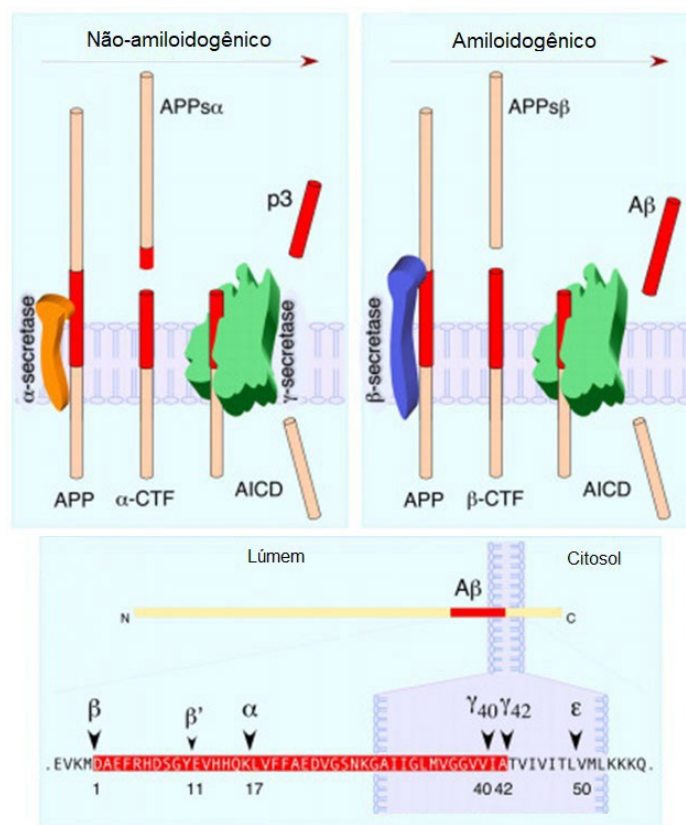


Figura 1 – Via não-amiloidogênica e amiloidogênica para a geração de peptídeos amiloides a partir de enzimas secretases. Fonte: figura adaptada de Tinakaran & Koo.

Devido ao tamanho dos produtos agregados, a eliminação pela célula por meio do sistema de ubiquitina-proteassomo é inviável, uma vez que os produtos não são capazes de atingir o sítio catalítico do complexo e poder ser processado (DOMENICO; TRAMUTOLA; PERLUIGI, 2016). O outro sistema de eliminação, o sistema autofagia lisossomal, que remove proteínas indesejáveis por clivagem por enzimas proteolíticas lisossomais (catepsinas), está disfuncional nos pacientes com DA (STOK; TURK; TURK, 2016; BENES; VETVICKA, MARTIN, 2008).

Uma alternativa ao tratamento, portanto, é a inibição das enzimas secretases, que geram os peptídeos amiloides. A principal delas, responsável pela liberação da porção N-terminal do peptídeo é a β-secretase, conhecida como BACE-1 (*β-site APP cleaving enzyme 1*).

A BACE-1 é uma peptidase do tipo aspártico peptidase transmembrana do tipo 1,

pertencente à família das pepsinas. A enzima contém dois resíduos ácido aspártico no seu sítio ativo (Asp32 e Asp228) (RAWLINGS et al., 2018). Nesse primeiro processamento pela BACE-1 é gerado um fragmento de 99 aminoácidos a partir do processamento da APP, e após isso, uma outra enzima, a γ -secretase faz um novo processamento para a liberação do peptídeo amiloide. Essa última clivagem ocorre de forma inespecífica, podendo ser gerado um peptídeo de 40 ou de 42 aminoácidos (A β 40 e A β 42), tóxicos para os neurônios (MURPHY; LEVINE, 2010).

1.2 Animais como fonte de peptídeos bioativos

Devido à dificuldade da indústria em encontrar novas estruturas químicas derivadas dos modelos de *design* racional de moléculas e da química combinatória, recentemente houve o aparecimento dos medicamentos biológicos – proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais. Os anticorpos já disponíveis no mercado foram muito bem-sucedidos no tratamento de diversas doenças. No entanto, são medicamentos de alto custo de produção (e conseqüentemente venda), acessíveis para uma parcela restrita da população (MORROW; FELCONE, 2004).

Por outro lado, os produtos naturais têm sido utilizados há anos para o tratamento de diversas doenças. Os primeiros manuscritos do uso do conhecimento tradicional a partir de plantas e animais foram relatados na China há mais de 5000 anos. O uso de produtos por povos egípcios, indianos e gregos também foi relatado, com contribuições de produtos usados até hoje, como exemplos temos a babosa utilizada como hidratante, o cannabis utilizado como antiemético e a aspirina que foi isolada da *Salix alba* utilizada como analgésico. Nos anos 200, misturas complexas de plantas começaram a ser elaboradas, como desenvolvimento de fórmulas galênicas e início de um controle de qualidade. Em meados de 1800, extração de ingredientes ativos de plantas passou a ser realizado, em que o primeiro alcaloide foi isolado a partir do ópio, dando origem à conhecida morfina, utilizada hoje para o tratamento de dor crônica (JI; LI; ZANG, 2009).

A partir daí muitos princípios ativos foram isolados e identificados, não só de plantas, mas como também de animais, e medicamentos sintéticos desenvolvidos para o tratamento de várias doenças. Um exemplo é o captopril, medicamento utilizado para hipertensão que foi desenvolvido a partir de um peptídeo isolado da peçonha da serpente

Bothrops jararaca. (CUSHMAN; ONDETTI, 1991)

O ambiente marinho contém uma alta diversidade de animais que sintetizam uma grande variedade de moléculas para defesa química contra predadores, microrganismos e digestão da presa. Esses compostos são pouco conhecidos do ponto de vista bioquímico e podem representar novas estruturas funcionais, que podem atingir alvos terapêuticos relevantes (HENDLER et al., 1995).

Várias moléculas de origem marinha estão em fases avançadas de desenvolvimento para inúmeras doenças, como câncer, infecções virais, dor, inflamação e doenças neurológicas, por exemplo, o mesilato de eribulina extraída de esponjas marinhas, com capacidade anticancerígena que encontra-se em estudo de fase II (MALVE, 2016).

Alguns medicamentos hoje utilizados na clínica são de origem marinha. Um exemplo é o peptídeo ziconotídeo ou ω -conotoxina MVIIA (Prialt®). Trata-se de um peptídeo de 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magnus* e utilizado como analgésico para o controle da dor severa, incluindo para aqueles pacientes refratários a tratamentos com opioides, uma vez que é 50 vezes mais forte que morfina e não causa dependência (OLIVEIRA, et al., 1987).

Sendo assim, esse ambiente pouco explorado representa uma excelente oportunidade para a obtenção de novas estruturas moleculares. De 2001 a 2006, cerca de 5000 moléculas isoladas de produtos marinhos foram publicadas, o que reforça esse potencial. (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009)

Há anos nosso grupo vem estudando moléculas provenientes de animais marinhos para entender o papel desses compostos na defesa química do animal, bem como obter moléculas com efeitos terapêuticos relevantes. Nesse sentido, o trabalho de Banagouro et al. (2022) mostrou que a secreção metanólica de *Macrorhynchia philippina* possui diversos compostos de baixa massa molecular, bem como 19 peptídeos, alguns deles inibidores de BACE-1, avaliados por técnicas *in silico*.

Baseado nesse trabalho e outros peptídeos descritos na literatura, desenhamos novos peptídeos inibidores de BACE-1 para otimização e obtenção de novos produtos que podem ser utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer.

1.3 Fármacos peptídicos

Peptídeos são biomoléculas que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Comparados às proteínas, são quimicamente mais versáteis, pois podem conter funções amidas ou ésteres em suas carboxilas terminais, grupos acilas em seus grupos amino terminais, grupos fosfatos ou sulfatos em um ou mais resíduos (serina, treonina ou tirosina). Podem ser lineares, semicíclicos (geralmente via uma ou mais ligações dissulfeto intra- ou intercadeias peptídicas) ou cíclicos (via ligação entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos terminais) (GUTTE, 1995).

As duas classes principais de medicamentos comercializados atualmente, que são as pequenas moléculas (<500 Da) e os medicamentos biológicos (>5000 Da) estão separados por uma lacuna de peso molecular significativa (DAVID et al., 2013)

Os peptídeos, portanto, preenchem essa lacuna de moléculas de interesse farmacêutico, com as vantagens que as duas classes apresentam: a especificidade que as proteínas têm em seus alvos moleculares e, ao mesmo tempo, a estabilidade e a boa disponibilidade demonstradas pelas moléculas de massas moleculares baixas (CRAIK et al., 2013).

Por essas razões, mais de 100 medicamentos baseados em peptídeos já foram desenvolvidos e comercializados. Os mais conhecidos são oxitocina (8 aa, parto), calcitonina (32 aa, hipercalcemia, osteoporose), teriparatida (34 aa, análogo de hormônio da paratireoide, osteoporose), enfuvirtida (36 aa, antiretroviral), hormônio liberador de corticotrofina (41 aa), hormônio liberador de hormônio do crescimento (44 aa, lipodistrofia) (DANHO et al., 2009).

Venenos animais são fontes ricas em biomoléculas, incluindo peptídeos, que já ofereceram seus esqueletos carbônicos como protótipo de medicamentos atualmente disponíveis comercialmente (CRAIK et al., 2013).

O captopril é um exemplo desse tipo de medicamento, uma vez que a descoberta e parte do desenvolvimento feito no Brasil ocorreu a partir da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. Esse princípio ativo é um derivado de 3 aminoácidos utilizado no tratamento da hipertensão por ser inibidor da enzima conversora de angiotensina (CUSHMAN; ONDETTI, 1991).

1.4 Farmacocinética e Farmacodinâmica

Em 1937 Teorell publicou dois artigos científicos com o mesmo título “Cinética de distribuição de substâncias administradas ao corpo”. Depois de 30 anos, suas publicações foram consideradas como as mais importantes contribuições para a pesquisa de fármacos e isso o fez ficar conhecido como o pai da Farmacocinética (PAALZOW, 1995).

A farmacocinética refere-se a como o corpo processa e elimina um fármaco após a administração e é definida como o estudo da quantidade e taxa de velocidade de reação do fármaco no organismo (DIPIRO, 2010).

A descoberta de que a concentração plasmática de um fármaco tem relação com seu efeito farmacológico e que mudanças nessas concentrações são um reflexo do que ocorre no organismo, ou seja, uma medida indireta da concentração de um ativo no sítio de ação, fez com que a farmacocinética se desenvolvesse (STORPIRTIS et al., 2011).

Entretanto, o grande avanço nos estudos farmacocinéticos ocorreu a partir do momento em que técnicas analíticas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram desenvolvidas e ficaram cada vez mais sensíveis e seletivas para a quantificação dos ativos (STORPIRTIS et al., 2011).

