



DESCUBRIMIENTO DE FARMACOS CONTRA BLANCOS MOLECULARES DE SARS-COV-2: DIRIGIDOS A LA INVASION Y REPLICACION CELULAR

Bioquímica Clínica Franca Lorenzelli

Maestría en Biología Celular y Molecular

**Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de
Montevideo**

Orientadores: Dra. Virginia López y Dr. Marcelo Comini

Mayo 2024

Montevideo, Uruguay

DESCUBRIMIENTO DE FARMACOS CONTRA BLANCOS MOLECULARES DE SARS-COV-2: DIRIGIDOS A LA INVASION Y REPLICACION CELULAR

Bioquímica Clínica Franca Lorenzelli

Tesis de Maestría presentada al Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magister en Ciencias Biológicas, opción Biología Celular y Molecular

Tutores: Dra. Virginia López
Dr. Marcelo Comini

Tribunal: Dra. Pilar Moreno (presidenta)
Dra. Cecilia Sainz
Dr. Ari Zeida

Tesis realizada en el Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos en el Institut Pasteur de Montevideo entre marzo del 2021 y mayo del 2024

A mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

A las entidades que permitieron el desarrollo de este proyecto: PEDECIBA, Universidad de la República e Institut Pasteur de Montevideo, ANII, ICGEB y CAP.

A los químicos que brindaron los compuestos:

- Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte, UdelaR
- Laboratorio de Química orgánica medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR
- Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR
- Laboratorio de Síntesis Orgánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR
- Laboratorio de Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos Facultad de Química, UdelaR
- Laboratorio de Biología Vascul y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay
- Laboratorio de Química Fina, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR
- Laboratorio de Química Biológica Ambiental, Sede Rivera, CUR Regional Noreste, UdelaR
- Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay
- Department of Organic Chemistry, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Hungría.
- Laboratorios de Química Orgánica que integraron los consorcios CM0801 y CM1307 de la COST (European Cooperation in Science and Technology).

Al grupo de Alan Talevi del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos de la Universidad Nacional de La Plata, por su colaboración en el cribado computacional de las quimiotecas.

Al grupo de la Plataforma de Screening Discovery del Institut Pasteur de Korea, dirigido por David Shum por realizar los ensayos de actividad antiviral.

A los laboratorios o Unidades del Institut Pasteur de Montevideo que apoyaron de alguna u otra manera el desarrollo de este proyecto: Unidad de Biología Celular, Laboratorio de Inmunovirología, Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal (ProTeMCA). En especial agradecerles a Cecilia y Karen que con mucha amabilidad y paciencia me ayudaron con el desarrollo y ejecución de los experimentos de citometría y citotoxicidad.

A mis tutores, Virginia y Marcelo por el apoyo y las oportunidades brindadas.

A mis compañeros de laboratorios, por las innumerables veces que me apoyaron, por sus consejos, su compañía, este camino no hubiera sido lo mismo sin ellos.

A Tito por estar, por la paciencia infinita y el ánimo constante.

A mis padres por permitirme ser libre y apoyarme siempre en mis elecciones y a mi hermanito por su incondicional.

A mis amigos por su escucha atenta y sus consejos.

A la familia, tíos y primos.

Y finalmente a mis abuelos, por llenarme de tanto amor.

A todos ellos que me enseñan día a día que este viaje que es la vida es mucho más lindo cuando se comparte.

Resumen

El coronavirus SARS-CoV-2 es el agente etiológico de la enfermedad COVID-19 que tuvo en vilo al mundo desde inicios de 2020 hasta 2023. La alta transmisibilidad del virus y la falta inicial de opciones inmunoproliféricas o quimioterápicas posibilitaron la rápida expansión global de esta enfermedad.

Con la intención de aportar conocimiento sobre nuevas moléculas químicas con el potencial de interferir de manera efectiva con el ciclo viral, este proyecto tuvo como objetivo la identificación y caracterización de compuestos químicos capaces de prevenir la invasión viral de la célula huésped. Por su rol relevante en el proceso de reconocimiento e internalización del patógeno, seleccionamos como dianas moleculares a la glicoproteína viral *Spike* y a la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) presente en las células. La *Spike* es una proteína homotrimérica, en la cual cada protómero está compuesto por dos subunidades, S1 y S2. A través del dominio de unión al receptor (RBD) la subunidad S1 se une a ACE2, mientras que la subunidad S2 facilita la fusión de las membranas de la partícula viral y la célula. La interacción RBD-ACE2 es de alta afinidad e involucra múltiples contactos.

En primer lugar, se realizó una búsqueda computacional de análogos estructurales a moléculas descritas en la literatura como inhibidores de la interacción *Spike*/ACE2 en quimiotecas de grupos locales. Se identificaron 266 compuestos pertenecientes a 21 familias químicas diferentes, los cuales fueron tamizados por técnica de ELISA para determinar su capacidad de inhibir la interacción *Spike*/ACE2. De manera complementaria, 30 compuestos *hits* fueron estudiados en un ensayo que evalúa la interacción de los compuestos con RBD en solución y ACE2 expresada en la superficie de células HEK-293 de riñón humano, utilizando citometría de flujo.

La citotoxicidad de los compuestos de interés fue estudiada sobre dos tipos celulares de origen humano que son de relevancia clínica para esta enfermedad (células de epitelio pulmonar y enterocitos). Finalmente, para 20 compuestos *hits* se evaluó su actividad anti-SARS-CoV-2 en un modelo de infección de células Vero (colaboración con el Institut Pasteur de Corea). Cuatro compuestos pertenecientes a distintas familias químicas presentaron actividad antiviral, y dos de ellos con valores de IC₅₀ (6-12 µM) en el rango de fármacos de uso clínico (Remdesivir, Lopinavir y Cloroquina).

Abreviaturas

2019-nCoV - 2019-novel coronavirus

AA - Aminoácido

ACE2 - Angiotensin converting enzyme 2 (Enzima convertidora de angiotensina 2)

ADME - Administración, distribución, metabolismo y excreción

AG - Adipogen (Empresa fabricante de kit de ELISA)

ARN - Ácido ribonucleico

ARNm - ARN mensajero

cap - Casquete

CC₅₀ - Concentración citotóxica 50

CD - Connector domain (Dominio conector)

CH - Central helix (Hélice central)

CMH - Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II

COVID-19 - Coronavirus disease 2019 (Enfermedad por coronavirus 2019)

CoVs - Coronavirus

DMVs - Double membrane vesicles (Vesículas doble membrana)

DO - Densidad óptica

E - Proteína de la envoltura

ECFP - Extended-connectivity fingerprint (Huellas dactilares de conectividad extendida)

EG - EpigenTek (empresa fabricante de kit de ELISA)

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

ExoN - Exonucleasa

FCFP - Functional-Class Fingerprints (Huellas dactilares de la clase funcional)

FP - Fusion peptide (Péptido de fusión)

HR - Heptad repeat region (Secuencia hepta-repetida)

HRP - Horseradish peroxidase (Peroxidasa de rábano)

IC₅₀ - Inhibition concentration 50 (Concentración inhibitoria 50)

IFN tipo I - Interferón de tipo I

mAc - Anticuerpo monoclonal

M - Proteína de membrana

MERS-CoV - Middle East respiratory syndrome coronavirus (Virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio)

M^{pro} - main protease (Proteasa principal)

N - Proteína de la nucleocápside

NF-κB - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Factor nuclear de alargamiento de la cadena liviana kappa de células B activadas)

NSP - Nonstructural protein (Proteína no estructural)

NTD - N-terminal domain (Dominio N-terminal)

ORF - Open reading frame (Marco abierto de lectura abierta)

pAc - Anticuerpo policlonal

PAINS - Pan Assay Interference Compounds (Compuestos de interferencia pan-ensayo)

PFA - Paraformaldehído

PL^{pro} - Papain Like protease (Proteasa similar a la papaína)

PM - Peso molecular

P-P - Proteína-Proteína

PPI - Protein-Protein Interaction (Interacción proteína-proteína)

RBD - Receptor binding domain (Dominio de unión al receptor)

RdRp - RNA dependent RNA polymerase (ARN polimerasa dependiente de ARN)

RE - Retículo endoplasmático

REA - Relación estructura-actividad

RTC - Replication-transcription complex (Complejo de replicación-transcripción)

RT- qPCR - Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa)

S - Glicoproteína *Spike*

SARS-CoV-2 - Severe acute respiratory syndrome *coronavirus* (Virus del síndrome respiratorio agudo severo 2)

SMILES - Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Especificación de introducción lineal molecular simplificada)

TA - Temperatura ambiente

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TMPRSS2 - Transmembrane serine protease 2 (Serina proteasa celular de transmembrana 2)

VHC - virus de la hepatitis C

VIH - virus de la inmunodeficiencia humana

Tabla de contenidos

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN	12
1.1 Introducción.....	13
1.2 Coronavirus	14
1.2.1 Características generales de los coronavirus.....	15
1.3 SARS-CoV-2: ciclo replicativo	17
1.5 <i>Spike</i> /ACE2 como dianas moleculares para el desarrollo de antivirales	30
1.5.1 Glicoproteína <i>Spike</i>	30
1.5.2 ACE2	34
1.5.3 Interacción <i>Spike</i> /ACE2.....	35
1.6. Bloqueo de interacciones proteína-proteína con moléculas orgánicas pequeñas	39
1.7. A cuatro años del comienzo de la pandemia. Tratamientos disponibles contra el SARS-CoV-2.....	43
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	46
2.1 Objetivo General.....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
2.3 Estrategia de trabajo	48
CAPÍTULO 3 – MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 Etapa 1 - Selección <i>in silico</i> de candidatos	52
3.2 Etapa 2: Cribado experimental en busca de actividad inhibitoria contra <i>Spike</i> /ACE2	53
3.2.1 Preparación de compuestos	53
3.2.2 Cribado por ELISA de la quimioteca blanco molecular-dirigida.....	53
3.3. Etapa 3 - Determinación de la citotoxicidad de los hits.....	57
3.4. Etapa 4 - Evaluación de la actividad antiviral	58
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.1. Selección <i>in silico</i> de candidatos.....	62
4.2 Cribado experimental en busca de actividad inhibitoria contra <i>Spike</i> /ACE2.....	68
4.2.1 Actividad Inhibitoria de la interacción <i>Spike</i> /ACE2 evaluada por ELISA.....	68
4.2.2 Evaluación de la inhibición de la interacción RBD/ACE2 mediante ensayo celular	75
4.3 Determinación de la citotoxicidad de los <i>hits</i>	78
4.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos sobre células A549	79
4.4 Análisis de relación estructura-actividad	94

4.4.1 Arilidenonas	94
3.4.3 <i>Bis</i>-heterociclos y precursores	102
3.4.4 Carboranos	106
CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	111
4.1 Conclusiones	112
4.2 Perspectivas	115
Referencias	117
ANEXOS	131

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

A fines del 2019 en Wuhan, China, se reportaron varios casos de neumonía severa de etiología desconocida. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de China inició inmediatamente una investigación epidemiológica y etiológica. Estos estudios establecieron un vínculo común en los pacientes: estos habían frecuentado un mercado de mariscos y animales previo al comienzo de la sintomatología y eran portadores de un nuevo coronavirus (2019-nCoV) (1,2). Este virus fue aislado de muestras de lavado broncoalveolar de estos pacientes y fue bautizado como “virus del síndrome respiratorio agudo severo 2” (SARS-CoV-2) (3). SARS-CoV-2 presentaba un 89.1% de similitud de secuencia con un coronavirus similar al SARS de murciélago (bat-SL-CoVZC45), ambos pertenecientes al género betacoronavirus (4,5), al igual que el Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). Estos últimos causaron epidemias en China en 2002 y en Arabia Saudita en 2012, respectivamente (6,7). La secuenciación completa del genoma permitió la rápida implementación de RT-qPCR como prueba molecular diagnóstica específica para este virus (8). A partir de entonces, el SARS-CoV-2 se esparció rápidamente, aumentando exponencialmente el número de casos debido a su gran capacidad de transmisión de persona a persona (9–11). El 31 de enero del 2020 la OMS (Organización Mundial de la Salud) declaró una emergencia de salud pública de importancia mundial (12) y el 11 de marzo del 2020, con 118.319 casos confirmados, 4292 muertes, en 113 países, la OMS declaró a la enfermedad por 2019-nCoV (COVID-19) como una pandemia (13). A partir de entonces, todos los esfuerzos se enfocaron en combatir y paliar los efectos en diversos ámbitos de esta crisis mundial. En el área de la biomedicina y la química medicinal, los mayores esfuerzos estuvieron volcados al desarrollo de vacunas y antivirales contra SARS-CoV-2.

