



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Institut Pasteur  
de Montevideo

# Proteasas del SARS-CoV-2 como blanco farmacológico. Revisión bibliográfica y ensayo enzimático

Ciclo de Metodología Científica II - Año 2022

Grupo Número 4

## Autores:

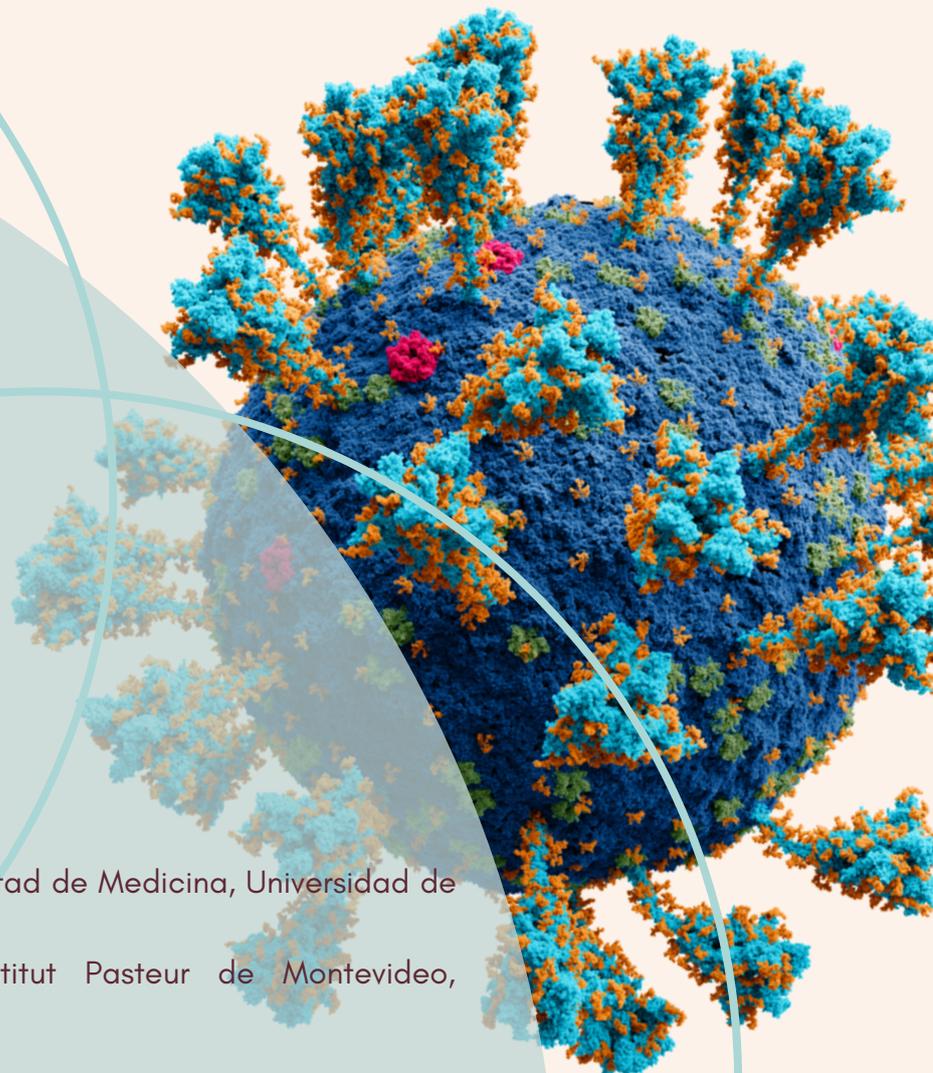
Sebastián Casanova  
María Eugenia Cayota  
Carlos Clavijo  
Joaquín Espiga  
Francisco Estrada  
Soledad Mendivil

## Tutores:

Martín Fló<sup>1, 2</sup>  
Natalia Olivero<sup>1, 2</sup>  
Otto Pritsch<sup>1, 2</sup>

1. Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

2. Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	2
Introducción	3
Objetivos	6
Proteasas del SARS-CoV-2	9
Potenciales opciones terapéuticas para el SARS-CoV-2	15
Resultados del trabajo experimental	16
Discusión de los resultados	21
Conclusiones	23
Agradecimientos	23
Referencias bibliográficas	24

## RESUMEN

Las proteasas “main protease” (M-pro o 3CL-pro) y “papain-like protease” (PL-pro) del SARS-CoV-2 son fundamentales en el ciclo replicativo del virus. En base a esto, las mismas han sido propuestas como blanco terapéutico para el desarrollo de fármacos. Los inhibidores de las proteasas son un estandarte en el campo de la investigación en la lucha contra infecciones virales, presentando muchos de éstos resultados prometedores. El objetivo de este trabajo fue realizar una búsqueda bibliográfica en diferentes plataformas con el fin de recopilar información general sobre ambas proteasas, así como de sus inhibidores haciendo énfasis en Mpro. Por otra parte, nos propusimos una actividad experimental donde cribamos 42 compuestos candidatos a inhibir Mpro. Identificamos 8 compuestos con actividad inhibidora (HIT). A tres de ellos le calculamos el valor de IC50 obteniendo valores comparables con el compuesto de referencia Ebselen, el cual es uno de los compuestos que inhiben Mpro y que actualmente se encuentra en fase II de ensayos clínicos anti SARS-CoV-2.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, COVID-19, Mpro, Ebselen, inhibidores, Cribado.

## Abstract

The proteases “main protease” (M-Pro or 3CL-pro) and “papain-like protease” (PL-Pro) of SARS-CoV-2 are essential for the virus’ replication cycle. Based on this, they have been proposed as therapeutic targets for the development of drugs. Protease inhibitors have been a standard in the research against viral infections , presenting many of these promising results.

The purpose of this work was to make a bibliographic search on different platforms with the intention of collecting information of both proteases, as well as their inhibitors, with emphasis on M-pro. We also decided to carry out an experimental activity, a screening of 42 compounds that were considered as candidates to inhibit M-pro. We identified ten compounds with inhibitory activity (HIT). We calculated the IC50 of three of them, obtaining comparable results in reference to Ebselen, which is one of the compounds that inhibits M-pro and is now in phase II of anti SARS-CoV-2 clinical trials.

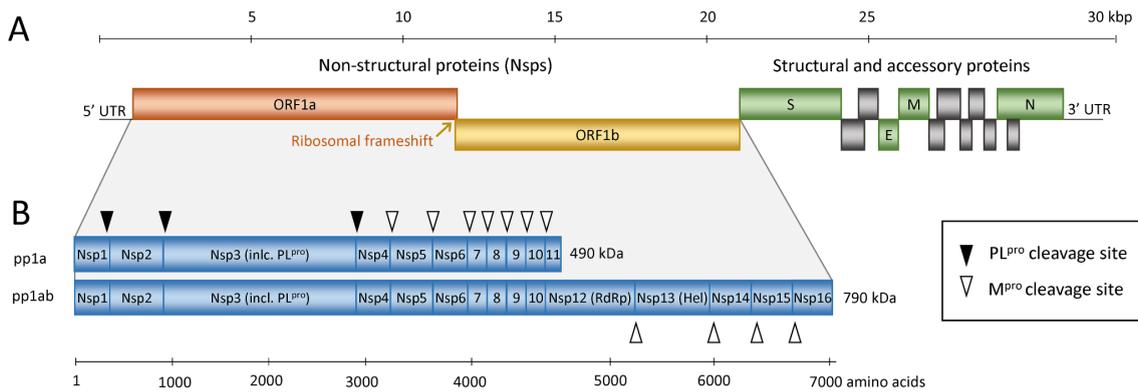
**Key words:** SARS-CoV-2, COVID-19, Mpro, Ebselen, inhibitors, screening

## INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019 China le comunica a la OMS sobre 27 casos de neumonía causada por un agente desconocido hasta el momento, posteriormente identificado como un nuevo virus de la familia *Coronaviridae*, el SARS-CoV-2.(1) Para fines de enero del 2020 la epidemia ya se encontraba instalada en dicho país con la advertencia de la comunidad científica sobre la fácil transmisibilidad y clínicamente severo. En marzo del 2020 la OMS declaró la pandemia mundial por SARS-CoV-2, en Uruguay se registró el primer caso el viernes 13 de marzo de 2020.(2,3) La COVID-19, causada por el SARS-CoV-2, se caracteriza por cuadros respiratorios de sintomatología variada, que pueden cursar desde manifestaciones leves, sin repercusiones en el infectado, hasta cuadros más graves que comprometen sistemas vitales, e inclusive causan la muerte. (4)

