

Informe final publicable de proyecto

Diseño racional de potenciales inhibidores de proteasas de SARS-CoV-2 basados en tio y selenosemicarbazonas derivadas de cumarinas y sus complejos metálicos

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162617

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2023

ROSTAN TALASIMOV, Santiago (Responsable Técnico - Científico)

COMINI OLMEDO, Marcelo Alberto (Investigador)

FLÓ DÍAZ, Martín (Investigador)

MAHLER TARRÍO, S. Graciela (Investigador)

MARCO, Micaela (Investigador)

OTERO ZUBIAURRE, Ana Lucía (Investigador)

VEIGA RODRÍGUEZ, Jorge Nicolás (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Algunos tio y selenosemicarbazonas actúan como inhibidores de cruzipaína, la principal cisteínproteasa de Trypanosoma cruzi. Adicionalmente, la actividad farmacológica de muchos complejos metálicos está relacionada con la inhibición de enzimas (incluyendo cruzipaína) de variadas rutas metabólicas. Nuestro grupo ha desarrollado una serie de tio y seleno semicarbazonas derivadas de cumarinas como potenciales antiparasitarios y complejos metálicos de paladio y platino utilizando estos compuestos como ligandos.

Estos derivados cumarina-tio/selenosemicarbazona son potenciales inhibidores de las proteasas 3CLpro y PLpro de SARS-CoV-2 dependientes de cisteína para su actividad catalítica. La capacidad inhibitoria podría ser potenciada por la unión de estos compuestos a iones metálicos generando así complejos con diferentes propiedades fisicoquímicas y estructurales.

En este proyecto se investigó si los compuestos orgánicos y complejos metálicos ya desarrollados son capaces de inhibir las proteasas de SARS-CoV-2 (3CLpro y PLpro). Por otra parte, se buscó estudiar mediante técnicas de anclaje (docking) molecular, modificaciones químicas sobre los compuestos orgánicos que pudieran favorecer la inhibición enzimática. Adicionalmente, se buscó identificar patrones estructurales y geométricos para los complejos metálicos que pudieran favorecer la inhibición. Posteriormente se sintetizaron y caracterizaron completamente los derivados orgánicos, así como los complejos metálicos que se desprendieron de los estudios teóricos, y del estudio racional de los resultados experimentales obtenidos en etapas iniciales (rediseño de los compuestos en función de la inhibición de MPro observada) para luego evaluar la actividad inhibitoria frente a 3CLpro y, en algunos casos, frente a PLpro. Se utilizó la información obtenida para reiniciar el ciclo de diseño/síntesis/inhibición/rediseño y seleccionar los derivados con mejores propiedades para estudios posteriores de actividad antiviral y citotoxicidad inespecífica. En el proyecto se encontró que las selenosemicarbazonas ensayadas fueron más activas frente a MPro que las tiosemicarbazonas análogas. Adicionalmente, los compuestos de coordinación conteniendo Pd y Pt fueron más activos que los ligandos tiosemicarbazona libres.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Inorgánica y Nuclear / Química Medicinal

Palabras clave: inhibidores de proteasas de SARS-CoV-2 / cumarina-tio(seleno)semiacarbazonas / complejos metálicos /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El 31 de diciembre de 2019 fueron reportados en Wuhan, China, numerosos casos de neumonía de etiología desconocida. La enfermedad, denominada por la OMS como COVID-19, es causada por un coronavirus (CoV2) que produce un síndrome respiratorio agudo severo (SARS) con alta tasa de mortalidad en personas mayores y/o cursando otras comorbilidades. Desde marzo 2020 COVID-19 adquirió la categoría de pandemia contándose a la fecha más de 5 millones de casos. Las pérdidas económicas y humanas asociadas a COVID-19 fueron globales y muy significativas. COVID-19 afectó a al menos 216 países y el total de casos fatales asciende a casi 7 millones, números que aumentan todavía en 2023 7. En Uruguay, los primeros 4 casos de COVID-19 fueron detectados el 13 de marzo de 2020, y las medidas de distanciamiento social que fueran adoptadas, en el correr de las siguientes 48 horas y sostenidas en el tiempo, contribuyeron a controlar la dispersión de la enfermedad en el país 8. De todas formas, modelos epidemiológicos predijeron la aparición de nuevos brotes de la enfermedad como producto de la migración de personas (por turismo o trabajo) provenientes de países con focos activos de COVID-19 9. En la actualidad existen varios casos de éxito de emprendimientos para la generación de vacunas contra SARS-CoV2, sin embargo, las mismas demoraron en estar disponibles de manera masiva en 1-2 años dependiendo de la región del mundo a la cual nos referimos 10. Por otro lado, no se tiene certeza, como en el caso de otros virus de ARN (ej. influenza), si las mismas producirán una inmunidad duradera dado que se ha observado que SARS-CoV-2 presenta una tasa de mutaciones alta en los distintos genomas analizados, lo cual demuestra una gran diversidad y capacidad de rápida evolución por parte de estos virus 11. Por estas razones, la identificación de potenciales fármacos se vuelve de vital importancia tanto para la prevención, control o como paliativo de esta enfermedad. Numerosos fármacos (producto del reposicionamiento de drogas que se utilizan en otras patologías) han resultado activos en la inhibición de la replicación in vitro del virus, pero las evaluaciones clínicas no han arrojado evidencia robusta y concluyente sobre la utilidad de ninguno de estos compuestos, excepto por Remdesivir cuyo uso contra SARS-CoV2 fue aprobado por la FDA12. Estos fármacos tienen diferentes blancos moleculares y/o mecanismos de acción. A modo de ejemplo se puede mencionar el bloqueo de la entrada del virus a la célula hospedera, las respuestas inmunorregulatorias adicionales y el procesamiento proteolítico. Para el procesamiento proteolítico este virus cuenta con dos proteasas de cisteína, la "chymotrypsin like protease" (CL3pro o Mpro) que hidroliza en once sitios de la poliproteína viral y la "papain like protease" (PLpro). Estas proteasas son importantes tanto para el proceso de maduración viral como en la reprogramación de la