1.2 Coronavirus

Hasta la década del 60 no se conocían coronavirus (CoVs) capaces de infectar humanos, el primero fue aislado en 1965 de secreciones nasales de un paciente con resfriado común (14). Al ocasionar una enfermedad leve y autolimitada, el estudio de los CoVs como patógenos de humanos quedó relegado. La información sobre CoVs estaba en mayor parte restringida a las especies causantes de infecciones en animales de interés productivo, como el virus de la bronquitis infecciosa aviar, el virus de la diarrea epidémica porcina y el coronavirus bovino, que dieron lugar a grandes pérdidas económicas en la industria avícola y ganadera (15). No fue hasta el 2002 cuando emergió el SARS-CoV y 10 años más tarde el MERS-CoV, que los CoVs cobraron una mayor relevancia para la salud humana. No solo por la severidad y altas tasas de mortalidad de las enfermedades que causaban, sino también por su capacidad de cruzar la barrera de especies y diseminarse rápidamente, siendo la reemergencia o emergencia de un nuevo CoV una amenaza constante para la salud pública (16,17).

Los CoVs son conocidos por infectar mamíferos y aves. Pertenecen a la familia Coronaviridae, dentro del orden Nidovirales, la cual se divide en cuatro géneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus. A la fecha se conocen siete CoVs capaces de infectar humanos, todos ellos alfa y betacoronavirus. HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 están ampliamente distribuidos en todo el mundo y son responsables de causar enfermedades en el tracto respiratorio alto como el resfriado común, leve y autolimitado, pudiendo llegar a generar cuadros más severos en pacientes ancianos e inmunodeprimidos. La infección por SARS-CoV, MERS-CoV y recientemente el SARS-CoV-2, todos betacoronavirus, puede ser leve y de resolución rápida, con sintomatología escasa e inespecífica (ej. fiebre alta, artralgia, mialgia, manifestaciones gastrointestinales), a grave y mortal, provocando síndrome respiratorio severo con requerimiento de ventilación mecánica y falla multiorgánica (18–20).

forma: 5'- replicasa - S-E-M-N- 3', donde el gen de la replicasa ocupa dos tercios del genoma y se compone de dos marcos abiertos de lectura (ORF), 1a y 1b. Los ORF1a/b codifican las poliproteínas pp1a y pp1ab, respectivamente. Estos polipéptidos son escindidos en un proceso autocatalítico, en el cual la proteasa similar a la papaína (PL^{pro}) y la proteasa similar a la quimiotripsina o llamada también proteasa principal (M^{pro}) se autoclivan y escinden a las poliproteínas dando lugar a otras 14 proteínas involucradas en la replicación y transcripción viral, como la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), la helicasa y la exonucleasa (ExoN). El restante tercio del genoma codifica las proteínas estructurales y proteínas no estructurales (NSP) accesorias, estas últimas son nueve en el SARS-CoV-2. La replicasa es el único producto de la traducción del genoma, los demás se derivan de ARNs subgenómicos (19,24).

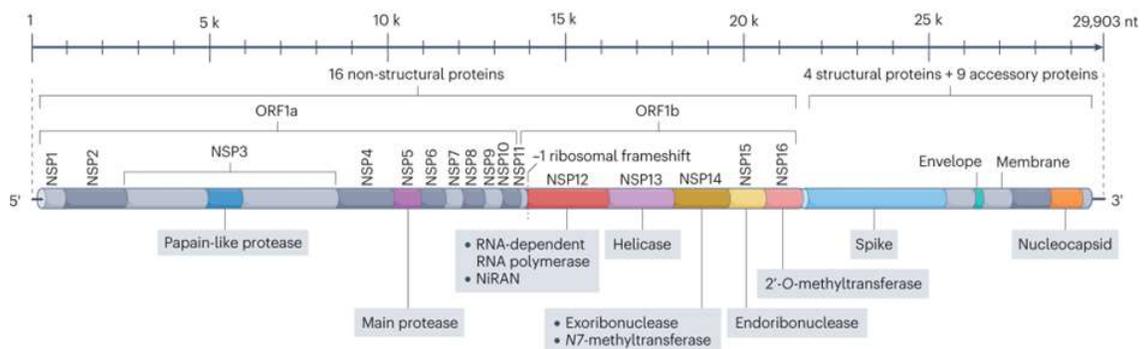


Figura 1.2. Esquema de la organización del ARN *genómico* del SARS-CoV-2. Los marcos abiertos de lectura ORF1a y ORF1b codifican las 16 proteínas no estructurales (NSP1-NSP16) responsables de la replicación y la transcripción. La traducción de ORF1a da lugar a la poliproteína 1a (pp1a) y un desplazamiento de marco ribosómico programado permite traducción continua de ORF1b al pp1ab más largo. Pp1a y pp1ab se procesan autoproteolíticamente por las proteasas NSP3 (PL^{pro}) y NSP5 (M^{pro}). Las proteínas estructurales y accesorias se traducen a partir de ARN mensajeros subgenómicos, que se producen durante el ciclo infeccioso mediante una transcripción discontinua (65).

1.3 SARS-CoV-2: ciclo replicativo

Si bien el ciclo replicativo es muy similar para todos los CoVs, hay diferencias sustanciales, sobre todo en el proceso de reconocimiento e internalización viral (ej. utilización de receptores y proteínas celulares). El SARS-CoV, el SARS-CoV-2 y el HCoV-NL63, utilizan al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) para el ingreso a la célula (26–28). Por el contrario, el MERS-CoV emplea el receptor dipeptidil peptidasa-4 (29), mientras que el HCoV-229E reconoce a la aminopeptidasa N (30) y el HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 al ácido siálico 9-O-acetilado presente en algunos receptores celulares (31,32).

A continuación, se detalla el ciclo del SARS-CoV-2.

Este se inicia con el reconocimiento y posterior unión de la *Spike* a través de su dominio de unión al receptor (RBD), a la ACE2. Una vez anclada a la superficie celular, la partícula viral puede ser internalizada mediante dos mecanismos: I) uno indirecto y lento que es mediado por endocitosis y por lo tanto dependiente de pH y II) otro directo y rápido que es independiente de pH. En el primero de ellos, una vez que la partícula viral llega al endolisosoma, a pH ácido, la catepsina L o B cliva a la *Spike*, activándola, lo que genera la fusión de la membrana endolisosomal con la viral y la posterior liberación del material genético al citosol (33,34). Si las células blanco además expresan en su superficie la serin-proteasa tipo 2 de transmembrana (TMPRSS2) (28), la *Spike* será clivada y activada directamente en la superficie celular. Esta activación desencadena cambios conformacionales en la proteína viral que dan lugar a la fusión de la membrana de la envoltura viral con la de la membrana celular y al rápido ingreso del virus al citosol mediante el segundo mecanismo.

Una vez el ARN viral se encuentra dentro de la célula comienza la expresión génica con la traducción de las poliproteínas pp1a y pp1ab que son clivadas por M^{pro} y PL^{pro}, dando lugar a varias proteínas no estructurales que se asocian formando el complejo de replicación y transcripción viral (RTC). Una vez formado dicho complejo, comienza la replicación del genoma dando lugar a copias de longitud completa de sentido negativo, que son utilizadas como plantillas para generar réplicas del ARN viral, que luego serán utilizadas para producir más proteínas o

serán empaquetadas en nuevos viriones. A su vez, durante la síntesis del ARN de sentido negativo, se generarán ARNs subgenómicos mediante transcripción discontinua, que luego serán traducidos en proteínas estructurales y accesorias. Tanto la replicación del ARN genómico como la transcripción de los ARN subgenómicos sucede en vesículas de doble membrana (DMV) formadas por las membranas del retículo endoplasmático (RE), éstas funcionan como orgánulos de replicación generando un microambiente protegido. A través de un complejo de poros moleculares, los ARN se exportan desde las DMV. Los ARN subgenómicos de las proteínas M, E y S se traducen en la membrana del RE y luego se trasladan al compartimento intermedio del RE-Golgi en donde se da el ensamblaje del virión. Las nucleoproteínas se traducen en el citoplasma y luego se asocian al genoma viral para formar las nucleocápsides. Éstas se fusionan con los componentes de la envoltura para formar viriones que pasan a través de la red de Golgi y trans-Golgi, donde se da la maduración del virión, como el corte en el sitio de escisión polibásico en la *Spike*. Los viriones que emergen del compartimento son empaquetados en vesículas que se trasladan hacia la membrana celular para ser liberadas hacia el exterior por exocitosis (24,35) (Figura 1.3).