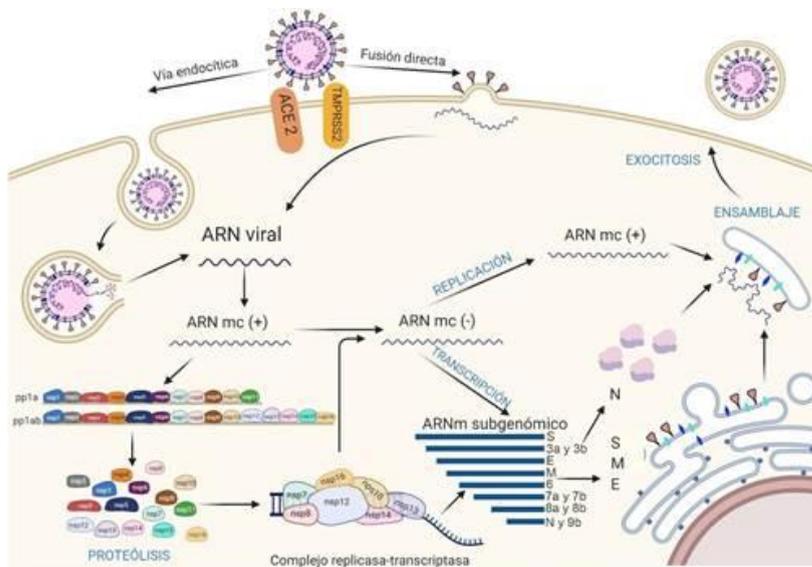
El SARS-CoV-2 se trata de un virus envuelto con genoma ARN monocatenario con polaridad positiva (+ssRNA). Los coronavirus se dividen en cuatro géneros:  $\alpha$ -coronavirus,  $\beta$ -coronavirus,  $\gamma$ -coronavirus y  $\delta$ -coronavirus, siendo el SARS-CoV-2 un miembro del género de los  $\beta$ -coronavirus. La glicoproteína de superficie Spike del SARS-CoV-2 (proteína S) interactúa con la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) de la célula hospedera, promoviendo la endocitosis o fusión de la membrana celular con la envoltura viral. De esta forma, el virus libera su material genético al citosol, el cual será traducido por los ribosomas. (2)

Dos tercios del genoma del SARS-CoV-2 están conformados por dos marcos de lectura abiertos (ORF) los cuales se traducen a dos grandes poliproteínas llamadas pp1a y pp1ab. La escisión de las mismas es llevada a cabo por dos proteasas de cisteína, una similar a la papaína ("*papain-like protease*", PLpro) y la otra estructuralmente similar a la quimotripsina ("*3-chymotrypsin-like proteases*", 3CLpro, o también llamada "*main proteases*", Mpro(3–5)). Este procesamiento dará lugar a 16 proteínas no estructurales (NSP) entre ellas ambas proteasas, que tienen un rol fundamental en el ciclo replicativo viral (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática del genoma del SARS CoV-2 y los sitios de escisión de las proteasas.(6)

El tercio restante codifica para las proteínas estructurales (S,E,M y N) y las accesorias. La interacción entre la proteína N y el ARN genómico viral forma la nucleocápside en el citosol, por otra parte, las proteínas S, E y M se dirigen al RER (Retículo Endoplásmico Rugoso) para ser procesadas. La nucleocápside será reclutada en un compartimento que se encuentra entre el RER y el aparato de Golgi llamado CIREG (Compartimento Intermedio RE-Golgi o ERGIC en inglés), produciéndose finalmente el ensamblaje y la exocitosis de las partículas virales (Figura 2).(3–5)



**Figura 2.** Ciclo de multiplicación de SARS-CoV-2. Luego del reconocimiento del receptor celular ACE2, el virus ingresa a la célula mediante 2 vías distintas: endocitosis y fusión de las membranas viral y celular. El ARN monocatenario en sentido positivo se traduce en las poliproteínas pp1a y pp1ab. Luego se produce el autoclivaje por M<sup>pro</sup> y PL<sup>pro</sup>

generando las 16 NSP (Nonstructural proteins) que formarán el complejo replicasa transcriptasa (RTC). El RTC sintetizará el ARN subgenómico (ARN sg) que codificará las proteínas S, M y E ensambladas en el retículo endoplasmático previo a ser transportadas al RE-Golgi. En este último es donde se asociará con el nuevo ARN genómico y la proteína N. Finalmente las partículas virales son exportadas mediante exocitosis fuera de la célula.(7)

En la actualidad las vacunas y los anticuerpos neutralizantes son la principal herramienta utilizada contra SARS-CoV-2. Sin embargo, para poder controlar esta enfermedad la comunidad científica considera necesario el desarrollo de antivirales específicos. En este sentido, las proteasas del SARS-CoV-2 se han descrito como atractivos blancos farmacológicos, dado que poseen un papel crucial en el ciclo replicativo, están muy conservadas evolutivamente y son muy diferentes a las proteasas del hospedero.

Lo mismo ocurre para otros virus, algunos ejemplos son las proteasas de los herpesvirus, alfavirus, adenovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y flavivirus como zika, dengue y el virus de la hepatitis C (VHC). De hecho, las proteasas del VIH y el VHC han sido estudiadas como blancos farmacológicos y se han encontrado inhibidores que dieron lugar al desarrollo de fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) que son al día de hoy la base de terapias antivirales potentes y exitosas.(8–11)

Estudiar las proteasas no es sólo relevante para combatir patógenos sino también para tratar enfermedades no infecciosas. Debido a que las proteasas cumplen diversas funciones celulares, lo que requiere que estas enzimas sean altamente reguladas. La relación proteasa-inhibidor de proteasa (IP) ha sido analizada desde hace mucho tiempo, ya sea desde un enfoque relacionado con el estudio de enfermedades como con uno farmacológico. Esto determinó las directivas para el estudio y desarrollo de inhibidores naturales y sintéticos buscando el control de distintas enfermedades.(11–14)

En este trabajo se realizó un estudio bibliográfico de las estructuras y funciones de las proteasas del SARS-CoV-2, así como de los inhibidores encontrados y caracterizados hasta el momento. Además se llevó a cabo una actividad experimental en el laboratorio donde se analizaron compuestos preseleccionados candidatos a tener actividad inhibidora de las proteasas mencionadas.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo General:**

El objetivo general de este trabajo es recopilar conocimientos sobre las características de las proteasas virales del SARS-CoV-2 y su potencial uso como blanco farmacéutico para el tratamiento de la "COVID-19". Además, realizar una actividad experimental en el laboratorio de búsqueda de compuestos con actividad anti proteasa Mpro.

### **Objetivos específicos:**

1. Estudiar la estructura y funciones de las proteasas Mpro y PLpro del SARS-CoV-2
2. Describir los mecanismos de inhibición enzimática orientado a las proteasas.
3. Describir brevemente compuestos con actividad anti-Mpro encontrados en la bibliografía.
4. Analizar mediante ensayo experimental compuestos preseleccionados candidatos a tener actividad inhibidora sobre la proteasa Mpro y determinar el IC50 de los mismos.

## **METODOLOGÍAS APLICADAS**

### **METODOLOGÍA DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA**

Se realizó una reseña bibliográfica narrativa de los elementos que consideramos más importantes respecto a las proteasas Mpro y PLpro del SARS-CoV-2, así como de los inhibidores de la Mpro que presentaron inhibición en etapas preclínicas (estudios *in vitro* que fueran realizados en células) y clínicas. Se realizó la búsqueda en las bases de datos PubMed, Portal Timbó, Scielo, Cochrane, y Google académico, para ello se utilizaron las siguientes palabras en combinación: "sars cov-2" "protease inhibitor" "Mpro" "PLpro", "NSP3", "NSP5" "drug design", "drug discovery". Como criterio temporal se utilizarán publicaciones cuyo intervalo de tiempo sea a partir del año 2019 hasta al año corriente (2022).

## METODOLOGÍA DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Para analizar compuestos candidatos a tener actividad inhibidora sobre la proteasa MPro se realizó el análisis de la actividad enzimática utilizando sustratos peptídicos fluorogénicos en presencia y ausencia de los compuestos candidatos. El Laboratorio de Inmunovirología cuenta con un sistema de producción y purificación de la proteasa Mpro recombinante expresada en *E. coli*, a partir del cual se puede obtener la enzima en forma soluble, pura y activa. También han puesto a punto un ensayo para medir la actividad de la enzima mediante el uso de un sustrato peptídico fluorogénico. El sustrato cuenta con 12 aminoácidos que incluyen la secuencia de uno de los sitios de hidrólisis de Mpro, asociado a 2 fluoróforos (Dabcyl y Edans). El segundo aminoácido de este péptido es un ácido glutámico modificado con la adición del fluoróforo [EDANS, 5- (amino 2-aminoetil)-1-naftaleno sulfonato]. El aminoácido ubicado en la posición 11 es una Lisina modificada por la adición de un cromóforo aceptor (DABCYL, 4'-Dimetilaminoazobenceno-4-carboxilato).