célula hospedera. Por ejemplo, la PLpro presenta actividad ubiquitinasa que juega un rol modulador de la respuesta inmune. Por tanto, estas proteasas son candidatas a blancos de fármacos para controlar la enfermedad. De hecho, varios anti-retrovirales tienen por blanco a las proteasas virales, como Lopinavir o Ritonavir que inhiben a la retropepsina de HIV 13.

La inhibición de las proteasas virales ha ganado muchos adeptos en el área de la bioinformática ya que el cribado virtual de diversos compuestos contra dichas enzimas (cuyas estructuras cristalinas se encuentran disponibles 5,12,14,15) actúa como tamiz para guiar los estudios hacia aquellas moléculas con mejor perfil farmacológico e inhibitorio, y permite predecir los grupos farmacofóricos involucrados en la acción inhibitoria 5. No obstante, dichas herramientas in silico requieren ser complementadas con ensayos experimentales confirmatorios. Un aspecto interesante desde el punto de vista estructural y mecanístico es que ambas proteasas de SARS-CoV2 poseen una cisteína catalítica en su sitio activo, que en el caso de la PLpro se complementa con un residuo de histidina que opera como base durante el proceso hidrolítico 12.

Esta similitud con otras cisteinproteasas disparó nuestro interés ya que trabajos previos de nuestro grupo identificaron un gran número de derivados de tio y selenosemicarbazonas con buena actividad inhibitoria de la cruzipaína (K_i del orden nM), la cisteinproteasa del parásito *Trypanosoma cruzi* 15. El más activo de estos compuestos presentó un mecanismo de inhibición por unión lenta y reversible con el sustrato peptídico 15. Por otra parte, han sido descritos compuestos como inhibidores in vitro de CL3pro que se asemejan estructuralmente a los compuestos antes mencionados. Los mismos contienen en su estructura N, S y Se con conectividades análogas a tio y selenosemicarbazonas 5. Sumado a esto los derivados de cumarinas son de particular interés ya que estudios in silico los muestran como potenciales inhibidores de las proteasas de SARS-CoV2 16. Recientemente el trabajo de Abdelmohsen describe la cumarina natural esculetin con actividad inhibitoria sobre 3CLpro 17. En base a lo anterior, nuestro grupo cuenta con una biblioteca tio y selenosemicarbazonas y sus correspondientes complejos metálicos con potencial para inhibir las proteasas virales de SARS-CoV2.

En el mismo sentido, un abordaje alternativo para la inhibición de enzimas, el cual es utilizado frecuentemente en el campo de la Química Inorgánica Medicinal, es el diseño de complejos metálicos unidos a ligandos con capacidad de inhibir la enzima blanco. Esta estrategia permite el diseño de compuestos con diferentes geometrías que podrían resultar en una mejor complementariedad con el sitio activo o de inhibición de las enzimas seleccionadas por parte del centro metálico o el ligando. Además, en el caso de algunos metales blandos como Pd(II), Pt(II), Au(I) entre muchos otros, estos podrían unirse covalentemente a residuos aminoacídicos (particularmente cisteínas) del sitio activo, por ejemplo, proporcionando otro posible mecanismo de inhibición enzimática 3,4. Nuestro grupo ha desarrollado una serie de complejos metálicos con tiosemicarbazonas como ligandos que han resultado inhibidores de cruzipaína 18,19. Hemos desarrollado además tiosemicarbazonas derivadas de cumarinas 20 y complejos de Pd(II) y Pt(II) con esos compuestos como ligandos con actividad anti *T. cruzi* (algunos resultados ya han sido publicados) 21.

En base a lo mencionado en los antecedentes, en esta propuesta se pretende identificar y diseñar en forma racional nuevos inhibidores de las proteasas CL3pro y PLpro de SARS-Cov-2 como potenciales candidatos a fármacos para combatir COVID-19. En particular, se han seleccionado como estructuras bases para el estudio los compuestos tio y selenosemicarbazonas derivados de cumarinas y sus complejos con diferentes metales de transición.

En una primera etapa, se realizó un tamizaje inicial contra las enzimas CL3pro y PLpro del SARS-CoV-2 de los compuestos orgánicos mencionados arriba y sus correspondientes complejos metálicos de Pd(II) y Pt(II) desarrollados previamente por el grupo (c.a. 20 compuestos). Los resultados de estos análisis, complementados con estudios de relación estructura-actividad, aportaron información relevante acerca del potencial modo y sitio de interferencia de los compuestos con la actividad enzimática de estas proteasas. Complementariamente, los compuestos fueron sometidos a estudios in silico de anclaje molecular (docking) de manera tal de intentar caracterizar la naturaleza de la unión, la afinidad de los ligandos por el sitio de inhibición y de tener una aproximación sobre los fragmentos de dichos compuestos que podrían estar causando la acción inhibitoria. En relación a los complejos metálicos, los estudios in silico permitieron además evaluar la influencia de la geometría de los complejos y de las restricciones estéricas que el metal impone a los ligandos sobre la interacción con las enzimas. Estos estudios fueron la base de los ciclos posteriores de rediseño y optimización.