Com a melhora na quantificação tornou-se possível realizar um perfil de concentrações em função do tempo, o qual pode ser plasmático ou obtido de outro fluido biológico, como sangue, urina ou saliva (DIPIRO, 2010).

Dessa maneira, os parâmetros farmacocinéticos podem ser obtidos das curvas de concentrações plasmáticas versus o tempo. Para cada fármaco é estabelecido uma janela terapêutica, onde se espera obter o máximo efeito terapêutico com o mínimo de efeitos adversos (STORPIRTIS et al., 2011).

Na Figura 2 é possível observar o perfil de concentração plasmática versus o tempo obtido através dos processos de absorção, distribuição, excreção e metabolismo, após a administração de um fármaco no organismo.

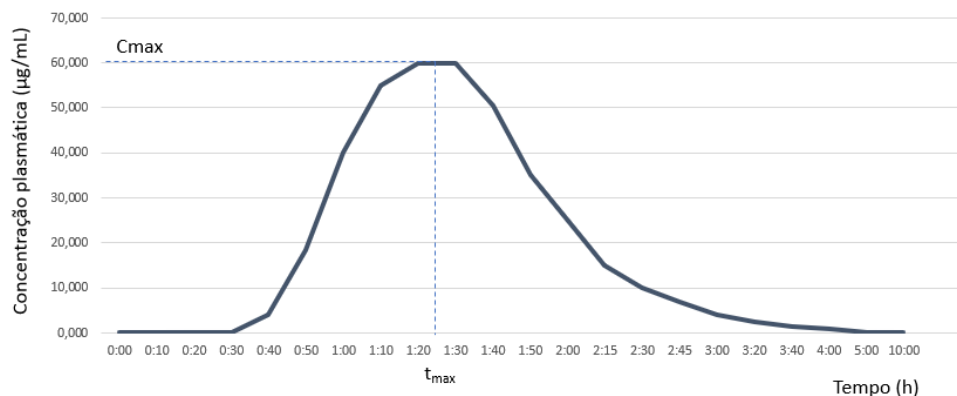


Figura 2 - Perfil de concentração plasmática versus tempo. Fonte: autoria própria.

Embora sejam moléculas grandes e complexas formadas pela ligação de vários aminoácidos, os peptídeos apresentam o mesmo processo farmacocinético quando utilizados como medicamentos.

Após a administração, os peptídeos podem ser absorvidos por várias vias, incluindo oral, nasal, sublingual, intravenosa, intramuscular, entre outras. A absorção de peptídeos pode ser afetada por vários fatores, como solubilidade, estabilidade, tamanho molecular e presença de transportadores.

Uma vez absorvidos, os peptídeos podem ser distribuídos por todo o corpo através da corrente sanguínea e podem se ligar às proteínas plasmáticas. Os peptídeos também podem ser metabolizados por várias enzimas no fígado, rins e outros órgãos e podem ser eliminados na urina ou nas fezes.

A meia-vida dos peptídeos no corpo pode variar amplamente dependendo de vários fatores, como a estrutura do peptídeo e a via de administração. Alguns peptídeos podem ser rapidamente eliminados, enquanto outros podem ter uma meia-vida mais longa.

A farmacocinética de peptídeos é um campo complexo e variado que depende dos fatores discutidos acima. Portanto, é importante levar esses fatores em consideração ao projetar e administrar peptídeos como agentes terapêuticos (NAZNEEN et al., 2018).

De acordo com a resolução RE 1170 de 19 de abril de 2006 da ANVISA, (BRASIL 2006) alguns parâmetros estatísticos também são determinados após a obtenção da curva de concentrações plasmáticas. Tais parâmetros são:

- Área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo calculada pelo método dos trapézoides, do tempo zero ao tempo t ($ASC0-t$), onde t é o tempo relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação);

- Área sob a curva de concentração sanguínea versus tempo calculada do tempo zero ao tempo infinito ($ASC0-inf$), onde $ASC0-inf = ASC0-t + Ct/k$, onde Ct é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação) e k é a constante de eliminação da fase terminal. A $ASC0-t$ deve ser igual ou superior a 80% da $ASC0-inf$, exceto nos casos em que se utiliza ASC truncada;

- O pico de concentração máxima (C_{max}) do fármaco e/ou metabólito e o tempo para atingir este pico (T_{max}) os quais devem ser obtidos diretamente, sem interpolação dos dados. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do fármaco e/ou metabólito também deve ser determinada, embora não haja necessidade de tratamento estatístico;

Os seguintes parâmetros devem ser determinados para estudos que empregam doses múltiplas:

- $ASC0-t$ calculado no intervalo de dose (τ) no estado de equilíbrio;
- C_{max} e T_{max} , obtidos sem interpolação de dados;
- Concentração mínima do fármaco (C_{min}), determinada no final de cada intervalo de dose do estado de equilíbrio;
- Concentração média do fármaco no estado de equilíbrio ($C^* = ASC0-t / \tau$);
- Grau de flutuação no estado de equilíbrio (BRASIL 2006)

O termo 'farmacodinâmica' refere-se aos efeitos de um fármaco no organismo. Tipicamente, esses efeitos são descritos em termos quantitativos do fármaco sobre os alvos terapêuticos, que podem ser receptores, canais iônicos, moléculas transportadoras ou enzimas (RANG; DALE, 2004). No caso de enzimas, os fármacos geralmente são inibidores, que podem ser do tipo irreversível ou reversível, competitivo ou não-competitivo.

A velocidade máxima da reação, a constante de afinidade e a constante de inibição são parâmetros determinados experimentalmente e calculados para a obtenção de dados quantitativos de afinidade enzimática e potência do inibidor (VITOLLO, 2015).

A relação definida entre a dose administrada de um medicamento, as concentrações

obtidas em fluidos biológicos e tecidos corporais e a intensidade dos efeitos farmacológicos causados por essas concentrações são determinadas pelas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de um medicamento (DERENDORF; MEIBOHM, 1999).

A farmacocinética avalia a concentração de um fármaco em um fluido biológico (normalmente plasma) com o passar do tempo, enquanto a farmacodinâmica avalia a intensidade do efeito do fármaco em relação à sua concentração no fluido corporal, normalmente, no local da ação do fármaco (HOLFORD; SHEINER, 1982).

O modelo integrado de PK/PD (farmacocinético/farmacodinâmico) permite uma avaliação quantitativa da relação dose-exposição-resposta, ou seja, permite avaliar a concentração de um fármaco versus o tempo, após uma determinada dose e a intensidade da resposta em relação às concentrações plasmáticas do fármaco. Esse modelo permite avaliar a intensidade dos efeitos desejados e/ou indesejados da dosagem de um medicamento (MEIBOHM; DERENDORF, 1997).

A maioria dos medicamentos apresentam farmacocinética linear, mas a concentração e o efeito para a maioria dos fármacos apresentam uma relação não linear. (DERENDORF; MEIBOHM, 1999).

O modelo farmacodinâmico mais utilizado para fármacos reversíveis que dependem da concentração é o modelo Emax. Esse modelo é uma relação derivada empiricamente que relaciona o efeito (E) com a concentração (C), através da seguinte fórmula:

$$E = \frac{E_{\max} \times C}{EC_{50} + C}$$

onde Emax é o efeito máximo possível com o fármaco específico e EC 50 é a concentração que causa 50% de Emax, a metade do efeito máximo. Emax refere-se à atividade intrínseca de uma droga, EC 50 à sua potência.

1.5 Ferramentas *in silico* para descoberta de novas moléculas e alvos terapêuticos

As ferramentas *in silico* têm desempenhado um papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de novas moléculas em fármacos, oferecendo um método eficiente, econômico e acelerado para identificar compostos promissores. Por meio de algoritmos computacionais avançados, essas ferramentas permitem a realização de simulações e modelagens precisas, que auxiliam na compreensão das interações moleculares, propriedades físico-químicas e atividades biológicas. (LOUNNAS et al., 2013).

Ao combinar técnicas de modelagem molecular, docking virtual, triagem virtual e dinâmica molecular, as ferramentas *in silico* permitem a análise rápida e sistemática de um vasto número de estruturas químicas, otimizando a seleção de candidatos a fármacos e reduzindo o custo e o tempo associados aos métodos tradicionais de descoberta de moléculas (LOUNNAS et al., 2013).

Além disso, essas ferramentas são essenciais para a identificação de alvos terapêuticos, a predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, e até mesmo para o design racional de novos compostos com características desejadas. Assim, a utilização de ferramentas *in silico* impulsiona a pesquisa farmacêutica e química, permitindo avanços significativos na descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico e aplicações em diversas áreas científicas (LIPINSKI et al., 2001).

A técnica de ancoragem molecular (*molecular docking*) é delas. É amplamente utilizada na descoberta de alvos terapêuticos. Essa abordagem *in silico* desempenha um papel crucial ao investigar as interações entre uma molécula candidata (ligante) e uma macromolécula biológica-alvo (receptor). O objetivo é prever a conformação tridimensional e a energia de ligação entre o ligante e o receptor, fornecendo informações valiosas sobre a afinidade e a seletividade da interação (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Ao realizar a ancoragem molecular, são aplicados algoritmos e modelos de interação molecular para posicionar o ligante dentro do sítio ativo do receptor, considerando a complementaridade estrutural e as forças de interação. Essa técnica permite a exploração de uma vasta gama de compostos candidatos, poupando tempo e recursos que seriam necessários para a síntese e o ensaio de cada molécula experimentalmente. Além disso, a ancoragem molecular pode ser combinada com técnicas de dinâmica molecular e estudos de interação proteína-ligante, oferecendo insights sobre a estabilidade da interação ao

longo do tempo (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Embora a ancoragem molecular seja uma ferramenta poderosa, é importante reconhecer suas limitações. As previsões são baseadas em modelos e suposições, e podem ocorrer falsos positivos ou falsos negativos. Portanto, é crucial validar experimentalmente os resultados obtidos por meio da ancoragem molecular, por meio de ensaios bioquímicos e biológicos para confirmar a atividade e a afinidade do ligante (PINZI; RASTELLI, 2019).