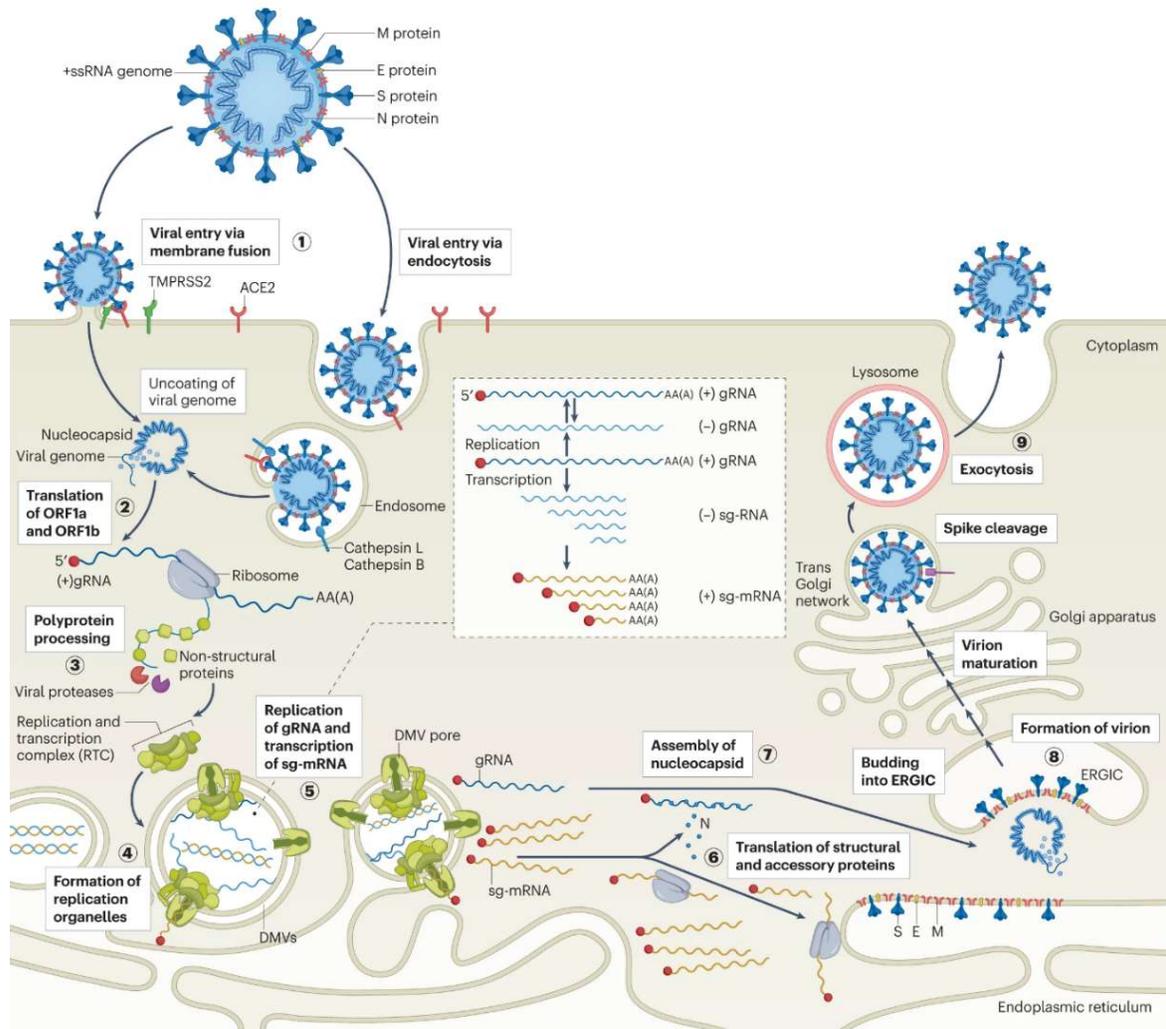


Figura 1.3. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2. El ciclo comienza con la unión de la *Spike* al receptor ACE2 (1). En presencia de la proteasa celular TMPRSS2, la fusión de la membrana se inicia directamente en la superficie celular; de lo contrario, el virión es absorbido por endocitosis y la fusión se produce en el endosoma después de la escisión de la *Spike* por la cathepsina L o B. Después de la liberación del genoma viral, se traducen ORF1a y ORF1b (2). Las poliproteínas pp1a y pp1ab resultantes se procesan en 16 proteínas no estructurales, que forman el RTC (3). Al mismo tiempo, las membranas del RE forman las DMV (4). Dentro de estos orgánulos, se da la replicación del ARN genómico y la transcripción del ARN subgenómico (5). Luego, los ARN subgenómicos se traducen en las proteínas estructurales y proteínas accesorias (6). El ARN genómico es exportado de las DMV, se une a las proteínas N y se ensambla en la nucleocápside (7). Las proteínas estructurales unidas a la membrana se trasladan al compartimento ERGIC (compartimento intermedio retículo endoplasmático-Golgi) y se incorporan a la nucleocápside para formar viriones (8). Finalmente, los viriones maduros salen de la célula mediante exocitosis lisosomal (9) (193).

1.4 Dianas moleculares para el desarrollo de fármacos anti-SARS-CoV-2

El desarrollo de fármacos diana-molecular específico comienza generalmente con la identificación y validación de la diana (36). En el caso particular de SARS-CoV-2, es esencial por tanto comprender el proceso de replicación viral para identificar potenciales blancos moleculares del patógeno y/o de la célula huésped que contribuyan al desarrollo de terapias antivirales.

A continuación, se describen algunos de los componentes moleculares y procesos relacionados que despiertan interés como dianas farmacológicas contra SARS-CoV-2:

Entrada viral

Actuar en la etapa inicial del ciclo de infección viral es una de las estrategias más utilizadas ya que previene la entrada y consecuente infección del organismo.

Como se mencionó previamente, el ciclo comienza con el reconocimiento de ACE2 por *Spike* y el subsiguiente ingreso del virus a la célula huésped. En esta fase, además de estas dos proteínas claves, participan proteasas celulares. Inhibir la interacción o función de alguna de ellas podría ser un enfoque promisorio para el desarrollo de fármacos.

La *Spike* es uno de los blancos moleculares más atractivos desde el punto de vista inmunoproláctico y quimioterapéutico por su rol fundamental en la entrada del virus a la célula (37). La *Spike* está conformada por dos subunidades: S1 y S2. S1 está constituida por el dominio N-terminal (NTD), el RBD y dos subdominios: SD1 y SD2. S2 está formada por el péptido de fusión (FP), la secuencia hepta-repetida 1 (HR1), una hélice central (CH), un dominio conector (CD) y una secuencia hepta-repetida 2 (HR2). Más adelante en la sección [1.5.1 \(Glicoproteína *Spike*\)](#) se explicará detalladamente la estructura de esta proteína.

Bloquear al RBD podría neutralizar la interacción con el receptor celular, mientras que la inhibición de sitios alostéricos o de la subunidad S2, donde se encuentra la maquinaria de fusión, podría modular la interacción con ACE2 o impedir la fusión de membranas (38). De hecho, el éxito de todas las vacunas que se desarrollaron contra SARS-CoV-2 (vacunas de ARNm, virus completo, o antígenos

recombinantes) se debe a que las mismas tienen como componente esencial a la *Spike* y generan anticuerpos neutralizantes contra esta proteína viral (39–42).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la secuencia codificante de esta proteína posee una alta tasa de mutabilidad, particularmente el RBD, lo cual ha dado lugar a la aparición de variantes del SARS-CoV-2 capaces de evadir la respuesta inmune humoral inducida contra cepas antecesoras (43–46) (ver sección [1.7.](#)). Desde el punto de vista de la química medicinal esto representa un gran desafío.

El NTD parecería estar implicado en el reconocimiento del receptor, unión y procesamiento proteolítico, además de estar involucrado en la conformación de la proteína (47,48). Este también presenta una tasa de mutabilidad elevada. Se ha descubierto que mutaciones en esta región confieren una mayor capacidad infectiva al SARS-CoV-2 así como la evasión del sistema inmune (49). Por otro lado, se han identificado anticuerpos dirigidos contra este sitio con capacidad neutralizante contra el virus. Este conjunto de evidencias sugiere que esta región podría contribuir a estabilizar y otorgar cierta dinámica conformacional al RBD, y por lo tanto la convierte en un blanco molecular atractivo de intervención farmacológica (50,51).

Por otro lado, la subunidad S2 de la *Spike* es más conservada con respecto a la S1 dentro de los CoVs. De hecho, se ha evaluado contra la *Spike* del SARS-CoV-2 un péptido, **EK1**, derivado de la región HR2 del CoV HCoV-OC43. **EK1** se une a HR1 formando un haz estable que impide la fusión del virus con la célula huésped (52). Este péptido resultó ser inhibidor de la fusión de cinco CoVs incluyendo el SARS-CoV y el MERS-CoV, y ahora también el SARS-CoV-2. **EK1** fue optimizado mediante la introducción de colesterol y polietilenglicol resultando en el péptido **EK1C4** con una potencia antiviral mejorada. Por los riesgos toxicológicos del polietilenglicol, se generó un péptido sin este poliéter, el péptido **EKL1C**, el cual presentó una actividad antiviral pan-coronavirus en ensayos *in vitro* e *in vivo* (53,54).

Con respecto a la célula huésped, las siguientes proteínas han sido postuladas como candidatos farmacológicos: la ACE2 y las proteasas celulares TMPRSS2, catpsinas lisosomales y furina.

ACE2 presenta un alto grado de conservación de secuencia en humanos y su inhibición también podría bloquear la entrada de otros coronavirus que utilizan esta proteína como receptor celular. No obstante, desde el punto de vista terapéutico, es importante tener en cuenta el rol fisiológico esencial de ACE2 en el mantenimiento de la homeostasis a través del sistema renina angiotensina aldosterona (ver sección [1.5.2](#)). Por lo tanto, cualquier terapia contra este blanco debe ser cortoplacista y el paciente debe ser cuidadosamente monitorizado. Sin embargo, se han investigado moléculas pequeñas que bloqueen ACE2 interfiriendo en la unión con *Spike* sin afectar su función enzimática, un posible inhibidor reportado en la bibliografía es la molécula **SB27041**, un compuesto tricíclico basado en pirimidodiazepina, que inhibiría la unión por un mecanismo alostérico, aunque hacen falta más estudios para confirmar y definir los sitios de unión de esta molécula (55).

También, se ha planteado la estrategia de bloquear la interacción con péptidos que imitan a ACE2 (56). Un ejemplo es el péptido **APN01**, un fragmento soluble de ACE2 (57), sin embargo, no se vieron beneficios en su administración en pacientes hospitalizados por COVID19 en un ensayo de fase II (NCT04335136).

Con respecto a las proteasas celulares, la inhibición de la TMPRSS2 bloquearía la vía de ingreso rápida del virus a la célula, no así la lenta o endocítica (28). La misma se expresa principalmente en la próstata y en menor medida en los pulmones, el colon, el hígado, los riñones y el páncreas (58). Esta proteasa pertenece a la familia de serina proteasas transmembrana tipo 2, similares a tripsina, las cuales participan en cascadas proteolíticas pericelulares para la remodelación de la matriz extracelular y la activación proteolítica de proteínas de membrana (59). La desregulación en la expresión y/o actividad de estas proteasas es común en varios tipos de cánceres dando como resultado una mayor proliferación e invasión de las células tumorales (60,61). La TMPRSS2, a su vez, es utilizada por los virus de la Influenza A e Influenza B para el clivado y activación de su proteína de superficie hemaglutinina, lo que desencadena el ingreso celular de estos virus (62,63). Hoffman et al. probaron que el mesilato de camostatato y el mesilato de nafamostat, ambos inhibidores de serin-proteasas activos contra TMPRSS2, aprobados en Japón para el tratamiento de la pancreatitis, inhiben la infección viral en células de pulmón (28,64). Sin embargo ensayos clínicos en adultos hospitalizados con COVID-19 no mostraron resultados positivos

(NCT04657497, NCT04321096 NCT04623021 , NCT04473053) (65). Un desafío a la hora de inhibir esta proteasa es que los inhibidores deben ser selectivos con el fin de evitar la inhibición de las proteasas homólogas presentes en el plasma e involucradas en la cascada de coagulación, lo que podría empeorar el cuadro clínico del paciente.

Por otro lado, de inhibirse la actividad de las catepsinas lisosomales se vería afectada la vía de entrada lenta del virus. Cloroquina e hidroxicloroquina son bases débiles que en el interior celular se protonan y concentran en organelos ácidos de bajo pH, como los endosomas, lisosomas y también vesículas de Golgi. De esta forma, estos compuestos aumentan el pH de estos compartimentos lo cual inactiva a las enzimas como las catepsinas lisosomales (66–68). Una de las desventajas de alterar la función de los compartimentos endolisosomales y las proteasas allí presentes, es que allí se desarrollan etapas importantes del proceso de presentación de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, lo que repercutiría negativamente en la respuesta del sistema inmune (69).

De todos modos, es difícil bloquear la infección por SARS-CoV-2 mediante la inhibición de una única proteasa celular ya que el virus usa múltiples vías de entrada, mientras que una combinación de inhibidores de proteasas presenta el riesgo de incrementar la toxicidad (65).