Basados en los datos experimentales e in silico obtenidos en las etapas anteriores, se propusieron y prepararon moléculas conteniendo modificaciones químicas (inclusión de sustituyentes sobre el esqueleto de la cumarina o de la tio o selenosemicarbazona, entre otros) con el fin de maximizar las interacciones con el sitio blanco. Se incluyeron complejos metálicos con diferentes co-ligandos con diferentes propiedades electrónicas y geométricas de forma de estudiar in silico el efecto de estas variables sobre la afinidad de los compuestos por el sitio blanco. Además, se incursionó en modelos de docking donde el metal no solamente sea tenido en cuenta como modificador de la geometría del compuesto de coordinación formado, sino también como eventual aceptor de enlace de coordinación para los átomos/residuos donores

presentes en la enzima en estudio 22.

Los nuevos compuestos (orgánicos y complejos) fueron sintetizados utilizando metodologías que se pusieron a punto contemplando los rendimientos y purezas de los productos obtenidos, así como la practicidad y viabilidad del proceso sintético ante la eventual necesidad de escalado. Todos los compuestos fueron caracterizados utilizando metodologías convencionales de síntesis orgánica y de compuestos de coordinación. Adicionalmente, se realizaron estudios de interés para etapas posteriores como la evaluación de la estabilidad y la solubilidad de los compuestos en diferentes medios.

Los compuestos que se lograron preparar con rendimientos y pureza adecuados fueron sometidos a un nuevo ciclo de cribado y caracterización cinética contra la proteasa CL3pro y PLpro. Finalmente, el análisis de los resultados permitió correlacionar las características estructurales de los compuestos con su capacidad inhibitoria de la proteasa seleccionada.

Como resultado de este estudio se espera obtener una serie de compuestos (tanto orgánicos como complejos metálicos) como candidatos para estudios posteriores de actividad antiviral y citotoxicidad sobre líneas celulares de mamíferos, que permitan continuar avanzando en la generación de potenciales fármacos para combatir COVID-19.

Metodología/Diseño del estudio

La estrategia de investigación ha sido diseñada en base a las siguientes actividades:

1 Preparación de los ligandos híbridos cumarina-tio y selenosemicarbazonas y sus complejos de paladio y platino que ya han sido desarrollados por el grupo.

2 Cribado in vitro de la actividad inhibitoria de los compuestos contra CL3pro y PLpro.

3 Caracterización de parámetros cinéticos y modo de inhibición de CL3pro y PLpro para los compuestos más potentes identificados durante el ensayo de cribado.

4 Estudios in silico de anclaje molecular (docking) del modo de unión de los inhibidores a la CL3pro y PLpro con de fin de intentar caracterizar la naturaleza de la unión, la afinidad de los ligandos por el sitio de inhibición y los fragmentos de dichos compuestos que causan la acción inhibitoria.

5 Diseño racional de nuevos derivados sobre base bioquímica y molecular del modo de inhibición y predicción de modificaciones químicas sobre hits identificados en las actividades anteriores que apunten a optimizar la interacción entre el ligando y el receptor. Esto incluye modificaciones sobre los compuestos orgánicos (inclusión de sustituyentes sobre el esqueleto de la cumarina o de la tio o selenosemicarbazona, entre otros) y sobre los complejos (modificaciones en la naturaleza del átomo central que den lugar a distintas geometrías, selección de co-ligandos con diferentes características electrónicas y estéricas, entre otros). Selección de los mejores candidatos.

6 Síntesis y caracterización estructural completa de los nuevos compuestos cumarina-tio y seleno semicarbazonas que surjan de la selección realizada en la actividad 5.

7 Síntesis y caracterización estructural completa de los complejos metálicos con los nuevos compuestos cumarina-tio y seleno semicarbazonas como ligandos y diferentes co-ligandos que surjan de la selección realizada en la actividad 5.

8 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos obtenidos que resulten de importancia para etapas posteriores (por ejemplo, solubilidad, estabilidad).

9 Estudios de inhibición y mecanísticos contra la CL3pro y/o PLpro para los nuevos compuestos preparados en la actividad 6 y 7.

10 Integración y discusión de los resultados.

Se detalla a continuación la metodología utilizada en las distintas actividades propuestas:

Estudios in silico

Se optimizó la geometría de cada sustrato mediante métodos de estructura electrónica [31], utilizando el programa Hyperchem 23 y/o Gaussian09 24, de forma de asegurar un buen modelo estructural de partida. La exploración inicial de las estructuras cristalinas de las enzimas CL3pro (6M2Q en RSCB-PDB) y PLpro (6W9C en RSCB-PDB) se realizó empleando el programa Discovery Studio Visualizer 25. La preparación de los receptores, incluyendo la asignación de los estados de ionización y las coordenadas de los átomos de hidrógeno, se ejecutó con el módulo Protonate 3D incluido en el programa MOE 26,27.