Além da ancoragem molecular, existem outras ferramentas *in silico* que desempenham um papel importante na avaliação da farmacocinética e toxicidade de moléculas candidatas. Algumas dessas ferramentas incluem a (1) predição de propriedades físico-químicas, como solubilidade, lipofilicidade (logP), volume de distribuição, polaridade e estabilidade química. Elas são úteis para avaliar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de uma molécula no organismo; (2) predição de metabolismo: simulam as reações de metabolismo que uma molécula pode sofrer no organismo, fornecendo informações sobre possíveis produtos metabólicos e locais de metabolização; (3) predição de toxicidade: empregam modelos estatísticos e algoritmos para prever a toxicidade de uma molécula em relação a diferentes sistemas e órgãos. Isso inclui a previsão de toxicidade aguda, toxicidade crônica, genotoxicidade e outros efeitos adversos (LIPINSKI et al., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência caracterizada por perda de memória e déficit cognitivo. É comum em idosos e, devido ao aumento da expectativa de vida, o número de casos era de 46,8 milhões de pessoas com DA em 2015. A expectativa é que em 2050 o número de casos seja cerca de 131,5 milhões (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Atualmente, apenas 2 grupos farmacológicos estão aprovados para o tratamento da DA: os inibidores da acetilcolinesterase, que são utilizado na fase inicial da doença e os antagonistas do receptor glutamatérgico N-metil D-aspartato utilizados no estágio moderado da doença. No mercado estão disponíveis medicamentos licenciados pela ANVISA para o tratamento da DA: tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina e memantina. No entanto, esses medicamentos somente aumentam a expectativa de vida do paciente em alguns anos, não representando uma cura para a doença (JU; TAM, 2022). Sendo assim, medicamentos específicos e eficazes para a DA são necessários.

Recentemente tem-se buscado reduzir a formação de A β modificando a atividade das enzimas β e γ -secretases. De 4 medicamentos que atuam dessa forma e entraram em fase clínica, 3 foram descontinuados por causar toxicidade hepática, incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, efeitos adversos graves ou falta de eficácia clínica. Apesar de muitos estudos terem sido descontinuados, a inibição de β e γ -secretases tem resultado na efetiva redução da produção de placas amiloides, sendo considerada, portanto, uma boa estratégia terapêutica (HUNG; FU, 2017).

Tendo em vista esses estudos com inibidores de secretases, a busca de novos moduladores pode trazer alternativas para o tratamento dessa doença sem cura. Nesse sentido, moléculas provenientes de produtos naturais podem oferecer tais protótipos.

Peptídeos inibidores de BACE-1 foram descritos a partir de animais marinhos, como por exemplo, um peptídeo isolado do peixe marinho, o *Merluccius productus*, demonstrou atividade inibidora de BACE-1 (LEE et al., 2019). Baseado neste e em outros peptídeos identificados pelo nosso grupo de pesquisa, foi feita uma otimização para a obtenção de um composto de melhor atividade, com propriedades físico-químicas adequadas a um bom perfil farmacocinético, incluindo a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

A partir desses estudos, dois peptídeos foram criados. Um deles, mostrado aqui

nesta dissertação, consiste na remoção de um resíduo do peptídeo isolado de *Merluccius productus*, descrito em literatura, em que comprovamos uma melhoria da atividade inibidora de BACE-1 e estudamos a sua farmacocinética.

O outro peptídeo possui uma sequência de aminoácidos completamente inédita, desenhada a partir do peptídeo do *Merluccius productus* e de outros animais marinhos estudados pelo nosso grupo. Por conta da relevante atividade inventiva envolvida na obtenção nesse segundo peptídeo, um pedido de patente foi depositado e por isso os resultados não serão mostrados nesse documento.

3. OBJETIVO

Obter um novo peptídeo inibidor de beta-secretase-1 (BACE-1) a partir da otimização de peptídeos conhecidos provenientes de animais marinhos, e estabelecer seus perfis farmacocinéticos para o desenvolvimento de novos fármacos para a Doença de Alzheimer.

Objetivos específicos:

- Desenhar e obter um novo peptídeo a partir de sequências de animais marinhos descritas na literatura e estudadas pelo grupo, com base em ancoragem molecular e farmacocinética *in silico*;

- Testar o novo peptídeo sintético para verificar sua inibição da BACE-1 e a capacidade em reduzir a geração de peptídeos amiloides em células;

- Estabelecer o perfil farmacocinético do peptídeo nos plasma de camundongos por meio da técnica de espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência.

- Analisar os órgãos dos camundongos tratados com o peptídeo para verificar possível toxicidade capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

4. CAPÍTULO 1:

Este capítulo traz o artigo publicado na revista *Frontiers in Pharmacology*, contendo os resultados do trabalho desenvolvido durante o mestrado.

Design, in silico and pharmacological evaluation of a peptide inhibitor of BACE-1



OPEN ACCESS

EDITED BY

Jian Jing,
Nanjing University, China

REVIEWED BY

Duamene Nyimamu,
University of Kansas Medical Center,
United States

Isabella Alvim Guedes,
National Laboratory for Scientific
Computing (LNCC), Brazil

*CORRESPONDENCE

Juliana Mozer Sciani,
✉ juliana.sciani@usf.edu.br,
✉ jmssciani@gmail.com

RECEIVED 10 March 2023

ACCEPTED 30 May 2023

PUBLISHED 16 June 2023

CITATION

Boldin R, Zychar BC, Gonçalves LRC and
Sciani JM (2023), Design, *in silico* and
pharmacological evaluation of a peptide
inhibitor of BACE-1.

Front. Pharmacol. 14:1184006.
doi: 10.3389/fphar.2023.1184006

COPYRIGHT

© 2023 Boldin, Zychar, Gonçalves and
Sciani. This is an open-access article
distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s)
and the copyright owner(s) are credited
and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Design, *in silico* and pharmacological evaluation of a peptide inhibitor of BACE-1

Renata Boldin^{1,2}, Bianca Cestari Zychar³,
Luis Roberto C. Gonçalves³ and Juliana Mozer Sciani^{2*}

¹Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG), Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil, ²Laboratório de Farmacologia Molecular e Compostos Bioativos, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil, ³Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is the main type of dementia, caused by the accumulation of amyloid plaques, formed by amyloid peptides after being processed from amyloid precursor protein (APP) by γ - and β -secretases (BACE-1). Although amyloid peptides have been well established for AD, they have been found in other neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, Lewy body dementia, and amyotrophic lateral sclerosis. Inhibitors of BACE-1 have been searched and developed, but clinical trials failed due to lack of efficacy or toxicity. Nevertheless, it is still considered a good therapeutic target, as it was proven to remove amyloid peptides and improve memory.

Methods: In this work, we designed a peptide based on a sequence obtained from the marine fish *Merluccius productus* and evaluated it by molecular docking to verify its binding to BACE-1, which was tested experimentally by enzymatic kinetics and cell culture assays. The peptide was injected in healthy mice to study its pharmacokinetics and toxicity.

Results: We could obtain a new sequence in which the first N-terminal amino acids and the last one bound to the catalytic site of BACE-1 and showed high stability and hydrophobicity. The synthetic peptide showed a competitive inhibition of BACE-1 and $K_i = 94$ nM, and when injected in differentiated neurons, it could reduce A β 42o production. In plasma, its half-life is ~1 h, clearance is 0.0015 μ g/L/h, and V_{ss} is 0.0015 μ g/L/h. The peptide was found in the spleen and liver 30 min after injection and reduced its level after that, when it was quantified in the kidneys, indicating its fast distribution and urinary excretion. Interestingly, the peptide was found in the brain 2 h after its administration. Histological analysis showed no morphological alteration in any organ, as well as the absence of inflammatory cells, indicating a lack of toxicity.

Discussion: We obtained a new BACE-1 inhibitor peptide with fast distribution to the tissues, without accumulation in any organ, but found in the brain, with the possibility to reach its molecular target, BACE-1, contributing to the reduction in the amyloid peptide, which causes amyloid-linked neurodegenerative diseases.

KEYWORDS

peptide, BACE-1, competitive inhibitor, *in silico* design, pharmacokinetics

1 Introduction

β -Secretase-1 (BACE-1) is an aspartic-like type 1 transmembrane peptidase belonging to the pepsin family. This enzyme contains two aspartic acid residues in its active site (Asp32/Asp228) (Rawlings et al., 2018) and a flexible flap in the region of amino acid positions 67 to 77, which controls substrate binding (Xu et al., 2012).

BACE-1 has the substrate amyloid precursor protein (APP) and generates amyloid plaques in the brain, causing several amyloid-linked neurodegenerative diseases. BACE-2 is 64% similar to BACE-1 but is not related to amyloid peptide formation in the brain (Yan and Vassar, 2014).

Alzheimer's disease (AD), the main type of dementia, is characterized by memory loss and cognitive impairment. It is common in the elderly, and due to increased life expectancy, the number of cases increased to 46.8 million people in 2015, and it is now the seventh leading cause of death in the world. The expectation is that, in 2050, there will be 131.5 million cases (Alzheimer's Disease International, 2022).

This disease is caused by the formation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles, which induce dystrophic neurites and significant neuronal loss in specific regions of the brain (and consequently, loss of synaptic contact), in addition to chronic inflammation and oxidative damage (Hardy and Selkoe, 2002).

Amyloid plaques are formed initially by APP or amyloid β precursor protein processing, after cleavage of the C-terminal portion by α -secretases, β -secretases, and γ -secretases (Wakabayashi and De Strooper, 2008).

In the first pathway, named the non-amyloidogenic pathway, APP is cleaved by α -secretase, producing sAPP α , which is excreted into the extracellular medium, in addition to a peptide, generated after γ -secretase cleavage. In the second pathway, referred to as the amyloidogenic pathway, APP is first cleaved by β -secretase producing a fragment of 99 amino acids. Another enzyme, γ -secretase, performs a new process to release the amyloid peptide. The last cleavage occurs non-specifically, and a peptide of 40 or 42 amino acids (A β 40 and A β 42) can be generated, which is toxic to neurons (Murphy and LeVine, 2010; Soria Lopez et al., 2019).

A β 40 and A β 42 oligomerize in the aqueous environment of the brain. These aggregated insoluble peptides, known as amyloid plaques, accumulate in specific extracellular regions of the brain, inside or outside the cells, and cause AD (Hardy and Selkoe, 2002). Although amyloid peptides have been well established for AD, they have been found in other neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, Lewy body dementia, and amyotrophic lateral sclerosis (Calingasan et al., 2005; Lim et al., 2019; Biundo et al., 2021).

Several studies have searched for a BACE-1 inhibitor to control neurodegenerative diseases, especially AD. However, clinical trials have failed due to lack of efficacy or toxicity (Das and Yan, 2019). Nevertheless, the beneficial effects of enzyme inhibition have been demonstrated, including the reduction of A β levels and improvement of memory (Vassar, 2014).

Currently, only two pharmacological groups have been approved for the treatment of this disease, namely, acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate

glutamatergic receptor antagonists. Few drugs licensed by regulatory agencies, such as tacrine, rivastigmine, donepezil, and galantamine, are commercially available for the treatment of AD. However, these drugs only increase patients' life expectancy by a few years and do not represent a cure (Hung and Fu, 2017).