Los aminoácidos modificados están en lados opuestos del sitio de escisión. Cuando se excita a 340 nm, EDANS emite a 490 nm, pero la orientación espacial y superposición de DABCYL absorbe la emisión ya que EDANS fluoresce a una longitud de onda en la que DABCYL absorbe esa fluorescencia, por lo que no se ve señal si están lo suficientemente próximos. Cuando el péptido se escinde por la proteasa, el grupo DABCYL ya no es proximal al fluoróforo, y se observa la fluorescencia. Se grafica EDANS en el tiempo, y se puede observar como aumenta la fluorescencia a medida que transcurre el tiempo, producto del continuo clivado del sustrato, lo que traduce actividad de la proteasa (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismo cinético de Mpro sobre el sustrato peptídico fluorogénico.

Para el ensayo se utilizaron placas de fluorescencia de 96 pozos para cribar varios compuestos y un fluorímetro para medir la actividad. Se asegura que el ensayo muestra parámetros satisfactorios de señal-ruido así como del factor Z'. Se analizaron 42 compuestos de una quimioteca de alta diversidad química (más de 2.000 compuestos).

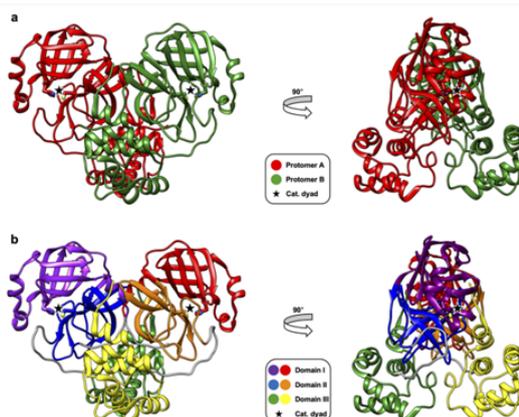
Los compuestos se seleccionan de forma racional según su similitud con compuestos con actividad inhibidora de Mpro que estén reportados en la literatura. Los ensayos se realizaron en buffer de reacción (20 mM tris 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4) con 5  $\mu$ M de sustrato, 90 nM de proteasa y 10  $\mu$ M de inhibidor a 25 °C. La enzima se incubó con el inhibidor durante 1 hora en el buffer de reacción a 25°C. Luego se inició la reacción agregando sustrato. Se colocó la placa en el fluorímetro, se realizaron medidas cada 30 segundos durante 1 hora y se obtienen las curvas a partir de las cuales analiza cómo se comporta la actividad enzimática respecto a cada uno de los compuestos a lo largo del tiempo. Se deben determinar criterios para considerar la inhibición, así como la concentración de compuestos a usar. Al ser un cribado, se utiliza la misma concentración de compuesto en cada reacción. Además, se utilizó como control positivo del experimento, un pocillo sin inhibidor, con la enzima y el sustrato. Y dos controles negativos, el primero donde el pocillo contenga el sustrato (sin la enzima ni el inhibidor) y el segundo contiene Ebselen (conocido inhibidor irreversible de Mpro), junto con la enzima y el sustrato. Cada condición control se realizó por triplicado y cada compuesto por duplicado. Se analiza la actividad de la enzima mediante la fluorescencia a los 45 minutos de iniciada la reacción así como la pendiente de cada curso temporal en su fase lineal. Se realizó el promedio de cada triplicado/duplicado  $\pm$  desvío estándar, se considera que se encuentra un compuesto actividad inhibidora (HIT) cuando disminuye la actividad de la enzima en al menos un 50 %. Posteriormente, se procede a realizar la caracterización de los inhibidores. Si a partir del cribado, es detectado algún HITs se puede analizar cómo se ve afectada la actividad de la enzima en función de la concentración del inhibidor, permitiendo determinar valores de IC50 (concentración inhibitoria de un 50%). Para estos ensayos, se inicia la reacción al agregar sustrato a una mezcla con inhibidor y enzima pre-incubada una hora a 25 °C. Se determinará el valor de IC50 a partir del ajuste de los datos obtenidos utilizando el programa Origin 8.6 a la función  $Y = \min + (\max - \min) / [1 + (x / EC50)^H]$ , donde Y es el efecto del inhibidor, x es la concentración, máx y min son el máximo y efectos mínimos, EC50 es la concentración a la que se obtiene el 50% del efecto y H es el coeficiente de Hill. Se reportan los valores de IC50 como el promedio de cada triplicado  $\pm$  desvío estándar. Finalmente, a los inhibidores más potentes (IC50 de menor valor) se les compara el valor de IC50 con los reportados para Ebselen en la literatura así como el obtenido en la actividad experimental.

## Proteasas del SARS-CoV-2

### Mpro

Es una proteasa de cisteína también llamada 3CL o NSP5, su tamaño es de 33796.8 Da y posee una homología del 96% con la Mpro del virus SARS-CoV. Se trata de una proteína altamente conservada en todos los coronavirus, lo cual en conjunto con su función indispensable en el ciclo de replicación viral y el hecho de que no es una proteasa similar a las encontradas en el cuerpo humano, hacen que sea una atractiva opción terapéutica de amplio espectro y que su inhibición conlleve menor riesgo de toxicidad.(12–15).

La Mpro en su estado inactivo es un homodímero, y cada protómero está compuesto por tres dominios: I, II y III. El dominio I va desde el residuo de aminoácidos 8 al 101, el dominio II del 102 a 184 y el III de 201 a 306. Los dominios I y II están compuestos ambos por seis láminas beta antiparalelas, en cambio el dominio III está compuesto por cinco hélices alfa. El dominio III se conecta con el II mediante un largo bucle (residuos 185 a 200) denominado “long loop región” o “n-finger”, además tiene una topología única en CoV que se requiere para la formación de homodímeros. Los dos protómeros están unidos por el dominio III, y están estabilizados gracias a los N-fingers, que se sitúan entre ambos protómeros. Tal es la importancia de dicha estabilización, que si eliminamos la porción del N-finger, la actividad de la proteasa se vuelve casi nula. Igualmente, está en discusión si el rol del N-finger radica en la unión de ambos monómeros, o en la actividad proteasa, la evidencia tiende a inclinarse hacia esta última (Figura 4).(12–15)



**Figura 4.** Estructura cristalina de rayos X del homodímero Mpro del SARS-CoV-2. Se indican los residuos de la díada catalítica (His41/Cys145). (A) Protómeros . (B) Dominios del protómero (16)

El dominio III es relativamente independiente desde el punto de vista estructural, pero se ha propuesto su importancia nivel del autoclivaje inicial que realizará ésta proteasa

para liberarse de la poliproteína, ya que se plantea que el C- terminal de éste dominio puede adoptar determinadas posiciones que le permitirían unirse al sitio activo de otras Mpro. Luego de liberarse a sí misma la Mpro dimeriza y adquiere su forma activa, la cuál que se encargará de hidrolizar a las poliproteínas del SARS-CoV-2 en once sitios y generará así las formas activas de las NSP de la 5 a la 16. Y para ello, reconoce secuencias aminoacídicas de L-Q↓-(S/A/G).(12–15)

El sitio activo de la enzima se encuentra en la hendidura generada entre los dominios I y II.(15–18). Posee 4 subsitios (S1', S1, S2, S3), en el bolsillo S1' el tercer elemento catalítico está ausente, es compensado por la presencia de una molécula de H<sub>2</sub>O. En el sitio de unión a sustratos de la enzima se han descrito varios subsitios: S1', S1, S2', S2, S3, S3', S4' y S4. Pero se ha observado que los subsitios S1', S1, S2 y S4 son lo más selectivos y por eso más atractivos desde el punto de vista farmacológico.(12–15)

El S1 es el subsitio más selectivo, donde se ha demostrado que glutamina es el aminoácido que se une en este sector. Compuesto por las cadenas laterales de F140, N142, S144, H163, E166, H172, las cadenas principales de F140, L141, N142 y M165 y el primer residuo del protómero vecino. (12–15)