Los experimentos in silico de anclaje molecular de los diversos sustratos (docking molecular) se llevaron a cabo mediante el programa GOLD 28. La parametrización de los iones metálicos se obtuvo de las referencias disponibles 22. El o los sitios de unión se definieron en cada caso a partir de la información que se obtenga de la exploración inicial del receptor y en base a información bibliográfica previa 29. Se analizaron en detalle los estados de protonación de los aminoácidos del sitio de unión y se estableció el grado de libertad de las cadenas laterales durante la simulación. El modelo de docking fue validado mediante redocking de moléculas del conjunto de inhibidores reportados como líderes, como por ejemplo Ebselen o Disulfiram 5. Las mejores poses de los sustratos en el sitio de unión se hallaron mediante algoritmos genéticos de búsqueda, con al menos 100000 operaciones genéticas y 40 ciclos de cálculo. La afinidad de cada conformación del

sustrato por el sitio de unión fue estimada mediante los parámetros derivados de los indicadores Goldscore y Chemscore. La dispersión de las soluciones de docking fué evaluada mediante inspección y/o análisis de clúster.

En una primera etapa se prepararon los compuestos desarrollados previamente por el grupo. Los híbridos cumarina-tiosemicarbazona fueron preparados por metodologías desarrolladas en la tesis de posgrado del responsable de esta propuesta²⁰. Los derivados selenados se prepararon utilizando el reactivo de Ishihara 35 a partir de las correspondientes semicarbazonas utilizando una reacción de intercambio de O por Se 15.

Las modificaciones que surjan de los experimentos de docking se realizaron sobre la base de la estructura genérica de los compuestos cumarina-tio y seleno semicarbazona, considerando las modificaciones ya preparadas (figura-3) y otras que surgieron como producto de las investigaciones en las distintas etapas de diseño. La metodología para la preparación de estos nuevos derivados fue elegida de acuerdo a la naturaleza de los sustituyentes a incluir. De forma genérica las 3-acetilcumarinas con diferentes variaciones en el anillo aromático, se prepararon mediante una condensación de Knoevenagel a partir del correspondiente salicilaldehído y acetoacetato de etilo, seguida de una lactonización en presencia de una base orgánica, como se ha descrito en literatura 36–41.

Todos los compuestos obtenidos fueron caracterizados por espectroscópicamente mediante ¹H, ¹³C-RMN, HRMS y estudios de difracción de rayos X (en el caso de obtener monocristales adecuados).

Síntesis y caracterización de complejos metálicos con derivados cumarina-tio y seleno semicarbazonas y distintos coligandos

En una primera etapa se prepararon los complejos de paladio y platino desarrollados previamente utilizando las metodologías puestas a punto en el marco de la tesis de posgrado del responsable de esta propuesta (no publicadas).

Para la obtención de compuestos de coordinación que sugieren de los estudios de docking se seleccionó la sal del metal, o sal compleja más conveniente, y en algunos casos se llegó a preparar precursores que contenían los coligandos de interés para el diseño de los nuevos compuestos, o que simplemente resultaron de utilidad para la viabilidad de la síntesis del nuevo compuesto. El procedimiento de la síntesis (disolvente, temperatura, tiempo, necesidad de emplear atmosfera inerte, etc) se evaluó para cada sistema en particular. Se utilizó la síntesis asistida por microondas para preparar los nuevos compuestos, y esta técnica permitió buenos resultados en tiempos más cortos.

Los compuestos obtenidos fueron aislados de acuerdo a sus características, utilizando técnicas convencionales (cambio de solvente, evaporación, extracción liquido-liquido, purificación por cromatografía en columna, etc).

Todos los compuestos preparados fueron rigurosamente caracterizados utilizando métodos convencionales: análisis elemental de C, N, H, S y O, análisis termogravimétrico TGA (determinación de la presencia y número de posibles moléculas de solvatación), medidas de conductividad, espectroscopía FTIR, RMN (¹H- y ¹³C-RMN y otros experimentos) para los complejos diamagnéticos, voltametría cíclica, estudios de difracción de rayos X (en el caso de obtener monocristales adecuados).

Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos obtenidos

Se evaluaron aquellas propiedades fisicoquímicas de los nuevos compuestos que resultaron críticas para el adecuado desarrollo de los ensayos in vitro. En particular, se evaluó cualitativamente la solubilidad en distintos solventes, la estabilidad de los compuestos en solución, por espectroscopía de RMN, espectroscopía UV-Vis, conductividad, entre otras.

Estudios de inhibición de CL3pro y PLpro de SARS-CoV-2

Las formas recombinantes de CL3pro and PLpro de SARS-CoV-2 se expresaron en *Escherichia coli* y purificaron a homogeneidad de acuerdo a protocolos previamente establecidos 42,43. El tamizaje de todos los compuestos se realizó en placas de 384 pocillos empleando sustratos peptídicos específicos para cada enzima conjugados a diferentes fluoróforos (Dabcyl-KTSAVLQ?SGFRKM-E(Edans)-NH₂ para CL3pro, y Dabcyl-RELNGG?APIK E(Edans)-NH₂ o RELNGG?AMC para PLpro; Biosystems). Los compuestos fueron ensayados por al menos duplicado a una concentración de 10 μM. El ensayo se realizó a concentraciones sub-KM de sustratos y en la presencia de agente reductor (DTT) para facilitar la identificación de inhibidores competitivos y evitar inhibición no específica por compuestos con grupos/átomos electrófilos, respectivamente. Se empleó un lector de placas Varioskan Flash y los valores de actividad fueron normalizados contra los correspondientes controles (reacción en presencia de vehículo o en ausencia de proteasa). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de relación estructura-actividad. Fueron considerados hits aquellos compuestos que mostraron una actividad inhibitoria de CL3pro o PLpro ?50% a 10 ?M.