Recently, a monoclonal antibody was approved by the FDA for AD treatment, as it was shown to be effective in removing amyloid plaques; however, several adverse effects have been reported. Nevertheless, these data are important because it was confirmed that the amyloid peptide is still a relevant pharmacological target (Shi et al., 2022).

Peptides have been studied to inhibit BACE-1, and they are biomolecules that fill the gap between small molecules and protein drugs and share the advantages of both groups, namely, high stability and bioavailability (Bruno et al., 2013; Craik et al., 2013). Animal venoms and secretions (including marine ones) are rich in bioactive peptides, representing a successful group of molecules with high potency that are rarely studied and explored from a pharmacological aspect (Bhat et al., 2015; Sciani et al., 2016).

Thus, the aim of this study was to obtain a new peptide derived from a natural one isolated from a marine fish, designed with the help of computational tools, and evaluate its inhibitory activity on BACE-1, in addition to its pharmacokinetic properties.

2 Materials and methods

2.1 Peptide

A peptide isolated from *Merluccius productus* fish protein hydrolysate (Lee et al., 2019) was modified by removing an Asp residue and searched in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) for similarity analysis, considering a non-redundant database, without organism selection, matrix BLOSUM62, and gap existence. Moreover, the new peptide was analyzed as its physico-chemical properties using the ProtParam Tool (ExpASy), in which molecular mass, pI, instability index, GRAVY (grand average of the hydropathicity index), and aliphatic index were calculated (Gasteiger et al., 2005).

2.2 Molecular docking

To evaluate the potential of the new peptide to inhibit BACE-1, we first performed molecular docking experiments. The target protein 2VKM was selected from the PDB (Protein Data Bank) based on the resolution by the X-ray diffraction method (~ 2 Å), isolated from humans, and had its experimental structure determined together with an inhibitor to serve as an anchorage model. Other BACE-1 with different flap positions were also studied—PDB code 1W50, 2QU3, 2VIE, 3EXO, and 3HVG.

The protein file (PDB) was prepared using UCSF Chimera v1.15 and AutoDockTools (version 1.5.6) to remove the native ligand, missing atoms, chain breaks, and water molecules. Hydrogens were added at a pH of 7.0, and charges were added to Asp32 and Asp228 or both. The grid was centered within the protein's active site with the size of $22 \times 24 \times 28$ Å in the x , y , and z axes, respectively, and positions 1.223 for x , -1.18 for y , and 37.361 for z .

The peptide sequence was inserted using the MDockPeP server (Yan et al., 2016; Xu et al., 2018) in the FASTA format. The cutoff of bRMSD for the restriction of the peptide conformation was set at 5.5 Å, and the exhaustiveness value for the sampling was 100. Analysis of the peptide position into BACE-1, amino acid bind determination, and distances between atoms were performed using UCSF Chimera v1.15.

2.3 ADME and toxicological analysis (*in silico*) of the peptide

Predictions were performed using the PeptideMass platform to check for possible points of processing of the peptide by plasma and tissue enzymes.

Half-life in mammals was estimated using the ProtParam Tool (ExpASy). To estimate toxicity in animals and cells, the peptide sequence was analyzed using the ToxinPred (Gupta et al., 2013). The tool predicts based on the observations of several motifs present in toxic peptides for humans, deposited in SwissProt, where they are used as a template for the prediction of toxic peptides, searched by the MEME software, and followed by the query of “toxic” sequences by the MAST software.

The structure of the peptide was estimated using the MDockPeP server and UCSF Chimera v1.15.

2.4 Enzymatic kinetics on BACE-1

The peptide was commercially obtained (manufactured by Biotik, commercialized by FastBio, Brazil) and synthesized by the solid phase with >95% purity. The peptide was tested using an enzymatic kinetics model, in which 10 μM of peptide (diluted in 0.9% saline solution) was incubated with recombinant BACE-1 and reaction buffer for 15 min at room temperature (MAK237, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, United States). After that, H-Arg-Glu (EDANS)Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys (DABCYL)Arg-OH quencher substrate (0–32 μM) was added to the reaction mixture. Readings were taken using a fluorimeter (Glomax, Promega, Madison, WI, United States) every 5 min at 37° in a $\lambda_{ex} = 335$ and $\lambda_{em} = 510$. Experiments were conducted in triplicate in two independent sets, and the mean of fluorescence was obtained for further calculations. The velocity of the reaction was calculated as Δ fluorescence values at Δ time for each substrate concentration. 1/V and 1/S values were obtained and plotted in a graph (Lineweaver–Burk plot), and kinetic parameters (slope, V_{max} , K_m , and K_i) were calculated as the mean \pm SD using GraphPad Prism v5.

2.5 Pharmacokinetics

2.5.1 Animal injection and sample preparation

Authorization for pharmacokinetics analyses was obtained from the Ethics Committee of Instituto Butantan (CEUAIB 58872400322), where the experiments with animals were carried out. Healthy adult male Swiss mice weighing approximately 25 g were used. All animals were placed in microisolators for a 12-h light/

dark cycle, 70% humidity, and a constant average temperature (22°C).

A single dose of the peptide diluted in sterile PBS (pH 7.4) was injected intravenously in the bolus into the caudal vein of mice ($n = 3$) at a concentration of 4 mg/kg (0.2 mL). A group of animals ($n = 3$) received the sterile saline solution for the plasma and organ control, without the peptide (named ‘basal’). Blood was taken after 0, 5, and 30 min and 2, 6, and 24 h after injection. At these times, blood was collected via the retro-orbital route using a Pasteur pipette and dispensed into plastic tubes containing EDTA. The final blood volume was subjected to centrifugation at 1,500 rpm for 10 min at room temperature to obtain plasma, which was stored in a –80°C freezer until the analysis.

Moreover, organs were obtained at the same times, after a lethal injection of anesthetics (ketamine 300 mg/kg and xylazine 30 mg/kg). The organs collected included the brain, pancreas, spleen, kidneys, lungs, and liver. The organs were washed with the saline solution to remove excess blood, frozen in liquid nitrogen, and kept at –80°C until use. For the experiments, organs were submerged in 1 mL of 50 mM PBS with pH 7.5 containing peptidases inhibitors (aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, and pepstatin A, a protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich) and lysed in a tissue and cell disruptor (ULTRA-TURRAX IKA, Staufen, Germany). The lysate was centrifuged for 2 min at 13,200 rpm at 4°C, and the supernatant resulting from centrifugation was stored in a –80°C freezer until the analysis.

Both plasma and organs (150 μL) were incubated with 100 mM DL-dithiothreitol at room temperature for 30 min; after that, they were incubated to 300 mM iodoacetamide at room temperature for another 30 min in the dark. Subsequently, 150 μL of 0.1% formic acid solution and 400 μL of Milli-Q water were added and agitated for 5 min. The samples were then submitted to solid-phase extraction using a C18 cartridge (Supelco) with elution in a 60:40 acetonitrile:water solution (v/v). The eluate was inserted by mass spectrometry for analysis and quantification.

The solid-phase extraction was performed with plasma added to a known concentration of the peptide to set the mass spectrometric conditions.

2.5.2 Mass spectrometry and pharmacokinetics analysis

The determination and quantification of the peptide in plasma and organs of mice were performed by liquid chromatography (UPLC system, Waters Co.) coupled to mass spectrometry ESI-Xevo TQ-S (Waters Co., United States). The samples were inserted in a C18 column (Luna, 5 μm, 150 × 4.6 mm, Phenomenex) and eluted by 70% methanol in water, containing 0.05% formic acid in a constant flow of 0.3 mL/min. The ion was monitored at the positive ionization mode, 150°C source temperature, 550°C desolvation temperature, 800 L/h desolvation gas flow, 2 kV for capillary, and 20 kV cone voltage. Data were acquired and analyzed using MassLynx 4.

To define the relationship between the instrument response and the known concentration of the peptide, a calibration curve with six points of the peptide (0.1–20 μg/mL for plasma and 5–40 μg/mL for organs) was generated in a range defined according to the sensitivity of the method and the expected concentrations of the samples in animals (based on the amount of peptide injected).

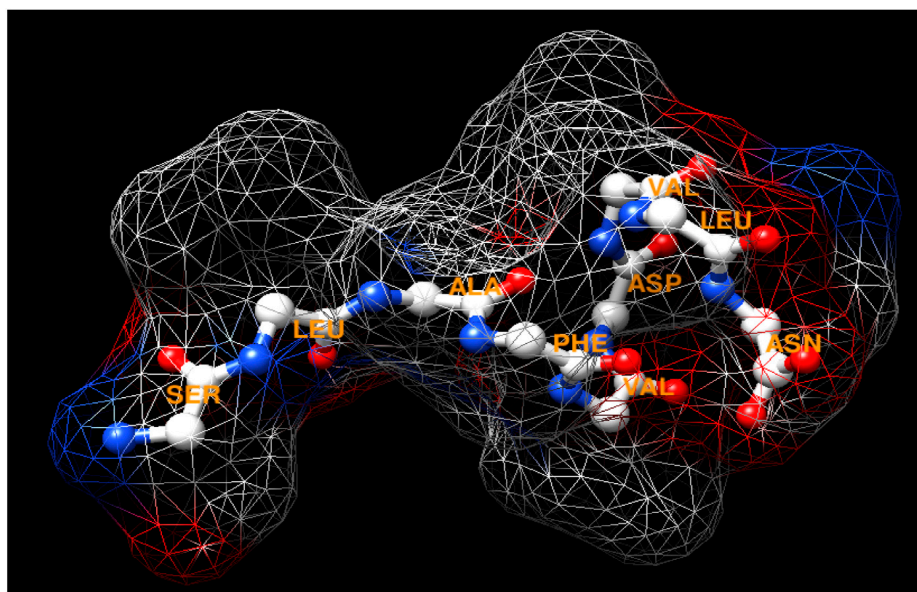


FIGURE 1

Tridimensional structure of the peptide by ribbon and surface, according to its amino acid side chains. The structure shows amino acids (three-letter), nitrogen in red, and oxygen in blue.

Each analysis lot contained the following samples: a calibration curve consisting of a blank sample (peptide-free biological matrix), samples containing peptide standard, and plasma or organ samples. Calibration functions were calculated using the peak areas of the peptide. The peptide concentrations in the samples were calculated from the weighted linear regression equation (1/×2) obtained from the calibration curve (peptide concentration as the function of the area). This regression model (1/×2) was used because of the amplitude of the calibration curve.

The plasma concentration (C_p), in $\mu\text{g/L}$, was determined by mass spectrometric analysis, and then, area data were analyzed using the PKSolver add-in program for Microsoft Excel. Pharmacokinetics parameters as the natural logarithm of C_p ($\ln C_p$), C_{p0} , half-life, and clearance were calculated in a compartmental analysis of plasma data after the intravenous bolus input (Zhang et al., 2010). For organs, data are present as mean \pm SD for each point.