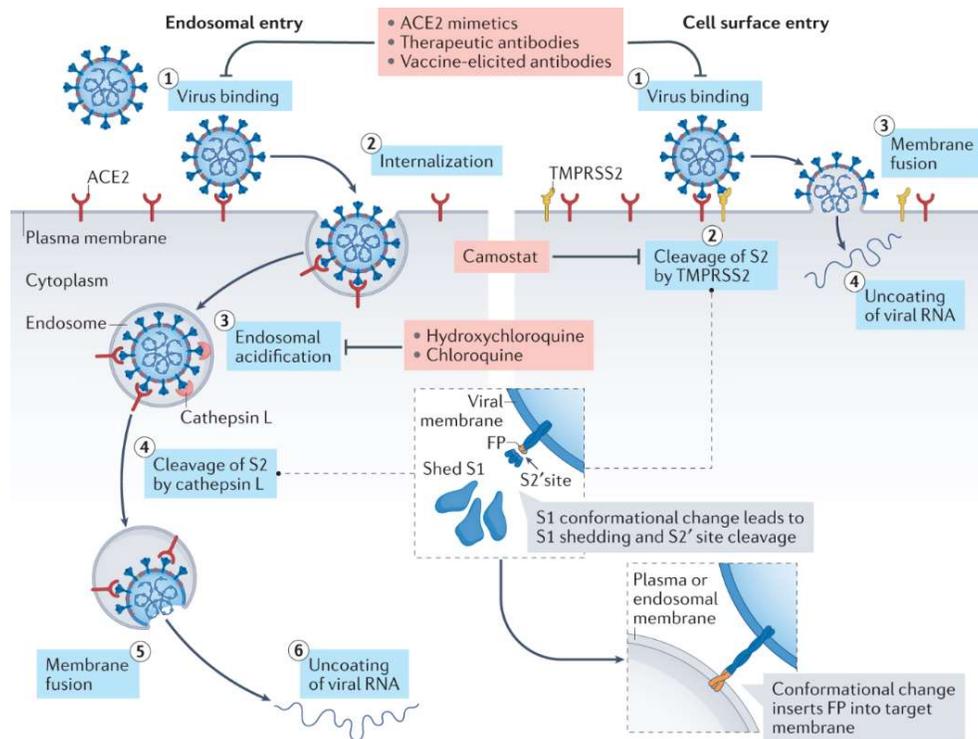


Figura 1.4. Modos de ingreso del SARS-CoV-2 a la célula hospedera (1) Existen dos vías de internalización viral: la endosomal (izquierda) y la directa, en la superficie celular (derecha). Vía endosomal: en el caso de niveles insuficientes de la proteasa TMPRSS2 en la célula huésped, el complejo virus-ACE2 se internaliza mediante endocitosis mediada por clatrina (2) en el compartimento endolisosomal, donde S2' es escindido por las enzimas cathepsinas (3 y 4). Vía directa: en presencia de TMPRSS2, S2' se escinde en la superficie celular (2). Para ambos mecanismos de ingreso, la escisión del sitio S2' expone el péptido de fusión (FP) e induce la disociación de S1 de S2. Un cambio conformacional en la subunidad S2 mueve el FP hacia la membrana celular, iniciando la fusión de la membrana (5 a la izquierda y 3 a la derecha). Después de la fusión entre las membranas viral y celular, el ARN viral se libera en el citoplasma (6 a la izquierda y 4 a la derecha). Varios agentes interrumpen la interacción entre las proteínas S y ACE2, como los miméticos de ACE2, los anticuerpos terapéuticos (dirigidos a la *Spike*) y los anticuerpos producidos por la vacunación (que bloquean la unión del virus a ACE2). Otras estrategias de inhibición se dirigen a los pasos posteriores a la unión al receptor: el inhibidor de la serina proteasa camostat mesilato actúa sobre TMPRSS2, bloqueando la vía de entrada directa; La hidroxicloroquina y la cloroquina bloquean la acidificación endosomal, que es necesaria para la actividad de las cathepsinas, actuando sobre la vía endolisosomal (194).

Replicación y Transcripción del ARN viral

La inhibición de la replicación/transcripción viral es una estrategia válida para detener la producción de nuevos viriones. Las principales enzimas involucradas en estos procesos son las cisteín-proteasas PL^{pro} y M^{pro} y las proteínas que componen el complejo de replicación y transcripción.

La inhibición de las proteasas bloquea la maduración de las proteínas virales, impidiendo así la formación del complejo de replicación-transcripción. Un aspecto molecular interesante de estas proteasas es que comparten residuos catalíticos (díada cisteína/histidina) altamente conservados, incluso en varios CoVs (70). En ese sentido, a la fecha, no se han reportado mutaciones en dichos residuos para la totalidad de variantes de SARS-CoV-2 que han sido secuenciadas (71).

Por otra parte, PL^{PRO} escinde preferentemente a la proteína similar a la ubiquitina del ISG15 (interferon-stimulated gene 15) y tiene una función deubiquitinasa que contribuye a remover las ubiquitinas de proteínas de señalización implicadas en la respuesta inmune del huésped (65,72). Por lo tanto, la inhibición de PL^{PRO} no solo afectaría la replicación del virus, sino que impediría que el virus interfiera con mecanismos de respuesta celular a la infección. No obstante, el diseño de inhibidores selectivos contra esta proteasa representa un desafío ya que la misma posee cierta similitud estructural con proteínas desubiquitinantes humanas (73).

La RdRp, junto a otras proteínas no estructurales (NSP 7-10 y NSP 13-16) forman el complejo de replicación-transcripción (74). Esta polimerasa es inhibida por análogos de nucleós(t)idos como remdesivir y molnupiravir (75–78). A su vez las proteínas no estructurales NSP14 y su cofactor, la NSP10, quienes forman parte del complejo de reparación del ARN, tienen actividad exoribonucleasa 3'-5' lo que limita la eficacia de algunos de estos fármacos como la ribavirina (65). NSP14-NSP10 despiertan interés como blancos farmacológicos ya que su inhibición incrementaría la efectividad de los análogos de nucleós(t)idos dirigidos contra la RdRp (79–83).

Ensamblaje y liberación de las partículas virales

Excluyendo a la *Spike*, la proteína de la nucleocápside (N) es la proteína estructural más estudiada como potencial diana molecular para el desarrollo de terapias. La proteína N está altamente conservada (84) e induce una fuerte respuesta inmune en el huésped, tanto celular como humoral lo que la hace atractiva como diana terapéutica para el desarrollo de vacunas (85,86). Estudios preclínicos mostraron que pequeñas moléculas como la ceftriaxona y mefuparib (87,88) pueden inhibir a esta proteína. Sin embargo, este blanco molecular presenta algunos desafíos desde

el punto de vista del diseño de ligandos/inhibidores porque estos son altamente dinámicos desde el punto de vista conformacional/estructural (89).

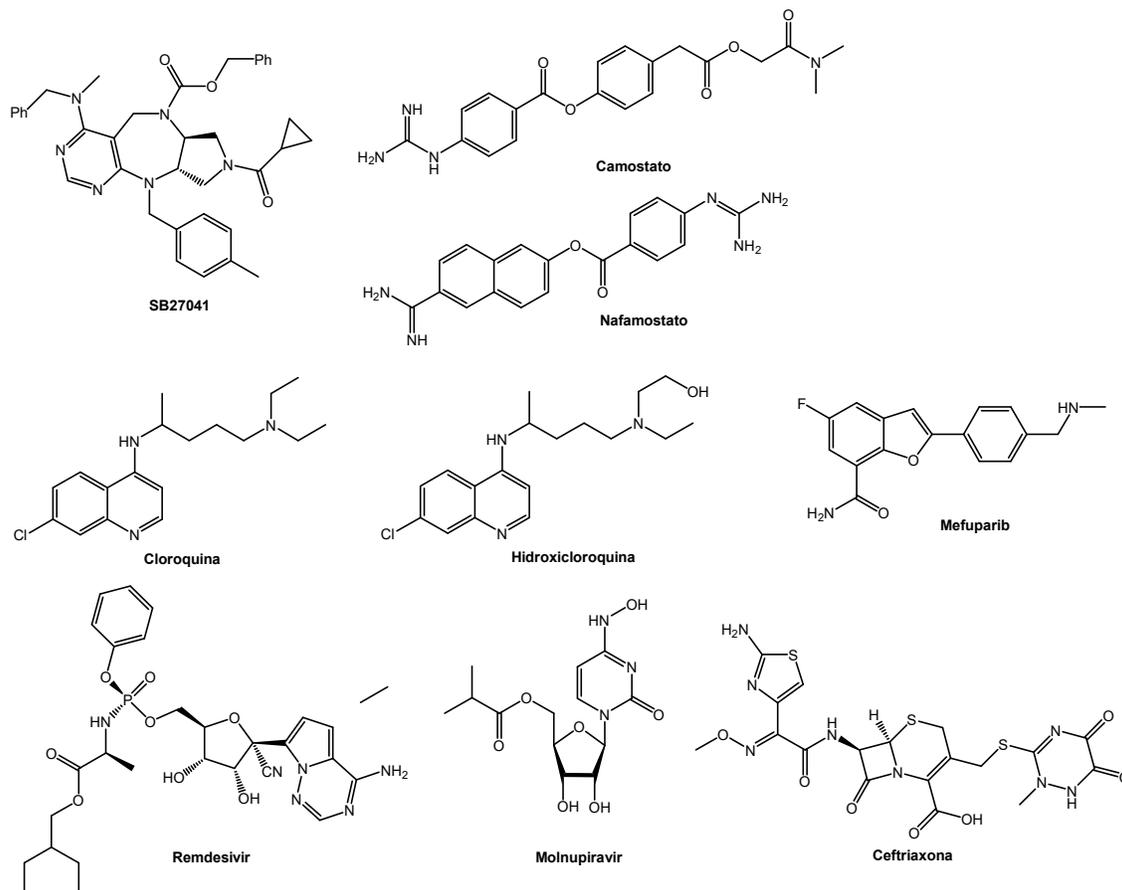


Figura 1.5. Pequeñas moléculas con reconocida actividad antiviral por acción a nivel de la entrada viral, replicación o ensamblaje y liberación viral.

Inmunomodulación

Modular la respuesta inmune del huésped es otra de las estrategias terapéuticas empleadas para el control de las infecciones virales. En ese sentido, los interferones (IFNs) se destacan por su reconocida actividad antiviral. Estas citoquinas son liberadas por las células hospederas en respuesta a la interacción con componentes virales y de otros patógenos, y se encargan de inducir la expresión de cientos de genes que permiten alcanzar un estado de resistencia viral. La vía de señalización del interferón no solo juega un rol importante en la defensa contra virus sino también en la integración de la respuesta inmune (90). Hoy en día abundan las evidencias

(pre)clínicas demostrando que los betacoronavirus suprimen la respuesta a IFN tipo I y III (91) y que el sistema del IFN o las terapias basadas en éste fueron efectivas para el control de infecciones respiratorias causadas por SARS-CoV-2 y MERS-CoV. No obstante, para SARS-CoV-2, el éxito de esta terapia depende del tipo de IFN, cuando (etapa temprana de la infección), porque vía y por cuanto tiempo administrarlo (92).