La inhibición de las proteasas por los hits de primera o segunda generación fue determinada bajo condiciones de estado-estable. Para distinguir mecanismos de inhibición reversibles de irreversibles, la reacción se realizó a concentraciones supra-estequiométricas de inhibidor seguido de la evaluación de la actividad proteolítica remanente luego de remover el exceso del inhibidor. Los inhibidores covalentes fueron verificados por la ausencia de actividad enzimática luego de gel

filtrar mezclas de enzima-inhibidor, y mediante confirmación de la modificación y, en la medida de lo posible, el residuo proteico blanco, por espectrometría de masas (servicio disponible en el Institut Pasteur de Montevideo). Para inhibidores reversibles, el modo de inhibición (competitivo, no-competitivo, mixto) y la constante de disociación del inhibidor (K_i) fué determinada bajo condiciones de estado-estable en la presencia de concentraciones variables de sustrato e inhibidor 44,45. Las constantes cinéticas de la unión enzima-inhibidor fueron estudiadas mediante el análisis del estado pre-estacionario de la fase de inhibición de la enzima 46.

Resultados, análisis y discusión

Durante los primeros meses de ejecución del proyecto, se preparó un gran número de compuestos ya conocidos por nuestro grupo para la evaluación de su actividad inhibitoria frente a las enzimas 3CLPro y PLPro. Los primeros tamizados de evaluación comenzaron con compuestos de la serie de derivados de cumarina-tiosemicarbazona frente a la enzima 3CLPro, en concentraciones fijas (10 μ M), en presencia y ausencia de DTT. Estos derivados, presentados en la figura 1, no presentaron una actividad inhibitoria significativa (90 % o más de actividad enzimática remanente) en esta etapa.

El derivado selenado (figura 2) que fue evaluado en las mismas condiciones, presentó una actividad interesante. Debido a esto fue determinado su IC_{50} sobre la enzima 3CLPro, cuyo valor fue 15 μ M.

Posteriormente, se extendió la síntesis a nuevas moléculas orgánicas derivadas de las presentadas en la figura 1, con diversos sustituyentes, cómo se puede observar en la figura 3. Estas moléculas fueron caracterizadas exhaustivamente, y los ensayos de inhibición de MPro se encuentran en curso.

Con respecto a compuestos de coordinación, se evaluaron los compuestos de fórmula genérica [MLPPh₃], M = Pd(II) o Pt(II), con H₂L = derivado de cumarintiosemicarbazona. Estos compuestos resultaron también en una actividad inhibitoria baja, sin embargo, la coordinación a Pd y Pt mejoró la actividad llegando a alcanzar actividades remanentes del 60 % en algunos casos (40 % de inhibición).

Si bien estos compuestos mejoraron la actividad respecto al ligando libre, fueron considerados poco activos y solo un compuesto (Figura 4, M = Pd(II), R₁ = Fenil) fue evaluado para determinar su IC_{50} (10 μ M). En el segundo año de proyecto, este compuesto fue evaluado como inhibidor de la proteasa Papain Like (PL) para evaluar blancos alternativos. En dicha proteasa, provocó una disminución de la actividad a un 32 % de actividad remanente a 10 μ M del complejo.

Por esta dualidad de mecanismo, se decidió evaluar este complejo en ensayos in vitro con un modelo de infección de SARS-CoV-2 en el Institut Pasteur de Korea. En estos experimentos, el complejo presentó un $IC_{50} > 50$ y un índice de selectividad de 1, por lo cual no se continuó estudiándolo.

Posteriormente, se prepararon algunos de los compuestos análogos de Pd, conteniendo como coligando Cl en lugar de PPh₃ (Figura 4). Estos presentaron una mayor actividad inhibitoria de MPro (IC_{50} menores a 3 μ M en varios casos) y fueron evaluados desde el punto de vista de su toxicidad para células A549 (células de epitelio alveolar). No se encontró una toxicidad alta, por lo cual se enviaron al Institut Pasteur de Korea para realizar los ensayos en modelo de infección viral antes mencionados. Los complejos conteniendo M = Pd(II) y R₁ = Etil o Fenil (Figura 5) presentaron $IC_{50} > 50 \mu$ M y un índice de selectividad de 1, por lo cual no se continuó estudiándolo. El compuesto de Pd cuyo R₁ = metil todavía continúa siendo evaluado.

Otra familia de compuestos orgánicos preparada y evaluada, contiene compuestos del tipo benzaldehído-tiosemicarbazona y acetofenona-tiosemicarbazona (Figura 6). Estos compuestos fueron preparados ya que se habían observado resultados interesantes con compuestos de este tipo en el grupo de la Dra. Mahler. Estos compuestos resultaron significativamente más activos que los derivados de cumarina, presentando IC_{50} de inhibición de 3CLPro menores que 10 μ M en algunos casos.