2.6 Histology

Organs were removed and immediately fixed in Bouin's solution for processing by dehydration ethanol sessions and histoiresin embedding to obtain $3\ \mu\text{m}$ thick transversal slides. Sections were stained with hematoxylin–eosin and examined using a light microscope for a qualitative analysis.

2.7 BACE-1 activation

To verify if the peptide could inhibit BACE-1, we used cultured differentiated neurons and stimulated them to activate the enzyme

and release amyloid peptide, detected by thioflavin-T labeling. SH-SY5Y cells (ECACC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States), cultivated with Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (1:1) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, United States) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), were adhered to a 96-well plate (1×10^3 cells/well), then differentiated by replacing them to the media DMEM/F-12 supplemented with 2% FBS and $10\ \mu\text{M}$ retinoid acid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C . This media was replaced every 2 days, until the eighth day, when neurons were treated with $100\ \mu\text{M}$ H_2O_2 for 6 h, in the absence or presence of peptide ($10\ \mu\text{M}$). After that, the cell media was removed, and a $10\ \mu\text{L}$ aliquot was added to $88\ \mu\text{L}$ of phosphate-saline buffer (PBS 50 mM and pH 7.2) and $2\ \mu\text{L}$ thioflavin of 1 mM. The solution was read using the fluorimeter in a $\lambda_{\text{ex}} = 450\ \text{nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 490\ \text{nm}$. Means of arbitrary units of fluorescence (AUF) of three experiments were calculated along with SD, and a statistical analysis was applied using one-way ANOVA for a three-group comparison (control, H_2O_2 , and H_2O_2 + peptide), followed by Tukey's post-test using GraphPad Prism v5. Statistical significances were considered when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Peptide properties and BACE-1 docking

The peptide has the sequence SLAFVDVLN, a molecular mass determined as 977.73 by mass spectrometry, and its tridimensional structure is depicted in Figure 1. The amino acid sequence was not found in the database, indicating a new peptide. Its properties were

TABLE 1 Properties of the peptide estimated computationally.

Molecular mass	pI	Instability index	GRAVY	Aliphatic index	Half-life (h)
977.13	3.80	-7.81 (stable)	1.42	162.22	1.90

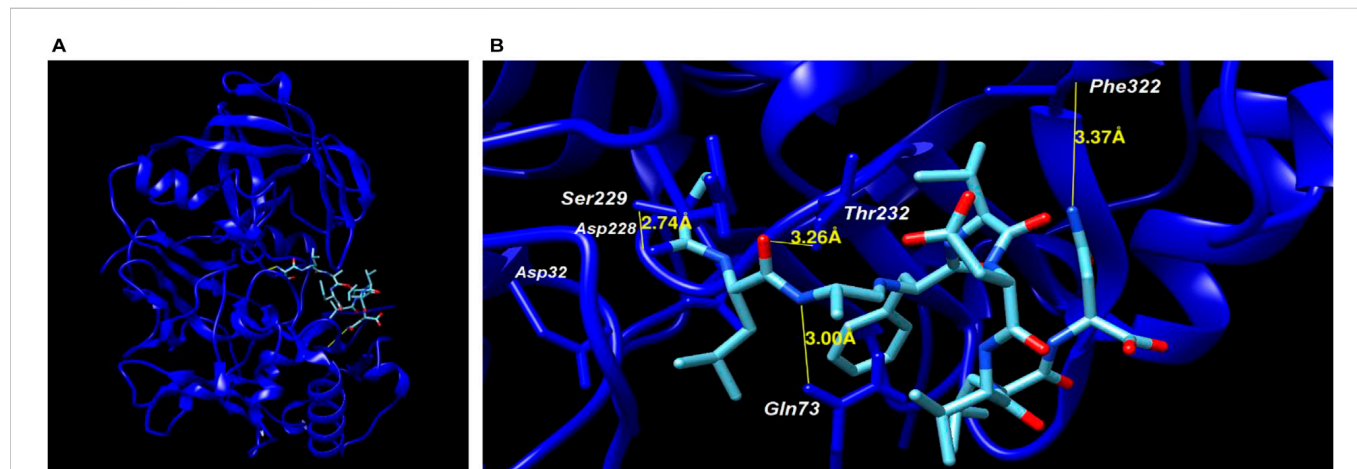


FIGURE 2 Molecular docking of BACE-1 (2VKM PDB code) and peptide. (A) Positioning of the peptide on the catalytic site of the enzyme. (B) Binding amino acids from the enzyme and distances to the peptide.

TABLE 2 Protein-peptide binding profile and distance between amino acids.

Peptide amino acid	Protein amino acid	Distance (Å)
Ala3 (N)	Gln73	3.00
Leu2 (O)	Thr232	3.26
Ser1 (N)	Ser229	2.74
Asn9 (N)	Phe322	3.37

estimated using *in silico* tools and are presented in Table 1. It can be observed that pI is acidic, indicating that the peptide is charged at neuronal pH. On the other hand, it is stable and has a high aliphatic index value, which reflects thermic stability. Moreover, the peptide contains six hydrophobic residues, reflecting high value of GRAVY (hydrophobicity), and also has one hydrophilic residue at both the N- and C-terminal, resulting in an amphipathic characteristic that is sufficient to permeate biological membranes. The presence of only one acid residue contributes to this membrane permeation.

Moreover, it has a half-life of 1.9 h and does not contain specific amino acids for cleavage by plasma enzymes.

The binding portion of the peptide to the catalytic site of BACE-1 was evaluated by molecular docking. The protein selected in PDB was the code 2VKM, with a resolution of 2.05 Å obtained by X-ray diffraction after expression in bacteria but with a human sequence.

Four amino acids from the peptide bound to the side chains of amino acids from the active site of BACE-1, with a distance of up to 3.37 Å, being the first three (Ser-Leu-Ala) from the N-terminal

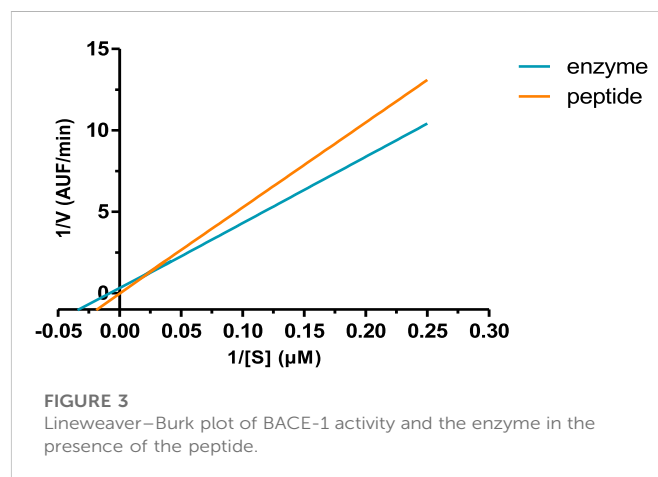


FIGURE 3 Lineweaver-Burk plot of BACE-1 activity and the enzyme in the presence of the peptide.

portion and one (Asn) from the C-terminal (Figure 2). The binding profiles (amino acids, elements, and distances) are shown in Table 2, where it is possible to see the binding in the amino acid next to the catalytic site composed by Asp32/Asp228, besides the Gln73 from the flap. The ITScorePeP was calculated as -138.00. The distances to the amino acids Asp32 and Asp228 were 7.55 and 6.94 Å, respectively. The docking showed in Figure 2 was performed with protonated Asp228, but similar results in terms of bound amino acids were found when protonated Asp32 was analyzed.

The peptide was also docked with BACE-1 in different flap positions (Xu et al., 2012)—PDB codes 1W50, 2QU3, 2VIE, 3EXO, and 3HVG. No change in binding was detected in terms of amino

TABLE 3 Enzymatic kinetics parameters were obtained for BACE-1 activity, and the enzyme was incubated with the peptide. Values are mean ± SD.

	BACE-1	BACE-1 + peptide
Vmax	0.2352 ± 0.03233	0.0503 ± 0.01044
Km (μM)	-0.0060	-0.09
Ki (μM)		0.0940

acid binding, but there were slight differences in the distances (data not shown). The lowest docking score was obtained with BACE with PDB code 3EXO (-129.20).

3.2 Enzymatic activity on BACE-1

The peptide, when incubated with recombinant BACE-1, slightly reduced the velocity of the reaction compared to the

enzyme without any treatment. Figure 3 shows the velocity of the reaction with or without the peptide in a Lineweaver–Burk plot, where it is possible to see differences in the slope and intersection of the x and y axes, reflecting different Vmax and Km values (shown in Table 3). This profile indicates that the peptide is a competitive inhibitor, or even a mixed inhibition, as Km value increased, and 1/V increased in the presence of the peptide.

3.3 Pharmacokinetics

The calibration curve for the peptide in plasma resulted in a correlation coefficient greater than 0.99, indicating that the method was linear (Figure 4A). The LLOQ peak area was at least five times greater than interferences observed in the same retention-time peptide, when a blank sample was analyzed. The deviation was less than or equal to 20% in relation to the nominal concentration for the LLOQ and less than or equal to ±15% of the