Por otro lado, ciertos casos de infección por SARS-CoV-2 transitan con una respuesta inmune exacerbada que causa inflamación sistémica, tormenta de citoquinas, falla multiorgánica y, consecuentemente, la muerte (93). En general esto se ha visto cuando el organismo monta tardíamente y de manera persistente (no logra silenciar adecuadamente) la respuesta de IFN. En estos pacientes, el uso de inmunomoduladores, antiinflamatorios y anticoagulantes han sido útiles para paliar los efectos de la respuesta inmune descontrolada frente a la infección por este virus.

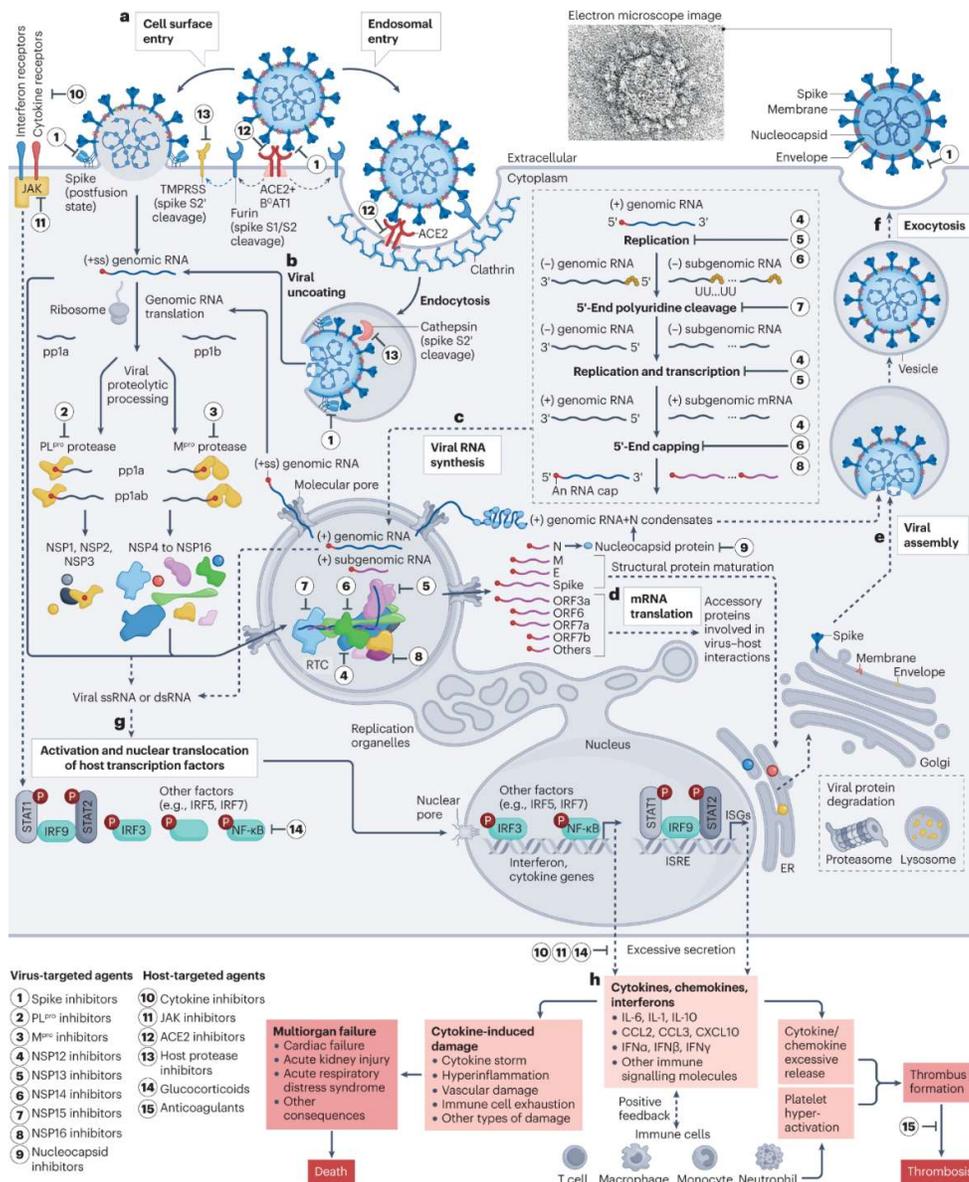


Figura 1.6. Ciclo viral del SARS-CoV-2 y dianas farmacológicas: Los pasos (a-f) se describieron anteriormente (Sección 1.3). El ARN viral desencadena vías de señalización inmune del huésped (g), que implican la activación de factores de transcripción para producir citoquinas como la interleucina IL 6, quimioquinas e interferones como el interferón- α (h) la producción y secreción excesiva de estos inmunomoduladores pueden provocar daños inducidos por citoquinas, falla multiorgánica, trombosis y muerte. Las células inmunitarias generan, además, una retroalimentación positiva lo que estimula una liberación adicional de citoquinas, quimioquinas e interferones. IRF, factor regulador de interferón; ISG, gen estimulado por interferón; ISRE, elemento de respuesta estimulado por interferón; JAK, Janus quinasa; NF- κ B, factor nuclear- κ B; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción (65).

Cada enfoque de los recién mencionados tiene desafíos, algunos de ellos son: la resistencia viral por la adquisición de mutaciones, citotoxicidad, falta de selectividad. Enfoques combinados que aborden múltiples puntos del ciclo viral podrían ser más efectivos y reducir el riesgo de resistencia, más aún si tenemos presente que los virus de ARN circulan como un espectro de mutantes, denominado cuasiespecies, para los cuales la terapia combinada es la mejor opción (94,95). Ejemplos de terapias combinadas de fármacos que actúan sobre más de un punto del ciclo viral son las utilizadas para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis C (VHC). Para el primero los antirretrovirales disponibles presentan combinaciones de inhibidores de las proteínas virales: transcriptasa inversa, proteasa viral e integrasa. El medicamento Symtuza de la farmacéutica Janssen, por ejemplo, utiliza una combinación de dos análogos de nucleós(t)idos (emtricitabina y tenofovir alafenamida) junto con un inhibidor de la proteasa (darunavir). A su vez para el VHC se han desarrollado antivirales de acción directa que inhiben la polimerasa (dasabuvir, ribavirin, sofosbuvir), la proteína viral NS5A (edipasvir, ombitasvir, pibrentasvir, velpatasvir) y la proteasa NS3-4^a (faldoprevir, glecaprevir, grazoprevir, paritaprevir, ritonavir, simeprevir, voxilaprevir), como el sofosbuvir y el declatasvir que han mejorado significativamente la tasa de curación hasta llevarla a un ~95% (96).

1.5 *Spike*/ACE2 como dianas moleculares para el desarrollo de antivirales

Por su rol determinante en el ciclo viral, interferir con la interacción *Spike*/ACE2 es una estrategia antiviral prometedora, ya que impediría la entrada del virus a la célula y todo el daño que éste desencadena durante su proceso de replicación.

Para lograr este objetivo es importante conocer en profundidad ambas proteínas, las regiones/residuos, fuerzas, la estructura y dinámica que gobierna la interacción entre ambas.

1.5.1 Glicoproteína *Spike*

La *Spike* es una glicoproteína homotrimérica de fusión de clase I de ~180 KDa (97,98). Cada protómero está compuesto por 1273 aminoácidos (aa_s) y consta de un péptido señal (aa_s 1-13) en el extremo N-terminal, seguido por 2 subunidades funcionales: S1 (aa_s 14-685) y S2 (aa_s 686-1273). S1 comprende el dominio N-terminal (NTD) (aa_s 14-305), el dominio de unión al receptor (RBD) (aa_s 319-541), al que le siguen dos subdominios: SD1 y SD2 ubicados hacia el extremo C-terminal de la proteína. El RBD se compone de una estructura central o *core* y de un bucle extendido, denominado motivo de unión al receptor (RBM) (aa_s 438-506), en donde se encuentran la mayoría de los residuos implicados en la interacción con el receptor celular. Esta subunidad es clave para el reconocimiento y unión a la célula hospedera además de estabilizar el estado de prefusión (99). La subunidad S2, por su parte, altamente conservada en los CoVs, se encuentra anclada a la envoltura viral a través de una región transmembrana y participa en el proceso de fusión de las membranas. Está conformada por un péptido de fusión (FP) (aa_s 788-806), una secuencia hepta-repetida 1 (HR1) (aa_s 912-984), una hélice central (CH), un dominio conector (CD), otra secuencia hepta-repetida 2 (HR2) (aa_s 1163-1213), seguidas por el dominio transmembrana (aa_s 1213-1237) y, por último, la cola citoplasmática (aa_s 1238-1273) (100,101).

Entre las subunidades S1 y S2 de la *Spike* del SARS-CoV-2 sobresale expuesta al solvente una estructura tipo bucle y rica en residuos de arginina que contiene un sitio de clivaje para furina S1/S2 (102–104). Este elemento estructural está presente en algunos CoVs, como HCoV-OC43, HCoV-HKU1 y MERS-CoV (105), no así en el SARS-CoV. Durante la biosíntesis, antes del egreso del virus, las proteasas del

huésped escinden este polipéptido en S1/S2, los cuales se mantienen unidos de manera no covalente. Este clivaje es necesario para la posterior activación de la *Spike* por la proteasa TMPRSS2 mediante corte en el sitio S2'. Si esta escisión no ocurriera, el virus ingresaría a la célula solo mediante el mecanismo lento de endocitosis y posterior activación por proteasas lisosomales. Se cree que el clivaje entre S1 y S2 contribuye a expandir el tropismo del virus por células deficientes en proteasas lisosomales activadoras de la fusión. Esta característica molecular ha sido propuesta como determinante clave del potencial zoonótico de SARS-CoV-2 y MERS-CoV, así como de su gran capacidad infectiva y transmisibilidad (32,106–109).

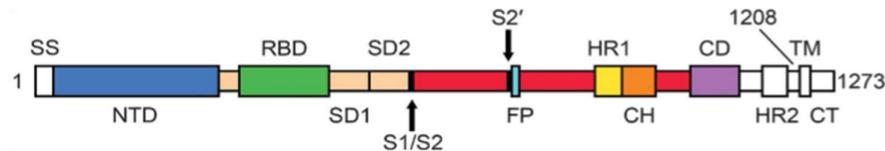


Figura 1.7. Esquema de la estructura primaria de la *Spike* del SARS-CoV-2. SS, secuencia señal; NTD, dominio N terminal; RBD, dominio de unión al receptor; S1 y S2, subdominios 1 y 2; S1/S2, sitio de escisión polibásico; S2', sitio de escisión de proteasas S2'; FP, péptido de fusión; HR1, repetición heptada 1; CH, hélice central; CD, dominio conector; HR2, repetición heptada 2; TM, dominio transmembrana; TC, cola citoplasmática. Las flechas indican los sitios de escisión de proteasas (99).

Una vez que el virus egresa de la célula, la *Spike* trimérica se encuentra en una conformación de pre-fusión metaestable (99,110). La misma debe acoplarse al receptor celular para dar inicio a un nuevo ciclo replicativo, para ello el RBD experimenta cambios conformacionales continuos, que ocultan o exponen el RBM. Estos estados conformacionales se conocen como *up* cuando el RBD se encuentra expuesto al solvente y accesible al contacto con el receptor celular y *down* cuando se encuentra ocluido hacia el interior del núcleo estructural (99).