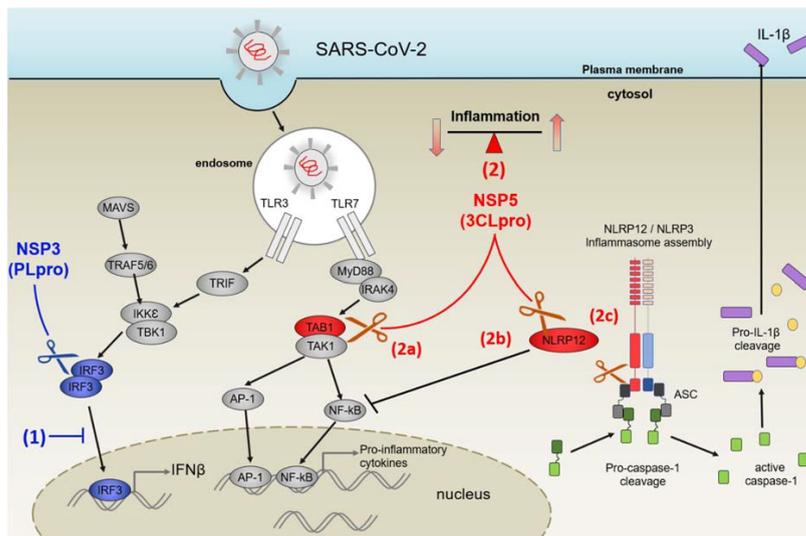
El subsitio S1' contiene la díada catalítica conformada por una cisteína encontrada en la posición 145 (Cys145) y una histidina en la posición 41 (His41). Está compuesto además de H41 y C145 por T25, L27 los átomos "BACKBONE" de T26 y C145. Es un subsitio estrecho que sólo puede acomodar residuos con cadenas laterales cortas, se ha demostrado que une entonces aminoácidos como serina y alanina. (12–15)

El subsitio S2 es altamente hidrofóbico, por lo que aminoácidos de cadenas laterales hidrofóbicas pueden acomodarse aquí, como fenilalanina, leucina y valina. Está compuesto por las cadenas laterales de H41, M49, Y54, M165 y la porción alifática de la cadena lateral de D187. El subsitio S4 es pequeño y está conformado por las cadenas laterales de M165, L167, F185 y Q192 y el backbone de Q189. Se describe que puede acomodar aminoácidos como alanina, treonina, valina, prolina, es decir, con cadenas laterales pequeñas. Los otros subsitios, no tan selectivos, si bien no pueden plantearse como inhibidores competitivos, si pueden ser estudiados como modificadores alostéricos de la MPro. (12–15)

### **PLpro**

Los coronavirus poseen una enzima proteasa similar a la papaína llamada PLpro (también conocida como NSP3). PLpro es una proteasa de cisteína que es la proteína no

estructural más grande del SARS-CoV-2 con una masa molecular de 213 kD, la cual es necesaria para que el virus pueda procesar las poliproteínas virales, generar un complejo de replicasa funcional y permitir la propagación viral.(17) Además, PLpro también tiene actividad sobre proteínas del huésped. En el caso de la PLpro del SARS-CoV hidroliza preferentemente proteínas con cadenas de ubiquitina. Por otro lado, PLpro del SARS-CoV-2 hidroliza preferentemente a la proteína similar a la ubiquitina ISG15.(18) Como ya se mencionó, posee una actividad proteolítica, desubiquitinizante y de desglicación, lo cual le permite la inactivación de la vía NF- $\kappa$ B del huésped mediante la escisión del producto génico estimulado por interferón 15 (ISG15) del factor regulador de interferón 3 (IRF3). Esto atenúa las respuestas de interferón tipo I, lo que facilita que el virus eluda la respuesta antiviral del sistema inmunitario. Por lo tanto, la desubiquitinización y la desglicación de las PLPs (papain-like-protease) son vías mediante las cuales el SARS-CoV-2 evade la respuesta inmune del cuerpo humano. (19,19,20)

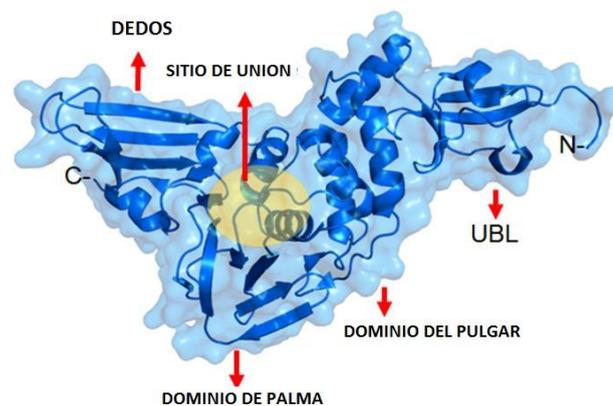


**Figura 5:** Interferencia de la PL-pro de SARS-CoV-2 con la respuesta inmune innata del huésped mediante la escisión directa de IRF3, TAB1 y NLRP12. (1) En azul: PLpro (Nsp3) inhibe la producción de IFN $\beta$  al escindir IRF3. (2) en rojo: 3CLpro podría interferir con la producción de citoquinas proinflamatorias a dos niveles: la escisión de TAB1 inhibiría la activación de NF- $\kappa$ B a través de TAK1 (2a), mientras que la escisión de NLRP12 podría liberar su efecto inhibitorio sobre NF- $\kappa$ B (2b). Además, la escisión de NLRP12 por 3CLpro podría perturbar el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (2c), especialmente porque uno de los sitios de escisión liberaría un dominio PYD de NLRP12. Esto podría desencadenar la escisión de pro-caspasa-1 y mejorar la liberación de IL-1 $\beta$ .(18,21)

La PLpro escinde proteolíticamente los precursores de las poliproteínas virales, pp1a y pp1ab, en tres sitios para producir las proteínas no estructurales Nsp1, Nsp2 y Nsp3. El sitio de unión al sustrato se encuentra entre la palma y el pulgar (Figura 6), el sitio activo está ubicado en la hendidura entre los subdominios de estos, en este sitio se encuentra una tríada catalítica de residuos de cisteína, histidina y ácido aspártico. Tras la unión del inhibidor se cierra la entrada a la hendidura catalítica, mediante un mecanismo de ajuste inducido, formando interacciones intermoleculares con el ligando. (22–26)

Estudios demostraron que su inhibición interfirió en el efecto citopatogénico inducido por el virus, fomentó la vía del interferón antiviral y redujo la replicación viral en las células infectadas. (18)

Esta evidencia sugirió que la PLpro del SARS-CoV-2 puede ser un objetivo prometedor para la intervención terapéutica contra COVID-19. Existen muchos inhibidores conocidos de esta molécula, lo que brinda una oportunidad para el rápido desarrollo de terapias anti-COVID-19 basadas en ella.(27,28)



**Figura 6.** Representación tridimensional de la PLpro (23)

### **Mecanismos de inhibición enzimática orientado a las proteasas**

Los inhibidores enzimáticos interfieren en la catálisis, haciéndolas más lentas o deteniendo las reacciones, es por esto que los mismos se encuentran entre los agentes farmacéuticos más importantes.(29)

Existen dos amplias clases de inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles. Los primeros presentan 3 tipos de inhibición, las que se denomina competitiva, en la que el sustrato compite por el sitio activo de la enzima mientras el inhibidor ocupa el sitio activo e impide la fijación del sustrato. Muchos inhibidores competitivos son

compuestos que se parecen al sustrato y que se combinan con la enzima formando el complejo Enzima-Inhibidor, pero sin llevarlo a la catálisis, Incluso combinaciones transitorias de este tipo afectarán negativamente a la eficiencia de la enzima. Las que se denominan acompetitivo en el que se fija a un sitio distinto al que lo hace el sustrato dentro de el sitio activo y que, a diferencia del inhibidor competitivo, sólo se une al complejo Enzima-Sustrato y no provocan necesariamente cambios conformacionales entre las formas activas e inactivas. La última es la no competitiva o mixta que también se fijan a un sitio distinto al del sustrato, pero lo hacen tanto a la enzima como al complejo Enzima-Sustrato.(29)

Los inhibidores irreversibles son los que se combinan o destruyen un grupo de la enzima que es esencial para su actividad, o aquellos que forman una asociación no covalente muy estable. Es frecuente la formación de un enlace covalente entre un inhibidor irreversible y una enzima. Los inhibidores irreversibles son también muy útiles para estudiar los mecanismos de reacción. Los aminoácidos con funciones catalíticas clave en el sitio activo pueden ser identificados, en ocasiones, determinando qué aminoácido se ha unido covalentemente a un inhibidor después de la inactivación de la enzima.(29)

Dentro de la actividad enzimática el pH juega un rol importante ya que las enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo de pH en el que su actividad es máxima, por ende a valores superiores o inferiores su actividad disminuye. El intervalo de pH en que el cambia la actividad puede proporcionar alguna pista sobre qué aminoácido está implicado(29).