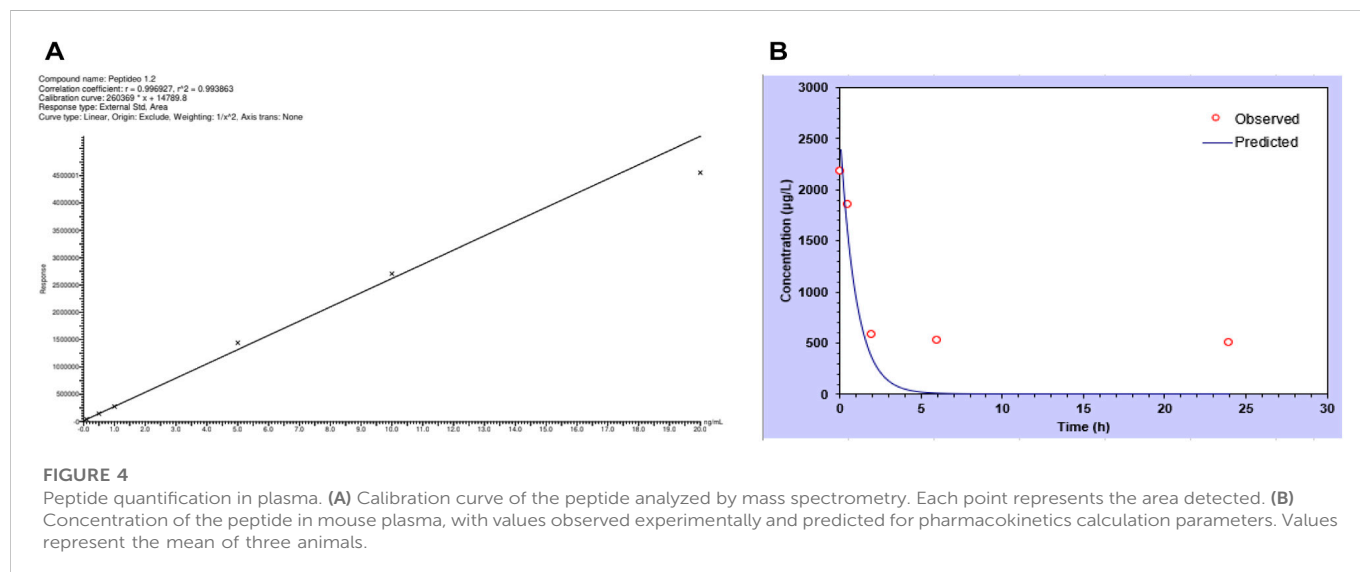
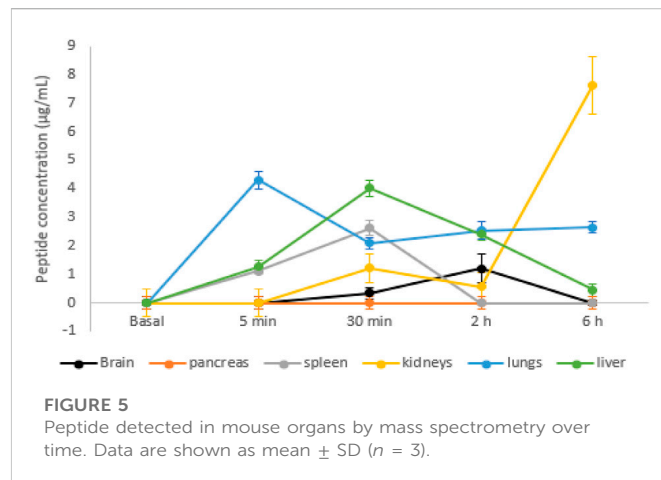


TABLE 4 Pharmacokinetic parameters of the peptide quantified in mouse plasma.

Parameter	Unit	Value
t1/2	h	0.69
Cp0	μg/L	2,595.96
V	(mg/kg)/(μg/L)	0.00154
CL	(mg/kg)/(μg/L)/h	0.00154
AUC 0-t	μg/L*h	2,595.96
AUC 0-inf	μg/L*h	2,595.96
AUMC	μg/L*h ²	2,595.96
MRT	h	1
Vss	mg/kg/(μg/L)	0.00150



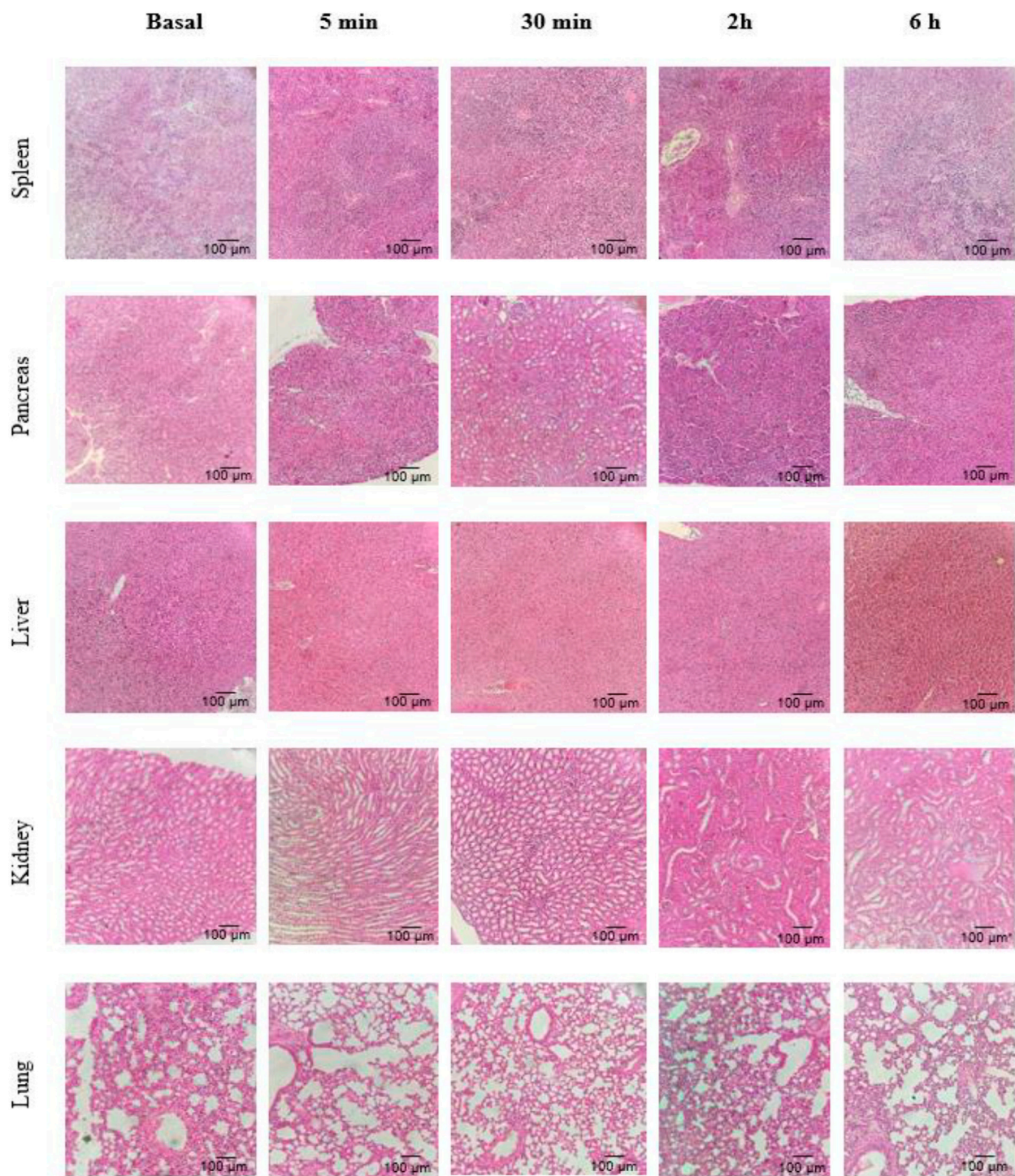
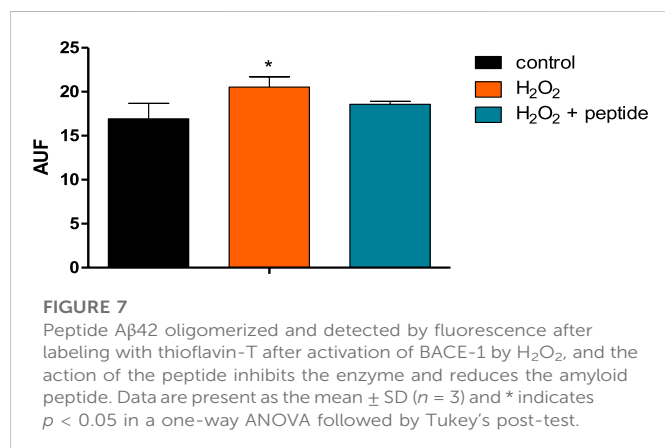


FIGURE 6
 Representative histological sections of five organs collected in certain times after the injection of the peptide ($n = 3$).



nominal concentration for the other concentrations in the calibration curve.

When the plasma and organs were analyzed using the same method, it was possible to quantify the peptide in such biological matrices. Figure 4B shows the plasma concentration of the peptide in the natural log over time. From these data, it was possible to calculate pharmacokinetic parameters, and values are presented in Table 4, where it is possible to see a short half-life (0.7 h) but an important volume of distribution and elimination.

Organs were also evaluated using mass spectrometry to quantify the peptide present each time. As shown in Figure 5, no signal was detected in the animals that did not receive the peptide. Five minutes after peptide injection, it was possible to observe the peptide in the spleen, liver, and lungs.

In the spleen and liver, the concentration increased for up to 30 min after injection and decreased over time, with the liver showing slower elimination. It was not possible to identify the peptide in the pancreas. In the kidneys, the concentration of the peptide increased 30 min after the injection, slightly decreased after 2 h, but increased after 6 h after the injection. Five minutes after the injection, a high concentration of the peptide was found in the lungs, with levels reduced and maintained constant for up to 6 h. In the brain, the peptide reached a 2-h peak after injection and decreased after 6 h.

3.4 Histology

After collection, the spleen, liver, pancreas, lungs, and kidneys were subjected to histological analysis. Figure 6 shows a representative image of $n = 3$ of each organ in a region randomly selected under a light microscope ($\times 100$), after 5 and 30 min and 2 and 6 h after peptide injection. No alterations were detected in any organ or at any time after the peptide injection, regarding cell/tissue morphology or the presence of an inflammatory infiltrate, similar to the same aspect as the basal group.

3.5 Oligomeric A β 42

Differentiated neurons SH-SY5Y, treated with H₂O₂ for BACE-1 activation, could release oligomeric amyloid peptide

(A β 42o), detected by thioflavin-T labeling, as shown in Figure 7, where the arbitrary units of fluorescence (AUF) were significantly increased with the treatment. With the incubation of the peptide, the A β 42o levels were reduced, confirming and validating, in an *in vitro* assay, the activity of BACE-1 inhibition.

4 Discussion

BACE-1 is an important enzyme involved in APP processing and amyloid-peptide generation that contributes to the progression of neurodegenerative diseases (Zhao et al., 2020). Considering that BACE-1 is the key enzyme for the generation of β -amyloid peptide 40 and 42, its inhibition is a relevant pharmacological target for disease treatment.

The first BACE-1 inhibitor developed was OM99-2, which is a peptidomimetic. Other molecules have been designed to increase potency with the development of inhibitors based on hydroxyethylene, hydroxyethylamine, carbamine, macrocycles, and non-peptidomimetics, such as acylguanidines, aminoimidazoles, aminohydantoin, and aminoquinazoline (Ghosh et al., 2012).

BACE-1 inhibitor peptides have also been isolated from marine animals. One example is a peptide generated from the hydrolyzed muscle of the gastropod *Aplysia kuroda*, a competitive inhibitor of the enzyme (Lee et al., 2019).

Here, we present a new peptide that is a competitive inhibitor of BACE-1. This peptide was isolated from *Merluccius productus* fish by Lee et al. (2019) and slightly modified by our group to be less charged and suitable to permeation through the blood-brain barrier. This peptide was chosen because it has a similar amino acid sequence and hydrophobicity pattern in peptides characterized by our group [(Banagouro et al., 2022) and data not shown], with BACE-1 inhibitory activity determined *in silico*.