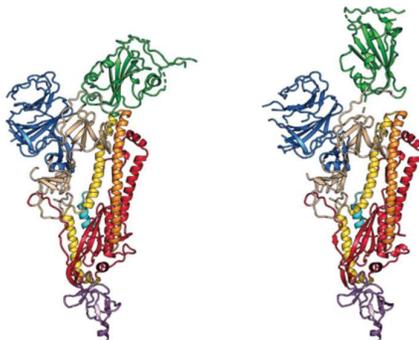


Figura 1.8. Conformación *up* y *down* del RBD de la *Spike*. A la izquierda se visualiza el protómero único de la *Spike* con el RBD (verde) en la conformación hacia abajo *down*. A la derecha se muestra un protómero en la conformación ascendente *up* del RBD (99).

Una vez el virión reconoce y se acopla al receptor celular, un segundo clivaje en el sitio S2', el cual precede a la secuencia del FP, es necesario para activar la maquinaria de fusión de la *Spike* (111). Como ya se mencionó, este clivaje está mediado por la proteasa de transmembrana TMPRSS2 o por las catepsinas lisosomales. El mismo conduce a cambios conformacionales irreversibles, comunes a las proteínas de fusión de clase I. Estos reordenamientos llevan a la liberación de S1, lo cual expone al FP, un elemento rico en residuos hidrofóbicos que favorecen la inserción de la partícula viral a la membrana celular. A continuación, HR1 y HR2 forman un haz de seis hélices (conformación de postfusión), que contribuye a aproximar la membrana celular y viral hasta que las mismas se fusionan (32,100,112–115).

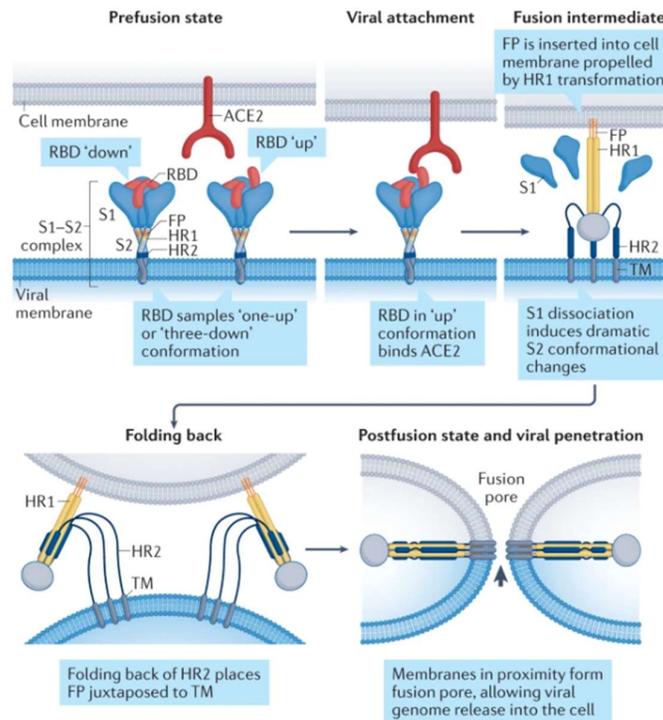


Figura 1.9. Transición estructural de la conformación de prefusión a la conformación de postfusión que induce la fusión de las membranas. La *Spike* en su conformación metaestable de prefusión se une a ACE2 a través del RBD lo que permite la exposición del sitio de escisión S2'. La escisión en el sitio S2' libera las restricciones estructurales en el péptido fusión e inicia una cascada de cambios conformacionales en S2, acompañada por una disociación completa de S1. La formación de la espiral central de tres hélices (HR1) y el plegado hacia atrás de la hepta-repetición 2 (HR2) induce la estructura de postfusión de S2 (haz de seis hélices) que une las dos membranas, facilitando la formación de poros de fusión y la entrada viral. Estos eventos pueden ocurrir en la membrana plasmática o en el compartimento endosómico (194).

La *Spike* constituye el componente antigénico primordial y por lo tanto el primer blanco molecular de los anticuerpos neutralizantes generados durante la respuesta inmune adaptativa. Esta proteína exhibe 22 sitios de N-glicosilación por protómero que además de contribuir a evadir el reconocimiento por el sistema inmune del huésped (116,117) son importantes para el correcto plegado y dinamismo de los estados *up* y *down* de la misma (118). Además, se ha observado que algunos glicanos del RBD modularían la interacción con ACE2 (119,120).

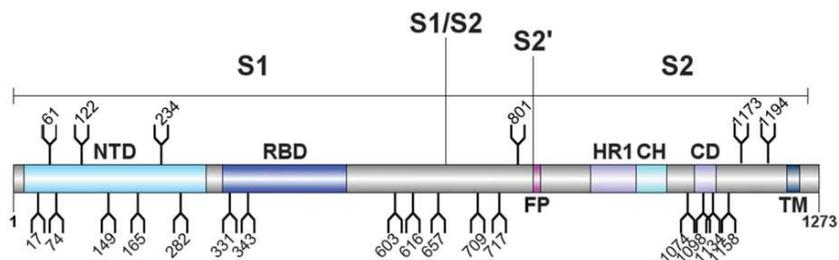


Figura 1.10. Representación esquemática de la glicoproteína *Spike* del SARS-CoV-2. Las posiciones de las secuencias de N-glicosilación se muestran como ramas (195).

Al margen de su papel en la invasión celular, estudios experimentales y clínicos han demostrado que la *Spike* funciona como una toxina que incrementa la permeabilidad vascular, lo cual no solo contribuye a acelerar la invasión tisular por parte del patógeno sino también al sangrado interno. Estas manifestaciones clínicas han sido comunes en casos severos de COVID-19. La explicación molecular a este fenómeno estaría dada por la presencia de un motivo de unión a integrinas (RGD) en la secuencia de la *Spike* que al contacto con integrinas celulares (abundantes en células epiteliales y del endotelio vascular) dispararía la liberación de TGF-beta y la activación de la vía de señalización de esta citoquina que incrementa la permeabilidad e irrigación vascular (121). Este motivo RGD se encuentra dentro del RBD (aa_s 403-405). Se ha visto que las variantes de Ómicron BA.2, BA.4 y BA.5 que presentan la mutación D405N son menos patógenas (122).

1.5.2 ACE2

ACE2 es una glicoproteína de membrana homodimérica que se expresa en pulmones, intestino, corazón, endotelio, cerebro y riñones (123). Es una carboxipeptidasa y una metalopeptidasa de zinc formada por 805 aa_s. El dominio N-terminal extracelular (aa_s 19-768) contiene al dominio peptidasa (aa_s 19-715) el cual comprende al sitio de unión al sustrato y un motivo de unión a zinc. A este le sigue un dominio C-terminal tipo colectrina (aa_s 616-768) que incluye un dominio similar a ferredoxina (aa_s 616-726) el cual está implicado junto con el dominio peptidasa en la dimerización de la proteína, y termina con una región transmembrana (aa_s 740 a 768) y una extensión de 37 aa_s de localización intracelular (69,124):

ACE2 juega un papel fundamental en el sistema renina-angiotensina-aldosterona clivando a la angiotensina II para producir angiotensina 1-7, un péptido con funciones vasodilatadoras que funciona como un regulador negativo de este sistema, compensando las acciones presoras, proliferativas y profibróticas de Ang II. Además, tiene un rol como chaperona del transportador de aminoácidos B₀AT1 en el intestino, que se encarga del transporte de aa_s neutros (26,28).

La *Spike* reconoce al dominio peptidasa de esta proteína (125). Las glicosilaciones de ACE2 son importantes para la unión del RBD de la *Spike* (126). Se piensa que dos trímeros de *Spike* podrían unirse simultáneamente a ACE2, ya que cada dominio peptidasa de ACE2 puede unirse a un RBD (124).

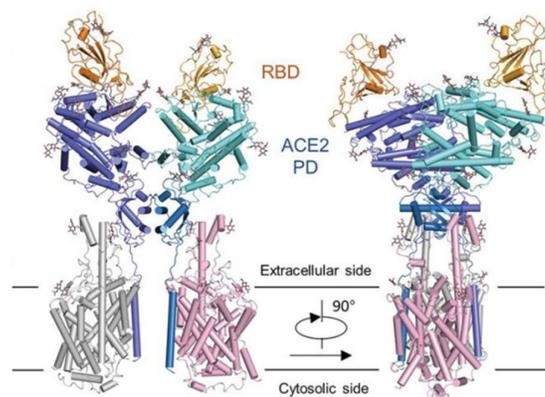


Figura 1.11. Representación del modelo atómico del complejo ACE2-B₀AT1. El complejo está coloreado por subunidades, con el dominio peptidasa y el dominio colectrina en un protómero ACE2 en celeste y azul, respectivamente (124).

1.5.3 Interacción *Spike*/ACE2

La interacción *Spike*/ACE2 involucra al RBD de la *Spike* y al dominio peptidasa N-terminal de ACE2.

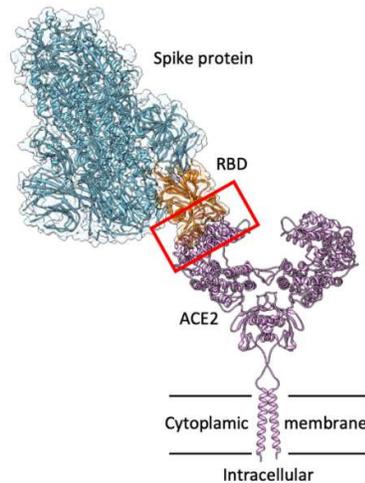


Figura 1.12. Representación esquemática del complejo *Spike*/ACE2. Se muestra ACE2 dimérica que sobresale de la membrana citoplasmática y se une a la proteína trimérica *Spike* de SARS-CoV-2 a través de uno de los tres RBD disponibles en conformación *up* (196).

El RBD consiste en una lámina β antiparalela formada por cinco hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 7$, conectadas por hélices y bucles que forman el *core*. El RBM se encuentra entre las hebras $\beta 4$ y $\beta 7$ y está formado por las hebras cortas $\beta 5$ y $\beta 6$ y las hélices y bucles $\alpha 4$ y $\alpha 5$. El RBD presenta nueve residuos de cisteína de los cuales ocho se encuentran formando enlaces disulfuro, tres se encuentran en el *core* (C336-C361, C379-C432 y C391-C525) y uno de ellos en el RBM (C480-C488) (127).

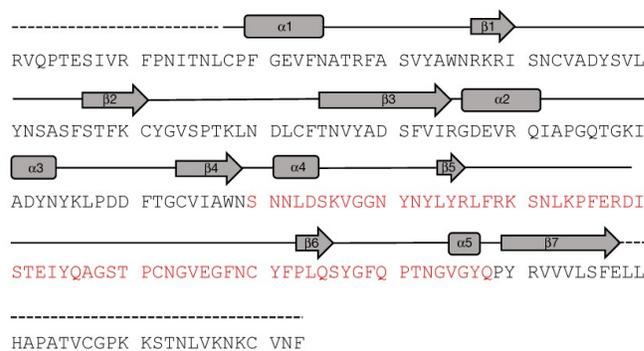


Figura 1.13. Secuencia y estructura secundaria del RBD de la *Spike* del SARS-CoV-2. La secuencia RBM se muestra en rojo (127).

Por su parte el dominio peptidasa N-terminal de ACE2 cuenta con dos lóbulos. El lóbulo pequeño de ACE2, contiene la hélice $\alpha 1$ N-terminal la cual comprende los aminoácidos involucrados en la interacción con el RBM, y a la hélice $\alpha 2$ y un bucle conector entre $\beta 3$ y $\beta 4$ que también contribuyen de forma limitada a la unión con el RBD (124).