En esta etapa fueron utilizadas las retroalimentaciones recibidas de las etapas anteriores de evaluación, para el diseño estructural de los nuevos compuestos (Actividad 5). Por un lado, se utilizó como sustituyente sobre el nitrógeno de la porción tiosemicarbazona (ver R₁ en Figura 2 y Figura 3) ya que los compuestos conteniendo este sustituyente resultaron ligeramente más activos. Por otra parte, si bien fueron preparados los derivados con coligando trifenilfosfina, estos no fueron priorizados para su evaluación ya que, como demostraron los resultados anteriores, la presencia de dicho coligando es desfavorable para la actividad de los compuestos. Con estos ligandos, se prepararon compuestos conteniendo Cl como coligando (Figura 6) Nuevamente, la coordinación a Pd y Pt mejoró la actividad en ambos casos, alcanzando para los complejos IC_{50} de orden sub-micromolar. No se observó una diferencia significativa de las actividades entre los compuestos de Pt y Pd.

Los compuestos que fueron evaluados en el Institut Pasteur de Korea en el ensayo de infección viral se muestran en la figura 7. El ligando que alcanzó esta etapa avanzada de evaluación, no presentó una actividad remarcable. En cuanto a los compuestos de coordinación hubo mayor variabilidad, siendo el complejo derivado de Pt con 5-Br-salicilaldehído-n-feniltiosemicarbazona el compuesto que presentó una mayor actividad y también un mejor índice de selectividad. En ese sentido, si bien se estableció una influencia positiva de la coordinación a Pd(II) o Pt(II) sobre la actividad de los ligandos

libres, no se pudo establecer una tendencia clara entre cual metal es más adecuado para modular la actividad de los compuestos.

En base a los resultados obtenidos en este proyecto, se continuarán diseñando y preparando nuevos compuestos orgánicos y sus complejos metálicos con el fin de obtener nuevos hits, en el marco de nuevos proyectos del grupo de investigación.

En paralelo a la realización de estos estudios de inhibición enzimática *in vitro*, se fue optimizando el modelo de anclaje molecular. Para esto se utilizó la estructura cristalina reportada en la base de datos de proteínas "Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB" con el código 7JUN. Esta estructura fue elucidada por medio de difracción de neutrones, lo cual proporcionó el estado de protonación de partida para el modelo. El método fue validado con distintos inhibidores reportados, de pesos moleculares de similar orden que los compuestos a estudiar, comparando la pose obtenida con la pose reportada en la estructura cristalina correspondiente encontrada en la PDB. Las soluciones fueron seleccionadas siguiendo el criterio siguiente: se tomó el clúster con las 10 primeras soluciones, que tuviera un RMSD menor o igual a 0.92 Å. Se eligió la solución con mejor GoldScore dentro de dicho clúster. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 8 el resultado para uno de los inhibidores probados, para el cual el RMSD de la solución del docking respecto a la pose en la estructura cristalina fue de 3.1 Å. Los resultados de docking molecular para los compuestos estudiados, permitieron comprender una posible explicación para los resultados biológicos obtenidos hasta el momento. Comparando una misma familia de compuestos, se puede visualizar a través de los estudios de docking las distintas posibilidades de interacción de los compuestos con la proteína. En el caso de los compuestos conteniendo PPh3 como coligando, la pose que se obtiene como resultado, presenta este coligando (que está unido por un enlace de naturaleza estable e inerte al metal) orientado hacia el sitio catalítico de la enzima, el tiol correspondiente a la cisteína CYS145. Esta interacción es de carácter débil, del tipo hidrofóbico, como se puede observar en la Figura 9. Al realizar el estudio análogo para el compuesto conteniendo cloruro como coligando, se observa que este también se orienta hacia la cisteína catalítica, CYS145 (Figura 10).

Sin embargo, en este caso, el modelo no contempla la posibilidad de hidrólisis de este cloruro, que es de naturaleza lábil. Es por esto, que usando la aproximación propuesta por Marechal et al. se realizaron estudios de docking con el análogo sin coligando, con una posición de coordinación libre (Figura 11). En estos estudios se observó una interacción del tipo coordinativa entre el ión metálico y el azufre de la cisteína catalítica, CYS145. Estos resultados podrían explicar el hecho de que el coligando cloruro es más favorable para lograr una actividad inhibitoria mayor sobre 3CLPro.

En cuanto al modelo de anclaje molecular optimizado, además de permitir explicar de forma cualitativa ciertas tendencias observadas, se continuará trabajando en la obtención de parámetros que permitan la correlación con actividades experimentales observadas en este proyecto, y en proyectos relacionados. Adicionalmente, se trabaja actualmente en un modelo de QSAR para correlacionar la gran cantidad de datos de inhibición de MPro generado en el presente proyecto y en proyectos futuros, con los parámetros que se han obtenido de los estudios de anclaje molecular.

Conclusiones y recomendaciones

En este proyecto se sintetizaron y caracterizaron más de 20 compuestos orgánicos entre híbridos del tipo cumarina-tiosemicarbazona, un análogo bioisotérico selenado y compuestos del tipo benzaldehído-tiosemicarbazona y acetofenona-tiosemicarbazona. Algunos de estos compuestos ya se encontraban publicados previamente, mientras que otros fueron sintetizados por primera vez en este trabajo. A su vez, se sintetizaron más de 30 compuestos de coordinación con centros metálicos de Pd(II) y Pt(II), de los cuales casi la totalidad son compuestos que no habían sido previamente reportados, o que fueron previamente sintetizados en la tesis de Doctorado del responsable del proyecto. Todos los compuestos obtenidos fueron evaluados en ensayos de tamizaje primario para comprobar su potencial inhibidor de la enzima MPro. Para aquellos compuestos que alcanzaron una determinada actividad, el IC50 de inhibición de MPro fue determinado. A su vez, los mejores compuestos fueron enviados al Institut Pasteur de Korea donde fueron evaluados en un modelo de infección viral *in vitro*. A su vez, se llevaron a cabo otros estudios paralelos como por ejemplo la evaluación de la citotoxicidad para modelos celulares de hospedero para los compuestos de interés. Acompañando el proceso de la evaluación de estos compuestos como inhibidores se llevó a cabo una puesta a punto de una metodología *in silico* para evaluar el potencial como inhibidores de MPro de compuestos obtenidos, utilizando técnicas computacionales de anclaje molecular (docking).