The first analysis was performed to determine whether the new peptide maintained BACE-1 inhibitory activity. We first performed molecular docking analysis, which showed the binding of the peptide to the catalytic pocket of the enzyme. The first N-terminal residues were able to bind to BACE-1 at short distances, indicating stable binding. Moreover, the last residue (Asn) also bonded to the enzyme, as Lee et al. have already shown; the dipeptide Leu-Asn showed the most potent activity among other fragments derived from the original peptide, in addition to reducing the A β production in SH-SY5Y cells. Therefore, these two hydrophilic amino acids are important for maintaining the peptide structure and binding to the BACE-1 active site. Other amino acids have important functions in membrane permeation due to their hydrophobic features.

Although the peptide did not bind to the residues from the catalytic dyad (Asp32/Asp228), the molecule interacted to adjacent amino acids (Thr232, Asn233, and Ser229), placed exactly in the catalytic pocket, with hydrogen-bond distances. The nine-residue amino acids would compete with the peptide/protein substrate, impairing its positioning in the catalytic pocket, consequently inhibiting the activity of the BACE-1 (Rawlings et al., 2018).

The catalytic residues are placed at the center of the catalytic pocket, forming a hydrogen network for molecule binding. However, other amino acids are important for inhibitor

stabilization, such as S2 and S4 subsite residues, which are mostly hydrophilic, and S1 and S3, which are hydrophobic. One example is the OM99-2 inhibitor, in which its P1 leucine and P3 valine fill the S1 and S3 hydrophobic sites and bind to Tyr71 and Phe108 from BACE-1 (Ghosh and Osswald, 2014). Similarly, our peptide inhibited BACE-1 by binding in other residues than the catalytic dyad.

Moreover, the peptide bound to Gln73, a residue from the BACE-1 flap. The flap from BACE-1 is the most flexible region from the structure that controls the substrate to reach the catalytic site by covering the active site. Thus, this flap has several multiple conformational states in different crystal structures, but it is closed when inhibitors are attached. The binding of Gln73 to our peptide in different flap conformations reinforced the BACE-1 inhibition profile.

Inhibitory compounds that bind to Gln73 also showed important BACE-1 inhibition, such as pyrazinocarboxamide, which had an $IC_{50} < 1$ nM. Moreover, this compound reduces $A\beta$ levels in the rat brain (Wu et al., 2016).

Therefore, the positioning of the peptide in the catalytic pocket of BACE-1 and coordinating the closing of the flap characterized a competitive inhibition. These data were confirmed experimentally, and an observation of a competitive inhibitor agreed with the molecular docking analysis, in which the peptide was placed in the active site of the enzyme, including the flap backbone. Moreover, we determined the inhibitory constant (K_i), which was calculated to be 94 nM, indicating a good enzyme inhibition.

The BACE-1 inhibition could be confirmed by *in vitro* experiments, in which differentiated neurons were stimulated with H_2O_2 to activate BACE-1. Tan et al. (2013) demonstrated that oxidative stress increased BACE-1 protein levels and initiated the amyloidogenic pathway of APP, generating amyloid peptides. Our data agreed with this finding, where 100 μ M H_2O_2 increased oligomerized $A\beta_{42}$ levels, detected by a conventional approach of thioflavin-T labeling. We saw that when the peptide was present, these levels were reduced to the basal levels, confirming the peptide as the BACE-1 inhibitor in cells.

Moreover, it was verified that the peptide is not capable of being cleaved by plasma enzymes, as it does not have residues for such hydrolysis, which allows the administration of the peptides in a living organism, e.g., mice. Thus, we opted for an intravenous injection to avoid unspecific cleavage by stomachal and intestinal/pancreatic enzymes after an oral administration. The intravenous route is the first choice for protein and peptide drugs due to the possible enzymatic processing and, consequently, peptide loosing (Bruno et al., 2013). We could observe the intact mass of the complete peptide, confirming that there was no enzymatic cleavage, and no fragments were observed in mass spectrometry analysis (data not shown). Therefore, these data surpass the main disadvantage of a peptide drug, maintaining its advantages—high specificity and potency (Wang et al., 2022).

The peptide was found in the plasma at all analyzed times, with the highest concentration 5 min after the injection, and decreased over time, typical of an intravenous administration. We calculated the PK parameters using the compartmental analysis of the plasma after an intravenous bolus injection, and we could obtain the peptide concentration at time zero and values for distribution and

elimination. The half-life was calculated at 0.7 h, similar to the value calculated by the computational model.

Due to the increased metabolic rates of mice, compared to human, the drug distribution and elimination profile is usually faster, but these data would help us to select an effective dose without causing any toxicity (Benet and Zia-Amirhosseini, 1995).

In pancreas, the peptide could not be found, but it was detected in other organs, showing that, after its entry into the systemic circulation, it was distributed. The distribution is not homogeneous due to the difference in blood perfusion, that is, the association with the tissues, pH, and permeability of the cell membrane.

In our study, it was possible to quantify the peptide at all times in spleen and liver (from 5 min to 6 h), with a peak at 30 min. The spleen is an organ of great importance for the immune system; it is highly irrigated, and a great exposure to external agents is expected, as we observed here (Cataldi et al., 2017). Nevertheless, the accumulation of the peptide indicates no toxicity for the organ. The liver is the main site of xenobiotic metabolism, where biotransformation reactions occur, generating more polar compounds to facilitate elimination from the body (Almazroo et al., 2017). The decrease over time indicates that there was no accumulation of the peptide in hepatocytes, which suggests not only the absence of toxicity but also the possible participation of the organ in the peptide metabolism.

The lack of toxicity could be confirmed by histological analysis, where the tissue was maintained intact after a single-dose administration of the peptide, and no inflammatory cells were observed. Thus, the biodistribution in these tissues was quite rapid, insufficient to cause any disturbance.

In kidneys, the peptide was observed after 30 min and increased after 6 h. The kidneys are mainly responsible for the elimination of peptides, but it also participates in metabolism, since it has peptidases in the proximal tubule. The elimination of small peptides, such as the peptide presented here, can occur freely by the kidneys, as they can enter and filtered by the glomerulus (Brater, 2002). This indicates that the urinary tract is the main route of elimination of the peptide in its intact primary structure.

The peptide was also detected in the lungs, from 5 min to 6 h. It is not common for a peptide to permeate lung cells due to its size, but its hydrophobicity nature may have contributed to pass membranes, as lipophilic molecules/drugs can easily permeate the airway epithelium via the passive transport (Matthews et al., 2020). Similarly, a small protein with the antitumor effect, Amblyomin-X, was found in the lungs in high concentration 10 min after an intravenous administration, and our findings show that no toxicity was related to this protein (Bouffleur et al., 2019). Nevertheless, no clinical signals of toxicity were observed after a single dose of the peptide shown here.

Interestingly, the peptide was found in the brain, confirming the prediction of the hydrophobicity, which indicates the membrane permeation, including the brain–blood barrier. The hydrophobic nature of the peptide allowed its fast distribution, as it probably passed membranes easily, besides the presence of hydrophilic amino acids in the N- and C-terminal, which

facilitates binding to the aqueous solution and polar portion of the membrane.

The presence of the peptide in the brain is essential, considering that the target is BACE-1 from neurons to treat a neurodegenerative disease. Moreover, the peptide could be found up to 6 h in the tissue, showing an effective time for the molecular-target interaction. The *in vivo* efficacy of the peptide will be further studied.

5 Conclusion

In conclusion, we optimized a peptide using *in silico* tools to obtain a potent and competitive inhibitor of BACE-1, which is able to distribute and permeate the brain–blood barrier without causing any toxicity in mice and is useful for the treatment of amyloid-linked neurodegenerative diseases.

Data availability statement

The datasets generated for this study can be found in www.inovamol.com.br.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan.

References

- Almazroo, O. A., Miah, M. K., and Venkataramanan, R. (2017). Drug metabolism in the liver. *Clin. Liver Dis.* 21, 1–20. doi:10.1016/j.cld.2016.08.001
- Alzheimer's Disease International (2022). Alzheimer's disease international. Available at: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>.
- Banagouro, K. C. Q., Viana, J., de Lima, L. P., Coelho, G. R., Rocha, T., Girardello, R., et al. (2022). Biochemical and toxinological characterization of venom from macrorhynchia philippina (Cnidaria, Hydrozoa). *Biomed. Res. Int.* 2022, 8170252–8170310. doi:10.1155/2022/8170252
- Benet, L. Z., and Zia-Amirhosseini, P. (1995). Basic principles of pharmacokinetics. *Toxicol. Pathol.* 23, 115–123. doi:10.1177/019262339502300203
- Bhat, Z. F., Kumar, S., and Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: A review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5377–5392. doi:10.1007/s13197-015-1731-5
- Biundo, R., Weis, L., Fiorenzato, E., Pistonesi, F., Cagnin, A., Bertoldo, A., et al. (2021). The contribution of beta-amyloid to dementia in Lewy body diseases: A 1-year follow-up study. *Brain Commun.* 3, fcab180. doi:10.1093/braincomms/fcab180
- Bouffleur, P., Sciani, J. M., Goldfeder, M., Faria, F., Branco, V., and Chudzinski-Tavassi, A. M. (2019). Biodistribution and pharmacokinetics of amyloymim-X, a novel antitumour protein drug in healthy mice. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 44, 111–120. doi:10.1007/s13318-018-0500-z
- Brater, D. C. (2002). Measurement of renal function during drug development. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 54, 87–95. doi:10.1046/j.1365-2125.2002.01625.x
- Bruno, B. J., Miller, G. D., and Lim, C. S. (2013). Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Ther. Deliv.* 4, 1443–1467. doi:10.4155/tde.13.104
- Calingasan, N. Y., Chen, J., Kiaei, M., and Beal, M. F. (2005). Beta-amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Dis.* 19, 340–347. doi:10.1016/j.nbd.2005.01.012
- Cataldi, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M., and Capone, D. (2017). Emerging role of the spleen in the pharmacokinetics of monoclonal antibodies, nanoparticles and exosomes. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1249. doi:10.3390/ijms18061249
- Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., and Price, D. (2013). The future of peptide-based drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 136–147. doi:10.1111/cbdd.12055

Author contributions

All authors contributed to conception and design of the study. RB performed mass spectrometry analysis. BZ and LG performed the animal studies. JS performed enzymatic analysis. JS wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