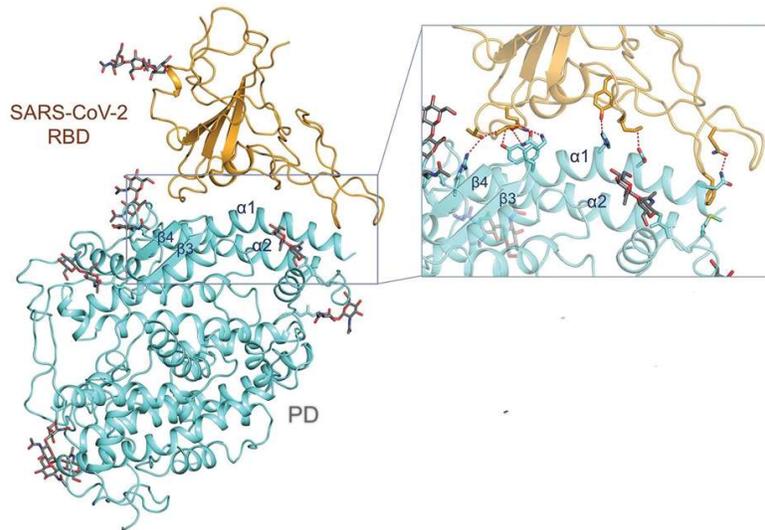


Figura 1.14. Representación del complejo RBD-ACE2. El dominio peptidasa de ACE2 involucra principalmente a la hélice $\alpha 1$ en el reconocimiento del RBD. La hélice $\alpha 2$ y el conector entre $\beta 3$ y $\beta 4$ también contribuyen a la interacción (124).

El RBM forma una superficie ligeramente cóncava con una cresta a un lado que acuna a la hélice alfa 1 arqueada de ACE2, delimitando una superficie de contacto de unos 1.687 \AA^2 (116).

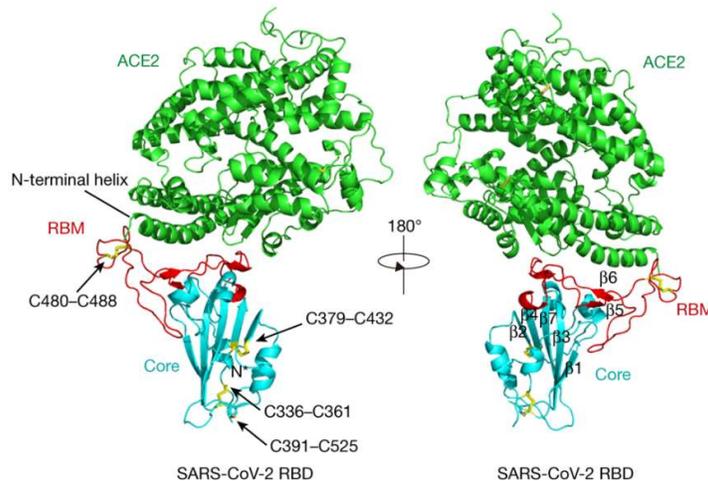


Figura 1.15. Estructura del RBD del SARS-CoV-2 unido a ACE2 (verde). El core del RBD se muestra en celeste y el RBM en rojo. Los enlaces disulfuro en el RBD se muestran en amarillo y se indican con flechas (127).

Un total de 17 residuos del RBD, 16 de ellos contenidos en el RBM, están en contacto con 20 residuos de aa_s de ACE2. Algo particular de esta interfaz proteína-proteína (P-P), es que predominan las interacciones hidrofílicas. Hay 13 enlaces de hidrógeno involucrados, en los que participan el grupo hidroxilo de múltiples residuos de tirosina. También están implicados dos puentes salinos. A su vez hay varios residuos involucrados en interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals (127).

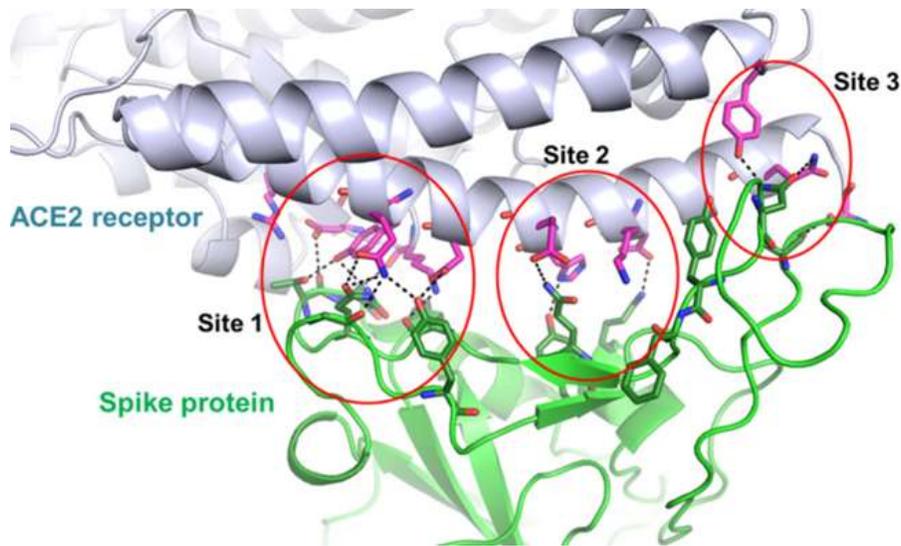


Figura 1.16. Representación de la interfaz entre *Spike* y ACE2. La superficie de interacción se divide en tres regiones: Sitio 1, Sitio 2 y Sitio 3. Los residuos involucrados en la interacción se muestran en rosa para ACE2 y en verde para *Spike* (134).

La interfaz se puede dividir en 3 sitios según su topología de potencial electrostático: el **sitio 1** hidrofílico, en el cual interactúan los residuos de la *Spike* G446, Y449, G496, Q498, T500 y N501 con los residuos de ACE2 D38, Y41, Q42, K353 y D355.

El **sitio 2** es moderadamente hidrofílico, y contiene a los aa_s K417 y Q493 que establecen interacciones con D30 y E35 de ACE2.

Por último, el **sitio 3** es hidrofílico y se compone de los aa_s A475 y N487 que interactúan con S19, E24 y Y83 de ACE2.

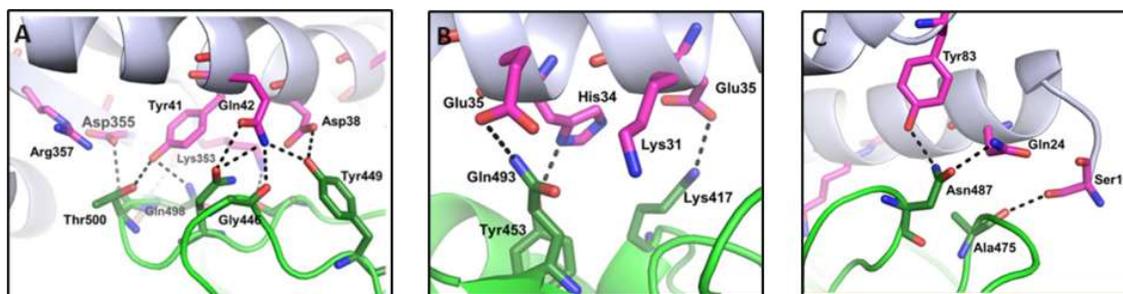


Figura 1.17. Representación de los sitios 1, 2 y 3, figuras A, B y C respectivamente (134).

Como se destacó anteriormente, la superficie de interacción entre *Spike* y ACE2 es extensa, relativamente plana y con escasos bolsillos para el anclaje selectivo de moléculas de bajo peso molecular. Dentro del RBM se destacan algunas regiones con características hidrofílicas en forma de gancho (*hook*) y *clefts* hidrofóbicos que proporcionan potenciales puntos de unión de moléculas que, al hacerlo, bloquearían o dificultarían la interacción con ACE2. El sitio 1 presenta en su extremo superior una región hidrofílica a la que le sigue una hendidura hidrofóbica formada por los residuos Y495, F497 y Y505, que, si bien no interactúan con residuos de ACE2, es un buen *hot spot* para la unión de compuestos aromáticos. En el sitio 2 se encuentran residuos hidrofílicos como R403, E406 y Y453 que no están involucrados en la interacción, pero podrían facilitar las interacciones con compuestos químicos.

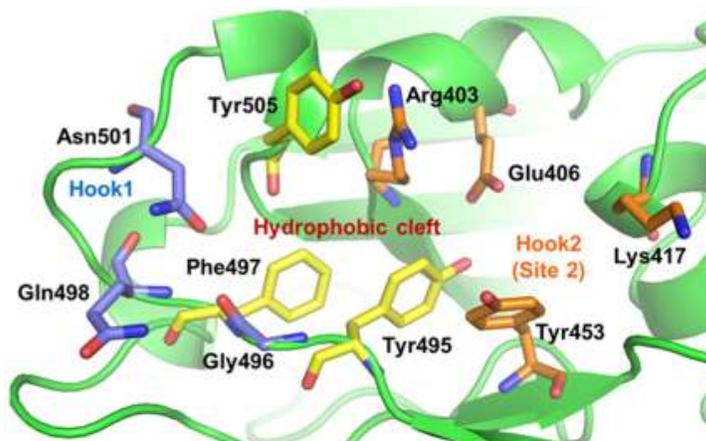


Figura 1.18. Los residuos dentro y alrededor del Sitio 1 y el Sitio 2 forman un buen sitio de unión para ligandos. La topología del sitio de unión se puede dividir en regiones de hendidura hidrofóbica, *hook* 1 y *hook* 2 (134).

A pesar de los desafíos en la inhibición de interacciones proteína-proteína (PPIs) (128–133) hallazgos ofrecen perspectivas valiosas para el desarrollo de terapias dirigidas contra la infección por SARS-CoV-2 (134).

1.6. Bloqueo de interacciones proteína-proteína con moléculas orgánicas pequeñas

No muchas moléculas tienen la capacidad de modular PPIs. Las más destacadas son los anticuerpos seguidos de los péptidos y péptidos miméticos, y en último lugar se encuentran las moléculas pequeñas. Las regiones hipervariables de los anticuerpos logran alcanzar una alta especificidad y afinidad por ciertos motivos antigénicos de las proteínas blanco, a las cuales se unen con gran avidéz impidiendo, sea por efecto estérico o alostérico, la unión de éstas a su receptor o ligando. En el caso de SARS-CoV-2 ha quedado ampliamente demostrada la eficacia inmunoproláctica de los anticuerpos dirigidos contra Spike/RBD en reducir la capacidad infectiva del virus al neutralizar la unión a su receptor ACE2 (135). Sin embargo, desde el punto de terapéutico (ej. inmunización pasiva), los anticuerpos presentan ciertas desventajas como ser una baja permeabilidad y requerimiento de administración endovenosa por su casi nula absorción oral. A estas dificultades se suman sus altos costos de producción ya sea en modelos animales como celulares (65,136).

Los péptidos y peptidomiméticos tienen baja estabilidad metabólica y biodisponibilidad. Los compuestos químicos de bajo peso molecular, por su parte, presentan buena biodisponibilidad y estabilidad, y bajos costos de producción, sin embargo, su efectividad para inhibir PPIs representa un gran desafío, el cual se detalla a continuación.