La actividad de las enzimas reguladoras se modula de diversas maneras. Las enzimas alostéricas funcionan a través de la unión reversible, no covalente, de compuestos reguladores denominados moduladores alostéricos, los cuales son generalmente pequeños metabolitos o cofactores. Otras enzimas están reguladas por modificación covalente reversible. Ambas clases de enzimas reguladoras tienden a tener varias subunidades y, en algunos casos, el sitio o los sitios reguladores y el sitio activo se encuentran en subunidades separadas.(29)

Algunas proteasas son estimuladas o inhibidas por proteínas de control a las que se fijan. Otros se activan cuando se eliminan segmentos peptídicos mediante escisión proteolítica, la cual, a diferencia de la regulación mediada por efectores, es irreversible.(29)

La regulación por modificación covalente puede ser del tipo todo o nada o dar lugar a ligeros cambios de actividad. En una misma enzima reguladora pueden darse varios tipos de regulación.(29)

Las enzimas alostéricas son las que presentan otras conformaciones inducidas por la unión de moduladores. Cambios conformacionales inducidos por uno o más moduladores interconvierten formas más activas y menos activas de la enzima. Los moduladores de enzimas alostéricas pueden ser inhibidores o estimuladores. El mismo sustrato es a menudo el modulador, denominados homotrópicos. La unión del sustrato origina cambios conformacionales que afectan a la actividad posterior de otros sitios en la proteína. Cuando el modulador es otra molécula diferente del sustrato, se dice que la enzima es heterotrópica.(29)

Algunas enzimas son reguladas mediante la rotura proteolítica de un precursor enzimático. La escisión de un precursor inactivo, es necesaria para formar la proteasa activa. Dado que este tipo de activación es irreversible, se necesitan otros mecanismos para inactivar estas enzimas. Las enzimas proteolíticas son inactivadas por proteínas inhibidoras que se fijan muy fuertemente al sitio activo de la enzima.(29)

La complejidad en la regulación de la actividad enzimática, se centra en que el control de la catálisis es crítico para la vida. Si todas las reacciones posibles en una célula se catalizarán simultáneamente, las macromoléculas y los metabolitos se degradarían rápidamente a formas químicas más sencillas. Por el contrario, en las células sólo se catalizan las reacciones necesarias en el momento dado.(29)

Los inhibidores de proteasas pueden ser proteínas, péptidos o moléculas pequeñas. Los endógenos o naturales son la mayoría de las veces proteínas o péptidos, mientras que los experimentales utilizados en la investigación son generalmente moléculas pequeñas o péptidos sintéticos. Desde mediados de la década de 1990, más de 30 nuevos inhibidores de la proteasa han ingresado al mercado para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades, incluido el VIH/SIDA.(34)

La inhibición de estas enzimas puede ser conseguida mediante distintos mecanismos, con el diseño de inhibidores reversibles, irreversibles y covalentes reversibles.

Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, por ejemplo, los reversibles no covalentes parecen ser la mejor opción en lo que respecta a la seguridad y riesgo de toxicidad, pero la obtención de estos es costosa, compleja y requiere mucho tiempo. Mientras que la

identificación de compuestos irreversibles es menos dificultosa pero se asocia a mayor riesgo de toxicidad(31)

En el caso de la proteasa del VIH (proteasa aspartato) fue la primera *target* en la que se utilizó el diseño de drogas basado en la estructura para intentar optimizar el diseño de inhibidores.(30)

Se ha expuesto que una relación proteasa-inhibidor de proteasa ideal sería aquella en la que se pueda unir a su blanco de forma reversible, tenga excelente selectividad, buena biodisponibilidad y no presente efectos secundarios. En la industria farmacéutica se prefieren fármacos de unión reversible, para prevenir la antigenicidad que pueden llegar a poseer proteínas modificadas covalentemente de forma permanente y los efectos adversos que eso conlleva.(31)

### Potenciales opciones terapéuticas para el SARS-CoV-2

De los 114 artículos revisados en la plataforma PubMed se seleccionaron aquellos compuestos que presentaron inhibición para la proteasa del SARS-CoV-2 Mpro en estudios *in vitro*, en animales o incluso ensayos clínicos en seres humanos. Asimismo, descartamos aquellos compuestos que presentaron inhibición en estudios realizados *in silico*, ya que mediante diálogo personal con los investigadores de la institución donde realizamos el trabajo se nos brindó la información de que menos del 5% de las predicciones realizadas *in silico* mostraban actividad ensayos *in vitro*. En la tabla 1 se muestran 18 compuestos que cumplieron con los criterios antes mencionados, de los aproximadamente 100 encontrados en la reseña bibliográfica (Tabla 1).

**Tabla 1. Compuestos que presentaron inhibición de la Mpro hallados en la literatura.**

Nombre del Compuesto	Fase de Prueba	Aplicaciones	Referencias
Quercetina y derivados (21, 22)	<i>In vitro</i>	Suplemento dietético.	(32,33)
3-benzyl-1,3-benzothiazol-2-one	<i>In vitro</i> (estudios de citotoxicidad celular y actividad antiviral)	Compuesto de fármacos aprobados como Benzolone, Paraflex, Vinizene, y Tiamamide	(34)
Paxlovid (ritonavir + Nirmatrelvir)	Fase IV	Tratamiento de VHC <sup>1</sup> , VIH <sup>2</sup>	(10)
MG-101	<i>In vitro</i>	-	(35)

Telaprevir	<i>In vitro</i>	Antiviral contra VHC <sup>1</sup>	(36,37)
Boceprevir	<i>In vitro</i>	Antiviral contra VHC <sup>1</sup>	(36,38–40)
Lycorine HCl	<i>In vitro</i>	Enterovirus EV 71	(35)
Mesilato de nelfinavir	<i>In vitro</i>	Inhibidor de la proteasa del VIH	(35)
Disulfiram	Fase II	MERS-CoV, SARS-CoV	(41)
ENSITRELVIR (S-217622)	Fase III		(41)
Ebselen (Harmokisana)	Fase II	Está en investigación para tratamiento del ACV <sup>3</sup> , pérdida auditiva y el trastorno bipolar.	(42,43)
Baicaleína 19	<i>In vitro</i>	Tratamiento la hepatitis y la infección de las vías respiratorias superiores	(33)
EB2-7 / EB2-9 / EB2-19 (derivado del Ebselen)	<i>In vitro</i>	-	(44)
GC-14	<i>In vivo</i>	-	(45)
Bepridil	<i>In vivo</i>	Proporciona una protección del 100 % frente a las infecciones por el virus del Ébola en ratones.	(46)
ALG-097111	<i>In vitro e in vivo</i>	N/A	(47)
Grazoprevir	<i>in vitro</i>	N/A	(48)
Punicalagina	<i>In vitro</i>	VHS - 1 <sup>4</sup> , CMV <sup>5</sup> , VHC <sup>1</sup> , Flu <sup>6</sup> .	(49)

**1.VHC:** Virus hepatitis C **2. VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana **3. ACV:** Accidente cerebrovascular **4. VHS-1:** Virus herpes simple-1 **5. CMV:** Citomegalovirus **6. Flu:** Virus Influenza

## RESULTADOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

En el cribado realizado se analizó la potencial actividad inhibitoria de la Mpro de 42 compuestos.