De este proyecto, se desprenden las siguientes conclusiones en cuanto al diseño de inhibidores de la proteasa principal de SARS-CoV-2, MPro:

- Los híbridos cumarina-tiosemicarbazona presentan algún tipo de actividad inhibitoria de MPro, pero en concentraciones altas. Esto hace que no se los considere como buenos inhibidores de esta proteasa
- Los compuestos del tipo benzaldehído-tiosemicarbazona y acetofenona-tiosemicarbazona presentaron también actividades inhibitorias bajas, sin embargo, mejores en general que las de los híbridos antes mencionados.
- El derivado selenado estudiado presentó una mayor inhibición de MPro

- La coordinación a Pd(II) y Pt(II) funciona como una estrategia de mejora de la inhibición, aumentando en general la actividad inhibitoria de MPro en compuestos conteniendo estos metales, respecto a los ligandos libres.
- En algunos casos, los compuestos de Pt(II) presentaron una actividad mejor que los de Pd(II), sin embargo, esta diferencia no fue suficientemente marcada como para afirmar que existe una tendencia general en que los complejos de Pt(II) sean mejores inhibidores de MPro que los de Pd(II)
- La presencia de coligandos afecta a la actividad inhibitoria de MPro. En particular, un coligando Cl da lugar a compuestos más activos que el coligando PPh₃.
- Los estudios de docking permiten modelar la pose de los compuestos en el sitio activo de la enzima. A su vez, la modificación del método realizada para tener en cuenta el potencial de interacción covalente metal – enzima permite postular una explicación para que los compuestos con coligando Cl sean más activos que los compuestos con coligando PPh₃.

Como perspectivas de este trabajo se sugiere:

- Seguir explorando sustituciones sobre los compuestos del tipo cumarina-tiosemicarbazona, que pueden dar lugar a especies más activas.
- Continuar sintetizando compuestos de la familias derivadas de acetofenona y benzaldehído.
- Sintetizar nuevos compuestos con Se (este es un objetivo de un nuevo proyecto financiado por la CSIC-UdelaR en el que participan algunos miembros de este proyecto).
- Evaluar la coordinación a otros metales como Ru(II) que pueden dar lugar a especies más activas y / o menos tóxicas.
- Evaluar otros coligandos que puedan afectar las propiedades de los complejos obtenidos. Por ejemplo, sustituir Cl por otros halógenos y evaluar el efecto.
- Seguir trabajando en el modelo de anclaje molecular para alcanzar un sistema con poder predictivo para la evaluación in silico de compuestos.