FAPESP #2019/19929-6 (JMS).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Das, B., and Yan, R. (2019). A close look at BACE1 inhibitors for alzheimer's disease treatment. *CNS Drugs* 33, 251–263. doi:10.1007/s40263-019-00613-7
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., et al. (2005). "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server," in *The proteomics protocols handbook* (Totowa, NJ: Humana Press), 571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571
- Ghosh, A. K., Brindisi, M., and Tang, J. (2012). Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 120, 71–83. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07476.x
- Ghosh, A. K., and Osswald, H. L. (2014). BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6765–6813. doi:10.1039/C3CS60460H
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G. P. S., et al. (2013). *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS One* 8, e73957. doi:10.1371/journal.pone.0073957
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Sci.* (80) 297, 353–356. doi:10.1126/science.1072994
- Hung, S.-Y., and Fu, W.-M. (2017). Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* 24, 47. doi:10.1186/s12929-017-0355-7
- Lee, J. K., Li-Chan, E. C. Y., Cheung, I. W. Y., Jeon, Y.-J., Ko, J.-Y., and Byun, H.-G. (2019). Neuroprotective effect of β -secretase inhibitory peptide from pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate. *Curr. Alzheimer Res.* 16, 1028–1038. doi:10.2174/1567205016666191113122046
- Lim, E. W., Aarsland, D., Ffytche, D., Taddei, R. N., van Wamelen, D. J., Wan, Y.-M., et al. (2019). Amyloid- β and Parkinson's disease. *J. Neurol.* 266, 2605–2619. doi:10.1007/s00415-018-9100-8
- Matthews, A. A., Ee, P. L. R., and Ge, R. (2020). Developing inhaled protein therapeutics for lung diseases. *Mol. Biomed.* 1, 11. doi:10.1186/s43556-020-00014-z
- Murphy, M. P., and LeVine, H. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *J. Alzheimer's Dis.* 19, 311–323. doi:10.3233/JAD-2010-1221
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in

- 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624–D632. doi:10.1093/nar/gkx1134
- Sciani, J. M., Emerenciano, A. K., Cunha da Silva, J. R. M., and Pimenta, D. C. (2016). Initial peptidomic profiling of Brazilian sea urchins: *Arbacia lixula*, *Lytechinus variegatus* and *Echinometra lucunter*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22, 17. doi:10.1186/s40409-016-0071-x
- Shi, M., Chu, F., Zhu, F., and Zhu, J. (2022). Impact of anti-amyloid- β monoclonal antibodies on the pathology and clinical profile of alzheimer's disease: A focus on aducanumab and lecanemab. *Front. Aging Neurosci.* 14, 870517. doi:10.3389/fnagi.2022.870517
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., and Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 167, 231–255. doi:10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3
- Tan, J.-L., Li, Q.-X., Ciccotosto, G. D., Crouch, P. J., Culvenor, J. G., White, A. R., et al. (2013). Mild oxidative stress induces redistribution of BACE1 in non-apoptotic conditions and promotes the amyloidogenic processing of alzheimer's disease amyloid precursor protein. *PLoS One* 8, e61246. doi:10.1371/journal.pone.0061246
- Vassar, R. (2014). BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* 6, 89. doi:10.1186/s13195-014-0089-7
- Wakabayashi, T., and De Strooper, B. (2008). Presenilins: Members of the γ -secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology* 23, 194–204. doi:10.1152/physiol.00009.2008
- Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., et al. (2022). Therapeutic peptides: Current applications and future directions. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 48. doi:10.1038/s41392-022-00904-4
- Wu, Y.-J., Guernon, J., Yang, F., Snyder, L., Shi, J., McClure, A., et al. (2016). Targeting the BACE1 active site flap leads to a potent inhibitor that elicits robust brain A β reduction in rodents. *ACS Med. Chem. Lett.* 7, 271–276. doi:10.1021/acsmchemlett.5b00432
- Xu, X., Yan, C., and Zou, X. (2018). MDockPeP: An *ab-initio* protein-peptide docking server. *J. Comput. Chem.* 39, 2409–2413. doi:10.1002/jcc.25555
- Xu, Y., Li, M., Greenblatt, H., Chen, W., Paz, A., Dym, O., et al. (2012). Flexibility of the flap in the active site of BACE1 as revealed by crystal structures and molecular dynamics simulations. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* 68, 13–25. doi:10.1107/S0907444911047251
- Yan, C., Xu, X., and Zou, X. (2016). Fully blind docking at the atomic level for protein-peptide complex structure prediction. *Structure* 24, 1842–1853. doi:10.1016/j.str.2016.07.021
- Yan, R., and Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol.* 13, 319–329. doi:10.1016/S1474-4422(13)70276-X
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., and Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput. Methods Programs Biomed.* 99, 306–314. doi:10.1016/j.cmpb.2010.01.007
- Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y., and Wang, C. (2020). Targeting amyloidogenic processing of APP in alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 137. doi:10.3389/fnmol.2020.00137

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, um novo peptídeo foi obtido e identificado como inibidor competitivo da BACE-1, com posicionamento no sítio ativo da enzima. O perfil farmacocinético do peptídeo revelou a sua distribuição e pouco acúmulo nos órgãos, sem demonstrar sinais de toxicidade nos camundongos, tanto em uma avaliação de sinais clínicos quanto histológicas. A provável via de eliminação do peptídeo é renal, e ele foi encontrado no cérebro, indicando a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, dado relevante considerando a BACE-1 como alvo terapêutico. Desta forma, esse novo peptídeo pode representar uma nova alternativa como protótipo para o tratamento da Doença de Alzheimer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. Disponível em <http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en>. Acesso em 22 de março de 2018.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **What is Alzheimer's disease?** Disponível em: <<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>>. Acesso em 23 de janeiro de 2023.
- BRASIL (2006). ANVISA RESOLUÇÃO, RE Nº 1170 de 19 de abril de 2006.
- BANAGOURO, K.C.Q.; VIANA, J.D.L.L.P.; COELHO, G.R.; ROCHA, T.; GIRARDELLO, R.; RUSSI, K.L.; KITAHARA, M.V.; SCIANI, J.M. Biochemical and toxinological characterization of venom from macrorhynchia philippina (Cnidaria, Hydrozoa). **Biomed Research Internacional**, v. 2022, p. 10, 2022.
- BENES P.; VETVICKA, V.; MARTIN, F. Cathepsin D – many functions of one aspartic protease. **Critical Reviews of Oncology/Hematology**, v. 68, p. 12–28, 2008.
- CRAIK, D.J.; FAIRLIE, D.P.; LIRAS, S.; PRICE, D. The future of peptide-based drugs. **Chemical Biology & Drug Desing**, v. 81, p. 136–147, 2013.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.
- CUSHMAN, D. W., ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589–592, 1991.
- DAVID, J. C.; DAVID, P. F.; SPIROS, L.; DAVID, P. The future of peptide-based drugs. **Chemical Biology & Drug Desing**, v. 81, p. 136-147, 2013.
- DANHO, W.; SWISTOK, J.; KHAN, W.; CHU, X.J.; CHEUNG, A.; FRY, D.; SUN, H.; KURLKO, G.; RUMENNIK, L.; CEFALU, J.; CEFALU, G.; NUNN, P. Opportunities and challenges of developing peptide drugs in the pharmaceutical industry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 611, p. 467–469, 2009.
- DERENDORF, H; MEIBOHM, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 176-185, 1999.
- DIPIRO, J. T. **Concepts in clinical pharmacokinetics**. 5. ed. ASHP, 2010.

- DOMENICO, F.; TRAMUTOLA, A.; PERLUIGI, M. Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease. **Expert Opinion Therapeutic Targets**, v. 20, p. 1393-1395, 2016.
- GUO, T.; ZHANG, D.; ZENG, Y.; HUANG, T.Y.; XU, H.; ZHAO, Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 15, p. 40, 2020.
- GUTTE, B.; Peptides: synthesis, structure, and applications. **Academic Press**, 1995.
- HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, p. 353–356, 2002.
- HENDLER, G.; MILLER, J.E.; PAWSON, D.; KIER, P.M. Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 76, 1996.
- HOLFORD, N HG; SHEINER, L B. Kinetics of pharmacologic response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 143-166, 1982.
- HUNG, S.Y.; FU, W.M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, p. 47, 2017.
- JI, H-F.; LI, X-J.; ZANG, H-Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Reports**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.
- JU, Y.; TAM, K.Y. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research.**, v.17, n. 3, p. 543-549. 2022.
- LEE, J. K.; LI-CHAN, E. C. Y.; CHEUNG, I. W. Y.; JEON, Y. J.; KO, J. Y.; BYUN, H. G. Neuroprotective Effect of β -secretase Inhibitory Peptide from Pacific Hake (*Merluccius productus*) Fish Protein Hydrolysate. **Current Alzheimer Research**, v. 16, p. 1028-1038, 2019.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.
- LOUNNAS, V.; RITSCHHEL, T.; KELDER, J.; MCGUIRE, R.; BYWATER, R. P.; FOLOPPE, N. Current progress in structure-based rational drug desing marcks a new mindset in drug discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 5, 2013.
- MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: marine pharmacology. **Journal of**

Pharmacy and Bioallied Science, v. 8, p. 83-91, 2016.

MEIBOHM, B; DERENDORF, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 401-413, 1997.

MORROW, T.; FELCONE, L.H. Defining the difference: what makes biologics unique. **Biotechnol Healthc**, v. 1, p. 24-29, 2004.

MURPHY, M.P.; LEVINE, H. R.D. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v.19, p. 311-323, 2010.

NAZNEEN, N. D.; MARC, R. A.; LEAH, R. H.; WILLIAM, H. F.; BRUCE, H. M.; DAVID, J. Pharmacokinetics in rat of P8, a peptide drug candidate for the treatment of Alzheimer's disease: stability and delivery to the brain. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v. 20, 2018.

OLIVEIRA, B. M.; CRUZ, L. J.; DE SANTOS, V.; LECHEMINANT, G. W.; GRIFFIN, D.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J. M.; GALYEAN, R.; VARGA, J.; GRAY, W. R.; RIVIER, J.; **Biochemistry**, 1987.

PAALZOW, L. K. Torsten Teorell, the father of pharmacokinetics. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 41-46, 1995.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 9-23, 2019.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P.K. Rang & Dale. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 904 p.

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J., THOMAS, P.D., HUANG, X., BATEMAN, A. & FINN, R.D. The merops database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the panther database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 624-632, 2018.

TINAKARAN, G.; KOO, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 29615-29619, 2008.

Shi, M.; Chu, F.; Zhu, F; Zhu, J. Impact of anti-amyloid- β monoclonal antibodies on the pathology and clinical profile of alzheimer's disease: A focus on aducanumab and lecanemab. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14:870517, 2022.

- STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273-343, 2021.
- STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. **Ageing Research Reviews**, v. 32, p. 22–37, 2016.
- STORPIRTIS, S., GAI, M. N., CAMPOS, D. R. D., & GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. 241p.
- VITOLLO, M. **Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2015.
- WAKABAYASHI, T.; DE STROOPER, B. Presenilin's: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. **Physiology**, v. 23, p. 194–204, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia#:~:text=Alzheimer's%20disease%20is%20the%20most,dependency%20among%20older%20people%20globally>>. Acesso em 23 de janeiro de 2023.