El tiempo donde se observó la mayor actividad enzimática y por ende mayor fluorescencia en el control positivo (enzima + sustrato) y con valor Z mayor de 0.7 fue a los 2255,7 segundos obteniendo un valor promedio de 7,7 (unidades de fluorometría), los promedios obtenidos de actividad enzimática con los diferentes compuestos fueron de 0 a 17,7 (unidades de fluorometría), indicando que algunos casos inhibieron a la enzima y en otros la potenciaron (Tabla 2). Estos datos se encuentran también

expresados en gráficos de actividad enzimática en función del tiempo. (Figura 7, Figura 8)

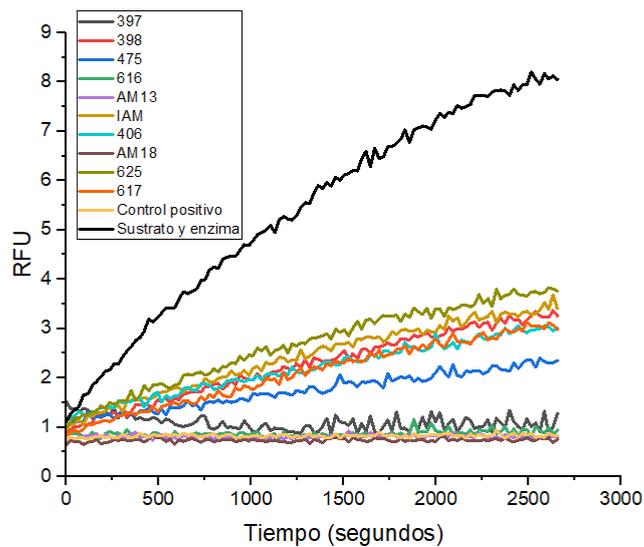
**Tabla. 2 Datos obtenidos en el cribado de compuestos.** Se consideran HIT los compuestos con un promedio de actividad enzimática (Columna “% Promedio”) menor al 50% del promedio de actividad enzimática sin inhibidor (Columna “50% Promedio”).

HIT: 50% corresponde a 3,9.

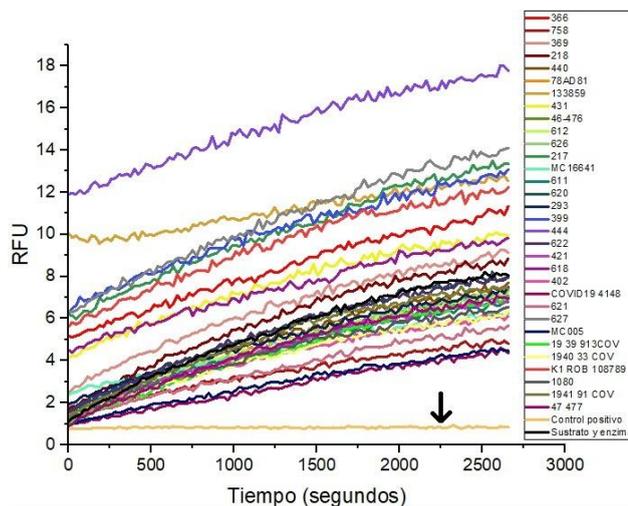
Compuesto	% Viables			% Promedio	% $\sigma$ n-1	50% Promedio	Hit
S + E	7,33	8,10	7,74	7,7	0,4	3,9	
S + E + EBSELEN	0,732677	0,843639	0,893403	0,8	0,1		HIT
366		13,957	6,54399	10,3	5,2		na <sup>1</sup>
758		3,3464	5,93681	4,6	1,8		na
369		8,2773	8,73047	8,5	0,3		na
218		8,48471	7,94519	8,2	0,4		na
440		6,87457	6,9396	6,9	0,0		na
78AD81		7,08993	6,54167	6,8	0,4		na
133859		14,3906	9,90847	12,1	3,2		na
431		10,2616	9,12882	9,7	0,8		na
46-476		6,72863	6,62447	6,7	0,1		na
612		6,97805	6,12237	6,6	0,6		na
626		7,03327	6,59808	6,8	0,3		na
397		1,3025	0,737751	1,0	0,4		HIT
217		18,0713	7,27482	12,7	7,6		na
MC16641		6,06836	5,36875	5,7	0,5		na
611		6,06135	6,42962	6,2	0,3		na
620		7,86125	6,93607	7,4	0,7		na
293		7,49186	6,36625	6,9	0,8		na
398		3,55593	2,65181	3,1	0,6		HIT
399		17,8906	6,81754	12,4	7,8		na
475		1,80287	2,35859	2,1	0,4		HIT
444		17,6411	16,9157	17,3	0,5		na

622		7,70388	7,19367	7,4	0,4		na
421		6,52814	6,23081	6,4	0,2		na
616		0,909886	0,958903	0,9	0,0		HIT
618		13,3741	5,02711	9,2	5,9		na
AM13		0,882959	0,806552	0,8	0,1		HIT
402		4,62308	6,7964	5,7	1,5		na
COVID19 4148		4,01688	4,12476	4,1	0,1		na
621		5,38246	5,1278	5,3	0,2		na
38-470		2,69868	2,80419	2,8	0,1		HIT
627		18,5338	7,73202	13,1	7,6		na
MC005		3,86793	4,70787	4,3	0,6		na
617		3,16866	2,67336	2,9	0,4		HIT
406		3,02663	2,56445	2,8	0,3		HIT
19 39 913COV		6,49669	6,12816	6,3	0,3		na
1940 33 COV		6,41715	5,01056	5,7	1,0		na
K1 ROB 108789		15,6568	7,18982	11,4	6,0		na
IAM		3,18045	3,23281	3,2	0,0		HIT
1080		6,00336	5,97237	6,0	0,0		na
1941 91 COV		7,26678	7,24778	7,3	0,0		na
625		3,53446	3,48996	3,5	0,0		HIT
47 477		6,15492	6,55059	6,4	0,3		na

1. na: no aplica

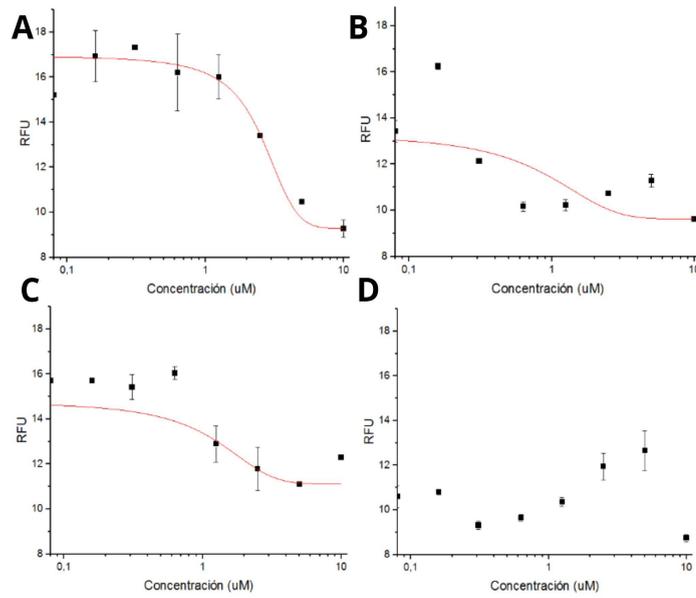


**Figura 7.** En estos gráficos se muestran los compuestos que dieron HIT, graficados el RFU en función del tiempo. Representados también los controles.



**Figura 8.** En este gráfico se muestran los compuestos que no dieron HIT, graficados el RFU en función del tiempo. Representados también los controles, la flecha negra indica el control positivo.

A continuación se seleccionaron 3 compuestos, una Paulona (397) y dos derivados del Ebselen (AM13, AM18) cuyo resultado haya sido HIT: 397, AM13 y AM18 respectivamente, así como Ebselen (con comprobado resultado inhibitorio apoyado por bibliografía) para la realización del IC50, obteniendo los siguientes resultados:



**Figura 9:** Representación gráfica IC50. Se observa el comportamiento de la actividad enzimática en función de concentraciones crecientes de inhibidor. El valor de RFU en del sustrato en ausencia de enzima fue entre 9 y 10 **A.** Ebselen. **B.** AM 18. **C.** 397. **D.** AM13.

**Tabla 3.** Valores de IC50 calculados experimentalmente.

Compuesto	IC50 (LOG(uM))
Ebselen	2,55619
AM18	0,13302
397	0,86119
AM13	N/D

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

De los compuestos encontrados en la búsqueda bibliográfica candidatos a ser antivirales, observamos que la mayoría son de reposición, esto puede estar dado porque nos encontramos en etapas tempranas del desarrollo farmacológico contra el SARS-CoV-2 ya que la pandemia de la enfermedad causada por este virus es relativamente reciente. Pero, el encontrar fármacos que ya han sido aprobados para utilizar en contra de otros virus de otras familias (por ejemplo VHC, VIH, CMV, Enterovirus, VHS, etc) nos hace reflexionar sobre la conservación biológica y la relevancia que tienen las proteasas en el ciclo de replicación viral de muchos virus, fortaleciendo el argumento de que son un blanco farmacológico distintivo y que permitirían la utilización y desarrollo de fármacos con amplio espectro antiviral. A su vez es evidente el beneficio de utilizarlas como objetivo de futuras terapias farmacológicas.