Referencias bibliográficas

- 1 B. V Silva and B. NM Silva, *Med. Chem.*, 2017, 13, 110–126.
- 2 C. Pizzo, P. Faral-Tello, G. Yaluff, E. Serna, S. Torres, N. Vera, C. Saiz, C. Robello and G. Mahler, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, 109, 107–113.
- 3 K. J. Kilpin and P. J. Dyson, *Chem. Sci.*, 2013, 4, 1410.
- 4 S. P. Fricker, R. M. Mosi, B. R. Cameron, I. Baird, Y. Zhu, V. Anastassov, J. Cox, P. S. Doyle, E. Hansell, G. Lau, J. Langille, M. Olsen, L. Qin, R. Skerlj, R. S. Y. Wong, Z. Santucci and J. H. McKerrow, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102, 1839–1845.
- 5 Z. Jin, X. Du, Y. Xu, Y. Deng, M. Liu, Y. Zhao, B. Zhang, X. Li, L. Zhang, C. Peng, Y. Duan, J. Yu, L. Wang, K. Yang, F. Liu, R. Jiang, X. Yang, T. You, X. Liu, X. Yang, F. Bai, H. Liu, X. Liu, L. W. Guddat, W. Xu, G. Xiao, C. Qin, Z. Shi, H. Jiang, Z. Rao and H. Yang, *Nature*, 2020, 582, 289–293.
- 6 R. K. Guy, R. S. DiPaola, F. Romanelli and R. E. Dutch, *Science*, 2020, 368, 829–830.
- 7 [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19)).
- 8 Plan Nacional Coronavirus. Montevideo, 20-5-2020.
- 9 K. Leung, J. T. Wu, D. Liu and G. M. Leung, *The Lancet*, 2020, 395, 1382–1393.
- 10 F. Amanat and F. Krammer, *Immunity*, 2020, 52, 583–589.
- 11 T. Phan, *Infect. Genet. Evol.*, 2020, 81, 104260.
- 12 Osipiuk, J., Jedrzejczak, R., Tesar, C., Endres, M., Stols, L., Babnigg, G., Kim, Y., Michalska, K., Joachimiak, A., 2020.
- 13 J. M. Sanders, M. L. Monogue, T. Z. Jodlowski and J. B. Cutrell, *Jama*, 2020, 323, 1824–1836.
- 14 Xue, X., Yu, H., Yang, H., Xue, F., Wu, Z., Shen, W., Li, J., Zhou, Z., Ding, Y., Zhao, Q., Zhang, X.C., Liao, M., Bartlam, M., Rao, Z., .
- 15 C. Pizzo, P. Faral-Tello, G. Salinas, M. Fló, C. Robello, P. Wipf and S. Graciela Mahler, *MedChemComm*, 2012, 3, 362.
- 16 S. A. Khan, K. Zia, S. Ashraf, R. Uddin and Z. Ul-Haq, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2021, 39, 2607–2616.
- 17 A. M. Sayed, A. R. Khattab, A. M. AboulMagd, H. M. Hassan, M. E. Rateb, H. Zaid and U. R. Abdelmohsen, *RSC Adv.*, 2020, 10, 19790–19802.
- 18 M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A. I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J. S. Gancheff, J. D. Maya, C. Olea Azar, D. Gambino and L. Otero, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 2014, 4677–4689.
- 19 B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sánchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M. A. Comini, L. Otero and D. Gambino, *Dalton Trans*, 2012, 41, 1534–1543.
- 20 S. Rostán, N. Alvarez, N. Veiga, L. Otero and G. Mahler, *J. Mol. Struct.*, 2022, 1251, 131980.
- 21 S. Rostán, S. Porto, C. Barboza, D. Assis, N. Alvarez, F. S. Machado, G. Mahler and L. Otero, *J. Biol. Inorg. Chem.*
- 22 G. Sciortino, J. Rodríguez?Guerra Pedregal, A. Lledós, E. Garribba and J. Maréchal, *J. Comput. Chem.*, 2018, 39, 42–51.
- 23 Hyperchem, R.(2002). 7.0 for Window. Molecular Modeling System, Hypercube Inc., Gainesville, FL.
- 24 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, Ma. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci and G. A. Petersson, Wallingford Ct.
- 25 Discovery Studio Visualizer, v3.1.1.11157, Accelrys Software Inc., 2009.
- 26 P. Labute, *J. Chem. Inf. Model.*, 2010, 50, 792–800.
- 27 P. Labute, Molecular Operating Environment (MOE) Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 2014.
- 28 G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach and R. Taylor, *J. Mol. Biol.*, 1997, 267, 727–748.
- 29 Y. W. Chen, C.-P. B. Yiu and K.-Y. Wong, *F1000Research*, 2020, 9, 129.
- 30 A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, 6378–6396.
- 31 A. Bassan, M. R. A. Blomberg and P. E. M. Siegbahn, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, 9, 439–452.
- 32 P. E. M. Siegbahn, *J. Comput. Chem.*, 2001, 22, 1634–1645.
- 33 P. E. M. Siegbahn and M. R. A. Blomberg, *Chem. Rev.*, 2000, 100, 421–438.
- 34 E. G. Lewars, in *Computational Chemistry*, Springer, 2016, pp. 101–191.
- 35 H. Ishihara, M. Koketsu, Y. Fukuta and F. Nada, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 8408–8409.
- 36 M. M. Heravi, S. Sadjadi, H. A. Oskooie, R. H. Shoar and F. F. Bamoharram, *Catal. Commun.*, 2008, 9, 470–474.
- 37 B.-F. Ruan, H.-J. Cheng, J. Ren, H.-L. Li, L.-L. Guo, X.-X. Zhang and C. Liao, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, 103, 185–190.
- 38 M. I. Abida and A. J. Alsalman, *Trop. J. Pharm. Res.*, 2016, 15, 393–404.
- 39 D. Lanari, R. Ballini, A. Palmieri, F. Pizzo and L. Vaccaro, .
- 40 K. Kavitha, D. Srikrishna, P. K. Dubey and P. Aparna, *Lett. Org. Chem.*, 2019, 16, 637–642.
- 41 M. Serda, D. S. Kalinowski, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, A. Szurko, A. Ratuszna, N. Pantarat, Z. Kovacevic, A. M.

Merlot and D. R. Richardson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 5527–5531.

42 L. Zhang, D. Lin, X. Sun, U. Curth, C. Drosten, L. Sauerhering, S. Becker, K. Rox and R. Hilgenfeld, *Science*, 2020, 368, 409–412.

43 K. Ratia, S. Pegan, J. Takayama, K. Sleeman, M. Coughlin, S. Baliji, R. Chaudhuri, W. Fu, B. S. Prabhakar and M. E. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, 105, 16119–16124.

44 A. Medeiros, D. Benítez, R. S. Korn, V. C. Ferreira, E. Barrera, F. Carrión, O. Pritsch, S. Pantano, C. Kunick and C. I. de Oliveira, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2020, 35, 1345–1358.

45 M. Fló, M. Margenat, L. Pellizza, M. Graña, R. Durán, A. Báez, E. Salceda, E. Soto, B. Alvarez and C. Fernández, *PLoS Pathog.*, 2017, 13, e1006169.

46 S. González, M. Fló, M. Margenat, R. Durán, G. González-Sapienza, M. Graña, J. Parkinson, R. M. Maizels, G. Salinas and B. Alvarez, *PloS One*, 2009, 4, e7009.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)