DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PLATAFORMA *IN SILICO* PARA EL DISEÑO RACIONAL DE NUEVOS FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS INHIBIDORES DE CRUZIPAÍNA

Cerutti, Juan Pablo[(1,2,3)*]; Dehaen, Wim[(3)]; Quevedo, Mario A.[(1,2)]

[(1)] Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Córdoba, Argentina; [(2)] MedChem Lab, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, FCQ-UNC, Córdoba, Argentina. [(3)] Laboratory of Organic Synthesis, Department of Chemistry, KU Leuven, Leuven, Bélgica. *jpcerutti@unc.edu.ar

Palabras claves: Cruzipaína, diseño racional basado en estructuras, plataforma de cribado *in silico*.

Cruzipaína (CZP) es la principal cisteína proteasa de *T. cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. Su relevancia en el ciclo vital y la infectividad parasitaria la han posicionado como un blanco terapéutico de interés para el diseño racional basado en estructuras (SBDD) de nuevos fármacos antichagásicos, con numerosos ejemplos de inhibidores tanto covalentes como no covalentes reportados en literatura. Dentro del primer grupo destaca un set de 20 derivados de tetrafluorofenoximetil cetona (4FPMK) como grupo reactivo o "warhead" (WH) y centrados en el grupo 1,2,3-triazol como bioisóstero del enlace peptídico.[1] A pesar del escaso espacio químico explorado y el amplio rango de potencias reportadas (IC50: 0.003 a 23µM), no existen reportes de estudios *in silico* que fundamenten el SAR de estos inhibidores. Asimismo, escasa relevancia se le ha dado a los estados de ionización y a la configuración espacial de los ligandos como factores que puedan afectar el reconocimiento de CZP. En este contexto, se plantea el desarrollo y la puesta a punto de un *workflow in silico* destinado al SBDD de nuevos inhibidores de CZP empleando los 4FPMK reportados como set de entrenamiento.

A tal fin, se diseñó un *workflow* de cinco etapas principales, iniciando por la generación y parametrización de los ligandos a evaluar, que se extendió de 20 a 74 análogos al considerar tanto sus formas neutra y catiónica como ambos diastereómeros evaluados experimentalmente como consecuencia de epimerización alfa. Los estudios de docking molecular empleando AutoDock-GPU y aplicando filtros basados en energía, tamaño de clúster y satisfacción de contactos farmacofóricos permitieron discriminar entre inhibidores de mayor (IC_{50} < 1µM) y menor potencia (IC_{50} > 1µM) frente a CZP, detectar cierta respuesta estereoselectiva y preferencia por ligandos catiónicos, e identificar poses de unión alternativas que fundamentan el SAR respecto a R^1/S1 y R^3/S3. Por su parte, los resultados de dinámica molecular clásica complementados con estudios de energía libre de unión (MMPBSA) mostraron muy buena correlación entre las potencias reportadas y las energías de los complejos de encuentro, señalando la importancia de la complementariedad ligando:blanco mediada por contactos no covalentes incluso para inhibidores covalentes. Finalmente, estudios de dinámica molecular híbrida clásica-cuántica (QM/MM-MD) permitieron no solo postular la vía mecanística de la inactivación de CZP por parte de 4FPMK, sino también reforzar la hipótesis de la estereoselectividad de esta enzima. En conclusión, se diseñó y validó una plataforma destinada al SBDD de nuevos fármacos antichagásicos empleando un set de inhibidores de CZP previamente reportado, alcanzando una excelente correlación entre resultados *in silico* y experimentales; capaz de ser aplicada tanto para el análisis de complejos de unión covalente como no covalente y con buena potencialidad para la exploración de librerías masivas de nuevos candidatos.

Referencias:

[1] Neitz. R.J.; Bryant, C.; Chen, S.; Gut, J.; et al. *Bioorg Med Chem Lett,* **2015**, 25:4834–4837.