En base al análisis de los resultados obtenidos en el cribado realizado, se comprobó que los compuestos 397, 398, 475, 616, AM13, AM18, 38-470, 617, 406, 625 son HITS inhibiendo al menos el 50% de la actividad de la enzima en unión al sustrato.

Respecto al IC<sub>50</sub> realizado para los 4 compuestos seleccionados AM13, AM18, 397 y Ebselen:

Obtuvimos que para AM18 es 0.13302  $\mu\text{M}$ , para 397 es 0,86119 y para Ebselen 2,55619  $\mu\text{M}$ . En el caso del AM13 el valor del IC<sub>50</sub> no se pudo obtener. Seguramente este resultado se deba a que la concentración de inhibidor fue muy elevada respecto a la concentración de enzima y por esto no fue posible analizarlo.

Dado que el Ebselen tiene una inhibición conocida y estudiada sobre la Mpro, lo utilizamos como referencia para comparar los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para los compuestos analizados. Es difícil establecer la validez de esta comparación con la bibliografía, ya que los resultados no son extrapolables dadas las distintas condiciones de los estudios.

Nuestro valor de IC<sub>50</sub> de Ebselen fue de 2.55619  $\mu\text{M}$ , aproximadamente cuatro veces mayor que el teórico obtenido (IC 50 = 0,67  $\mu\text{M}$ )(13), probablemente como consecuencia de un error experimental. En el caso del AM18 mostró un IC<sub>50</sub> de 0,13302  $\mu\text{M}$  el cuál es 19 veces más bajo en relación al Ebselen, lo que habla de un potencial inhibitorio mayor respecto al control.

Para el 397 el IC<sub>50</sub> calculado es de 0,86119  $\mu\text{M}$  siendo aproximadamente 3 veces menor comparándolo con Ebselen, otro compuesto que demuestra potencial inhibitorio.

Las paulonas son un grupo de 7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepina-6(5H)-onas que muestran actividades inhibitorias contra las proteínas quinasas de la superfamilia CMGC presentes en los mamíferos, son ejemplo de estas las quinasas dependientes de ciclina (CDK) y glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3). La kenpaulona (Figura 10.1a) se usa como inhibidor estándar de la GSK-3 y muestra selectividad frente a una amplia gama de proteínas quinasas (por ejemplo, ERK1, DYRK1A, VEGF-R2, PLK1, INS-R). Las paulonas se unen al sitio de unión del ATP de las quinasas mediante átomos de nitrógeno presentes en la posición número 5, la cual actúa como donante de enlaces de hidrógeno, de ésta forma las paulonas N(5)-sustituidas pierden la actividad inhibitoria sobre la quinasa. (50)

Éstas han demostrado en estudios *in vitro* que poseen inhibición contra proteasas de parásitos como *Leishmania infantum* (*L. infantum*), presentando baja toxicidad celular, motivo por el cual resultan una alternativa terapéutica a desarrollar a futuro.

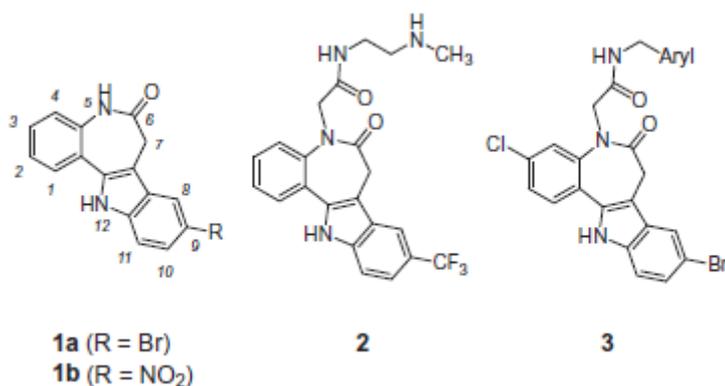


Figura: 10. Paulonas mencionadas en el texto: kenpaulona (1a), alsterpaulona (1b), FS-554 (2), y título compuesto (3).

En el caso de Ebselen (el cual se encuentra en Fase II para su función anti-proteasa) al contar con características farmacocinéticas y farmacodinámicas compatibles para el uso como fármaco, se encuentran actualmente en estudio su uso para otras enfermedades no infecciosas como por ejemplo su potencial uso como antidepresivo en la depresión resistente a fármacos (51), mejorando la sensibilidad a la insulina (52), aliviando la degeneración de cartílago articular(53), entre otros.

## CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos concluir que las proteasas del SARS-CoV-2 son un blanco farmacológico prometedor en la búsqueda de compuestos contra la enfermedad provocada por dicho virus. La investigación de compuestos que inhiban a la proteasa Mpro es un camino alentador para la búsqueda de antivirales de SARS-CoV-2. Finalmente, consideramos interesante avanzar en la investigación de estos compuestos para poder confirmar o rebatir los resultados obtenidos. Actualmente en el instituto donde desarrollamos el trabajo experimental continuará investigando estos compuestos derivados del Ebselen, las paulonas así como otras familias de compuestos en el marco de un proyecto de búsqueda de fármacos para el tratamiento de COVID-19.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al laboratorio Marcelo Comini por brindarnos compuestos químicos de su propiedad para la realización de los ensayos. También a la Facultad de Ciencias por prestarnos los dispositivos electrónicos necesarios para realizar la parte experimental de éste trabajo.

También agradecemos el hecho de haber formado parte por un momento de una gran institución pionera en la investigación en este campo durante la realización de nuestra monografía poniendo a disposición todos sus equipos y lo más importante el gran capital personal.

Dedicamos este trabajo en memoria del profesor Otto Pristch, en agradecimiento a los grandes aportes que durante tantos años de su vida brindó a la docencia y la investigación científica en el Uruguay, y quien además nos guió en el desarrollo de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

1. Jin Z, Wang H, Duan Y, Yang H. The main protease and RNA-dependent RNA polymerase are two prime targets for SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 29 de enero de 2021;538:63-71.
2. Fernando Moreira Simabuco, Rodrigo Esaki Tamura, Isadora Carolina Betim Pavan, Mirian Galliotte Morale, Armando Morais Ventura. Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses. *Genet Mol Biol.* 1 de noviembre de 2020;44(1 suppl 1).
3. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies | Signal Transduction and Targeted Therapy [Internet]. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-00884-5>
4. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol.* 22 de enero de 2021;433(2):166725.
5. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 1 de diciembre de 2020;41(12):1100-15.
6. The role of cysteine peptidases in coronavirus cell entry and replication: The therapeutic potential of cathepsin inhibitors. *PLOS Pathog.* 2 de noviembre de 2020;16(11):e1009013.
7. Cabanillas ERL, Risco AOL, Risco KBL, Hoyos GLL, Zavaleta RML, Tirado E del RL, et al. Bases moleculares de la patogénesis de COVID-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos: Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Rev Fac Med Humana* [Internet]. 8 de febrero de 2021 [citado 25 de mayo de 2022];21(2). Disponible en: <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMH/article/view/3327>
8. Vardanyan R, Hrubby V. Chapter 34 - Antiviral Drugs. En: Vardanyan R, Hrubby V, editores. *Synthesis of Best-Seller Drugs* [Internet]. Boston: Academic Press; 2016 [citado 25 de mayo de 2022]. p. 687-736. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124114920000341>
9. Sharma A, Gupta SP. Chapter 1 - Fundamentals of Viruses and Their Proteases. En: Gupta SP, editor. *Viral Proteases and Their Inhibitors* [Internet]. Academic Press; 2017 [citado 25 de mayo de 2022]. p. 1-24. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128097120000010>
10. Chang KO, Kim Y, Lovell S, Rathnayake AD, Groutas WC. Antiviral Drug Discovery: Norovirus Proteases and Development of Inhibitors. *Viruses.* febrero de 2019;11(2):197.
11. Drag M, Salvesen GS. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* septiembre de 2010;9(9):690-701.
12. Zhao Y, Zhu Y, Liu X, Jin Z, Duan Y, Zhang Q, et al. Structural basis for replicase polyprotein cleavage and substrate specificity of main protease from SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci.* 19 de abril de 2022;119(16):e2117142119.
13. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors | Nature [Internet]. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2223-y>
14. Sun G, Xue L, He Q, Zhao Y, Xu W, Wang Z. Structural insights into SARS-CoV-2 infection and therapeutics development. *Stem Cell Res.* abril de 2021;52:102219.
15. Rohaim MA, El Nagggar RF, Clayton E, Munir M. Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. *Microb Pathog.* enero de 2021;150:104641.

16. Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 de septiembre de 2020;30(17):127377.
17. Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*. 1 de mayo de 2020;10(5):766-88.
18. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity | *Nature* [Internet]. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2601-5>
19. Sa A, S B, S G, T J. Protease targeted COVID-19 drug discovery: What we have learned from the past SARS-CoV inhibitors? *Eur J Med Chem* [Internet]. 4 de mayo de 2021 [citado 15 de noviembre de 2022];215. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33618158/>
20. Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol*. 9 de diciembre de 2011;12(1):35-48.
21. Moustaqil M, Ollivier E, Chiu HP, Van Tol S, Rudolffi-Soto P, Stevens C, et al. SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerg Microbes Infect*. diciembre de 2021;10(1):178-95.
22. Catalytic Triad - an overview | *ScienceDirect Topics* [Internet]. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/catalytic-triad>
23. Amin SA, Banerjee S, Gayen S, Jha T. Protease targeted COVID-19 drug discovery: What we have learned from the past SARS-CoV inhibitors? *Eur J Med Chem*. 5 de abril de 2021;215:113294.
24. Li M, Ye G, Si Y, Shen Z, Liu Z, Shi Y, et al. Structure of the multiple functional domains from coronavirus nonstructural protein 3. *Emerg Microbes Infect*. diciembre de 2021;10(1):66-80.
25. Lata S, Akif M. Comparative protein structure network analysis on 3CLpro from SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. *Proteins*. septiembre de 2021;89(9):1216-25.
26. Dong S, Sun J, Mao Z, Wang L, Lu YL, Li J. A guideline for homology modeling of the proteins from newly discovered betacoronavirus, 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *J Med Virol*. septiembre de 2020;92(9):1542-8.
27. Shanker AK, Bhanu D, Alluri A, Gupta S. Whole-genome sequence analysis and homology modelling of the main protease and non-structural protein 3 of SARS-CoV-2 reveal an aza-peptide and a lead inhibitor with possible antiviral properties. *New J Chem*. 8 de junio de 2020;44(22):9202-12.
28. Rut W, Lv Z, Zmudzinski M, Patchett S, Nayak D, Snipas SJ, et al. Activity profiling and structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2-PLpro protease provides a framework for anti-COVID-19 drug design [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [citado 15 de noviembre de 2022]. p. 2020.04.29.068890. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.29.068890v2>
29. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh edition. New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education; 2017. 1172 p.
30. Ratia K, Pegan S, Takayama J, Sleeman K, Coughlin M, Baliji S, et al. A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication. *Proc Natl Acad Sci*. 21 de octubre de 2008;105(42):16119-24.
31. Cannalire R, Cerchia C, Beccari AR, Di Leva FS, Summa V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of

- the Art and Future Opportunities. *J Med Chem*. 24 de febrero de 2022;65(4):2716-46.
32. Di Pierro F, Iqtadar S, Khan A, Ullah Mumtaz S, Masud Chaudhry M, Bertuccioli A, et al. Potential Clinical Benefits of Quercetin in the Early Stage of COVID-19: Results of a Second, Pilot, Randomized, Controlled and Open-Label Clinical Trial. *Int J Gen Med*. 24 de junio de 2021;14:2807-16.
  33. Dinda B, Dinda M, Dinda S, Chakraborty M. Some natural compounds and their analogues having potent anti- SARS-CoV-2 and anti-proteases activities as lead molecules in drug discovery for COVID-19. *Eur J Med Chem Rep*. diciembre de 2022;6:100079.
  34. J D, M V, S P, F V, Wb Z, V B. Ligand-based discovery of coronavirus main protease inhibitors using MACAW molecular embeddings. *J Enzyme Inhib Med Chem [Internet]*. diciembre de 2023 [citado 15 de noviembre de 2022];38(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36305272/>
  35. Narayanan A, Narwal M, Majowicz SA, Varricchio C, Toner SA, Ballatore C, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay. *Commun Biol*. 25 de febrero de 2022;5(1):1-17.
  36. Qiao J, Li YS, Zeng R, Liu FL, Luo RH, Huang C, et al. SARS-CoV-2 Mpro inhibitors with antiviral activity in a transgenic mouse model. *Science*. 26 de marzo de 2021;371(6536):1374-8.
  37. Bafna K, White K, Harish B, Rosales R, Ramelot TA, Acton TB, et al. Hepatitis C virus drugs that inhibit SARS-CoV-2 papain-like protease synergize with remdesivir to suppress viral replication in cell culture. *Cell Rep [Internet]*. 18 de mayo de 2021 [citado 15 de noviembre de 2022];35(7). Disponible en: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(21\)00472-1](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(21)00472-1)
  38. Farhat A, Ben Hlima H, Khemakhem B, Ben Halima Y, Michaud P, Abdelkafi S, et al. Apigenin analogues as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: In-silico screening approach. *Bioengineered*. 1 de febrero de 2022;13(2):3350-61.
  39. Andi B, Kumaran D, Kreitler DF, Soares AS, Keereetaweep J, Jakoncic J, et al. Hepatitis C virus NS3/4A inhibitors and other drug-like compounds as covalent binders of SARS-CoV-2 main protease. *Sci Rep*. 16 de julio de 2022;12(1):12197.
  40. Ma C, Sacco MD, Hurst B, Townsend JA, Hu Y, Szeto T, et al. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Res*. agosto de 2020;30(8):678-92.
  41. Zhong L, Zhao Z, Peng X, Zou J, Yang S. Recent advances in small-molecular therapeutics for COVID-19. *Precis Clin Med*. 24 de septiembre de 2022;5(4):pbac024.
  42. La Monica G, Bono A, Lauria A, Martorana A. Targeting SARS-CoV-2 Main Protease for Treatment of COVID-19: Covalent Inhibitors Structure–Activity Relationship Insights and Evolution Perspectives. *J Med Chem*. 13 de octubre de 2022;65(19):12500-34.
  43. Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives | *Nature Communications [Internet]*. [citado 15 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23313-7>
  44. Qiao Z, Wei N, Jin L, Zhang H, Luo J, Zhang Y, et al. The Mpro structure-based modifications of ebselen derivatives for improved antiviral activity against SARS-CoV-2 virus. *Bioorganic Chem*. diciembre de 2021;117:105455.
  45. Gao S, Sylvester K, Song L, Claff T, Jing L, Woodson M, et al. Discovery and Crystallographic Studies of Trisubstituted Piperazine Derivatives as

- Non-Covalent SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors with High Target Specificity and Low Toxicity. *J Med Chem.* 13 de octubre de 2022;65(19):13343-64.
46. Vatansever EC, Yang KS, Drelich AK, Kratch KC, Cho CC, Kempaiah KR, et al. Bepridil is potent against SARS-CoV-2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 9 de marzo de 2021;118(10):e2012201118.
  47. Vandyck K, Abdelnabi R, Gupta K, Jochmans D, Jekle A, Deval J, et al. ALG-097111, a potent and selective SARS-CoV-2 3-chymotrypsin-like cysteine protease inhibitor exhibits in vivo efficacy in a Syrian Hamster model. *Biochem Biophys Res Commun.* 28 de mayo de 2021;555:134-9.
  48. Ma L, Li Q, Xie Y, Jianyuan Zhao null, Yi D, Guo S, et al. Repurposing of HIV/HCV protease inhibitors against SARS-CoV-2 3CLpro. *Antiviral Res.* noviembre de 2022;207:105419.
  49. Du R, Cooper L, Chen Z, Lee H, Rong L, Cui Q. Discovery of chebulagic acid and punicalagin as novel allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. *Antiviral Res.* 1 de junio de 2021;190:105075.
  50. Orban OCF, Korn RS, Benítez D, Medeiros A, Preu L, Loaëc N, et al. 5-Substituted 3-chlorokenpauillone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Bioorg Med Chem.* 15 de agosto de 2016;24(16):3790-800.
  51. Ramli FF, Cowen PJ, Godlewska BR. The Potential Use of Ebselen in Treatment-Resistant Depression. *Pharm Basel Switz.* 16 de abril de 2022;15(4):485.
  52. Polianskyte-Prause Z, Tolvanen TA, Lindfors S, Kon K, Hautala LC, Wang H, et al. Ebselen enhances insulin sensitivity and decreases oxidative stress by inhibiting SHIP2 and protects from inflammation in diabetic mice. *Int J Biol Sci.* 2022;18(5):1852-64.
  53. Okuyan HM, Yurtal Z, Karaboğa İ, Kaçmaz F, Kalacı A. Ebselen, an Active Seleno-Organic Compound, Alleviates Articular Cartilage Degeneration in a Rat Model of Knee Osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res.* 11 de noviembre de 2022;