Es bien conocido que bloquear PPIs con moléculas orgánicas pequeñas es un objetivo complejo. La mayoría de las dianas moleculares para este tipo de moléculas suelen ser enzimas, canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G y receptores nucleares (137). Estas proteínas ofrecen sitios, generalmente bolsillos estructurales, parcialmente expuestos al solvente, que favorecen la unión selectiva de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que, al hacerlo, alteran las funciones de la macromolécula. Los blancos moleculares que cumplen dicho criterio son considerados *druggable*, es decir, aptas a la intervención farmacológica. Para

unirse de manera efectiva y selectiva a sus blancos moleculares, los compuestos deben reunir características fisicoquímicas (grupos funcionales, estructura, polaridad, hidrofobicidad, etc) compatibles con la de los sitios de reconocimiento de los mismos (138). Las PPIs suelen involucrar grandes superficies de contacto, planas, desprovistas de hendiduras donde moléculas pequeñas puedan unirse. A su vez la interacción entre proteínas se caracteriza por presentar una alta dinámica y estar gobernada por múltiples tipos de interacciones: hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y en algunos casos enlaces covalentes (139). Los complejos P-P se pueden clasificar en estables o transitorios. En el caso de los primeros, su formación está gobernada principalmente por interacciones hidrofóbicas de gran afinidad y donde las moléculas de agua están excluidas de la interfaz P-P. Los complejos transitorios, en cambio, están en permanente estado de asociación-disociación, la interfaz de contacto suele ser más reducida y, en general, involucra residuos polares y/o cargados, es decir interacciones de puentes de hidrógeno y/o electrostáticas (140).

La afinidad entre proteínas y por ende la estabilidad de los complejos está dada por la energía libre de unión de las proteínas (141,142).

En general, el área de contacto entre dos proteínas puede ir de los 1500 a los 3000 Å² (137), mientras que el área de cobertura de moléculas de bajo peso molecular (<800 Da) llegaría a los aproximadamente 300-1000 Å² (139). Dicho de otra forma, pequeñas moléculas podrían llegar a cubrir solo un porcentaje parcial (10-67%) del área de una PPI. Para aumentar dicha área de cobertura con el fin de superar la energía libre de unión entre proteínas, es necesario incrementar el PM de la molécula orgánica. Sin embargo, al hacer esto, se estarían poniendo en riesgo las propiedades fisicoquímicas de los potenciales ligandos/inhibidores que serían compatibles con propiedades farmacológicas de administración, distribución, metabolismo y excreción (ADME), violando la regla de 5 de Lipinski, la cual indica que para que el compuesto pueda ser administrado vía oral 1) no debe contener más de cinco átomos donadores de enlaces de hidrogeno 2) no debe contener más de diez átomos aceptores de enlace de hidrogeno 3) su peso molecular debe ser <500 Da y 4) su coeficiente de reparto octanol-agua (logP) debe de ser < 5 (143). No obstante, estudios por escaneo de alanina, en los cuales se mutan aa_s por alanina con el fin de evaluar como contribuyen las cadenas laterales de los aa_s mutados a la energía de unión en una PPI, han mostrado que, a pesar de la gran

superficie de contacto entre proteínas, suele haber grupos compactos de aa_s específicamente involucrados en la interacción, que contribuyen desproporcionadamente a la energía libre de unión y a la unión entre proteínas. Estas regiones, denominadas *hot spots* (141,144), pueden abarcar en total unos 600 Å² (140) de superficie y están pobladas de residuos de triptófano, tirosina y arginina, y en menor medida histidina y asparagina. Todos estos residuos ofrecen múltiples opciones de interacciones. Por ejemplo, el Trp y la Tyr, presentan una gran superficie hidrofóbica y son capaces de establecer interacciones π- aromáticas, así como de actuar como dadores de puentes de hidrógeno. La Arg tiene la capacidad de formar hasta 5 puentes de hidrógeno. Su grupo guanidinio tiene un sistema pseudoaromático debido a la deslocalización electrónica del sistema π y, además, a través de su carga positiva puede establecer interacciones electrostáticas. Este residuo también tiene un carácter hidrofóbico debido a sus 3 carbonos metilenos (145). Estas regiones presentan un gran atractivo como blanco de unión de moléculas pequeñas ya que el efecto desestabilizador sobre la PPI sería dramático. Por lo general las PPIs con superficies de contacto < 2000 Å² presentan un solo hot spot, mientras que aquellas con superficies mayores poseen más de uno. En este contexto, cuanto más cercanas estén estas regiones mayores serían las chances de encontrar moléculas pequeñas que se unan a residuos de *hot spots* vecinos y por lo tanto que la inhibición de la PPI sea más efectiva.

Sin embargo, no dejan de ser un objetivo complejo. Por ejemplo, bloquear interacciones hidrofóbicas requiere de compuestos lipofílicos y con una gran complementariedad para afectar la interacción (140). Estas características fisicoquímicas comprometerían la solubilidad de estas moléculas y dificultarían su desarrollo como fármacos. También hay que tener en cuenta los requerimientos estéricos y geométricos en los sitios de unión, los cuales son difíciles de abordar con moléculas muy pequeñas, e indefectiblemente conllevarían a tener que incrementar el tamaño y PM de los compuestos.

Una de las estrategias más usadas para identificar inhibidores de PPIs es a través de *high-throughput screening* (HTS). Los métodos de tamizaje más comúnmente usados están basados en los ensayos de competencia, en donde las proteínas se pueden utilizar en su forma completa o, lo que es más habitual, sólo los dominios involucrados en la interacción. Las técnicas más empleadas son las de ELISA,

polarización de fluorescencia (FPA), transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). A pesar de ser de las estrategias más utilizadas, los ensayos de HTS presentan varias dificultades al querer abordar PPIs. Normalmente las tasas de identificación de *hits* son bajas, son propensos a arrojar resultados falsos positivos, en algunos casos producto de artefactos debido a la degradación o precipitación de las proteínas en estudio. Muchas PPIs al ser hidrofóbicas no poseen inhibidores de alta afinidad ya que se requiere una complementariedad alta de los compuestos para ser activos y la actividad inhibitoria de los mismos muchas veces se encuentra cerca de la señal de los artefactos, resultando difícil separar unos de otros (140). Por otro lado, la gran mayoría de las quimiotecas disponibles han sido desarrolladas con características (ej. bajo PM, átomos dadores y aceptores de puentes de hidrógenos, hidrofobicidad, etc) que las hacen óptimas para actuar sobre blancos moleculares clásicos y no PPIs (138,141).

La optimización de compuestos con capacidad de interferir con la PPIs suele incluir la generación de análogos con mayor lipofilicidad, rigidez y aromaticidad que contengan nuevos grupos funcionales que incrementen la afinidad por el receptor. Generalmente, esto va en detrimento de las propiedades ADME y es común que las moléculas con buena actividad contra las PPIs violen algunas reglas que estiman su biodisponibilidad por vía oral (regla de Lipinski) por lo que se espera que estos compuestos sean propensos a fallas preclínicas y clínicas (139,141). Sin embargo, la química medicinal ha logrado superar algunos de estos problemas, y existen inhibidores de este tipo de interacción por fuera de este espacio químico asociado con buenas características farmacológicas, un ejemplo de ellos es el fármaco de administración oral contra el receptor Bcl-2, Venetoclax, un compuesto perteneciente a la familia de las pirrolopiridina de 868 Da. Se están utilizando, cada vez más, nuevas tecnologías de formulación que abordan esta problemática, entre ellas las nanopartículas, los geles, las microemulsiones, los dendrímeros y liposomas, entre otras, y permiten que moléculas con alto PM y logP logren una biodisponibilidad oral aceptable.

1.7. A cuatro años del comienzo de la pandemia. Tratamientos disponibles contra el SARS-CoV-2

Cuando se inició este proyecto, no existía ningún medicamento aprobado ni vacuna contra el SARS-CoV-2, a pesar de que se estaban llevando a cabo múltiples ensayos para desarrollar nuevas terapias. A su vez, el conocimiento sobre el comportamiento y tasa de mutabilidad de este nuevo CoV era limitado. A lo largo de estos años, se desarrollaron a una velocidad sin precedentes diversas vacunas, algunas de ellas emplearon tecnologías innovadoras, nunca antes aplicadas, como las vacunas de ARN mensajero. Todo ello llevó a mitigar el avance de la pandemia y finalmente a acabar con ella.

También la farmacéutica Pfizer desarrolló un fármaco nuevo, el Paxlovid compuesto por Nirmatrelvir/Ritonavir, el primero un potente inhibidor de M^{pro} que se co-administra con el segundo que actúa potenciando el efecto del primero al inhibir su metabolización mediada por el citocromo P450 CYP3A. También se reposicionaron algunos antivirales ya en uso como el Remdesivir y el Molnupiravir ([Figura 1.5.](#)), ambos análogos de ribonucleótidos inhibidores de la RdRp.

A su vez se reportaron más de 300 anticuerpos monoclonales contra *Spike* de los cuales más de 20 están en ensayos clínicos (65). Algunos de ellos fueron aprobados para su uso como el mAc bamlanivimab (146) el cual se une al RBD impidiendo su interacción con ACE2. Otro ejemplo es el cóctel de mAc, casirivimab/imdevimab, ambos se unen a regiones no solapadas del RBD, la combinación ayuda a disminuir la probabilidad de que surjan mutantes de escape debido a la presión selectiva de la monoterapia (147). También se utilizó como terapia plasma convaleciente (38,69).

Enfocándonos en la búsqueda de moléculas pequeñas contra la interacción *Spike*/ACE2, en el correr de estos años, se han reportado varias moléculas con potencial de inhibir la misma en ensayos *in silico* e *in vitro*, pero ninguna de ellas ha llegado a ensayos clínicos (65). Por ejemplo, se identificaron dos compuestos, MU-UNMC-1 y MU-UNMC-2, ambos mostraron actividad antiviral con IC₅₀ de 0,67 μ M y 1,72 μ M, respectivamente. A su vez MU-UNMC-2 mostró un efecto sinérgico en combinación con remdesivir (148). También el compuesto NBCoV1 mostró ser un potente inhibidor pancoronavirus con potencias en el orden nanomolar, presentando

un $IC_{50} = 23$ nM para el SARS-CoV-2 y muy buenas propiedades ADME (149). Sin embargo, todos ellos requieren ser optimizados previo a ser ensayados clínicamente.

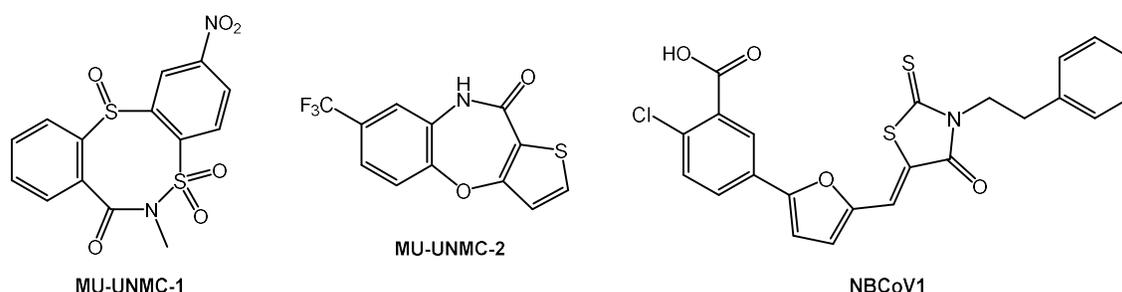


Figura 1.19. Pequeñas moléculas identificadas como inhibidores de la interacción *Spike*/ACE2.

Por otro lado, en el correr de estos años el SARS-CoV-2 ha experimentado diversas mutaciones, especialmente en su proteína *Spike*. Esto ha llevado a la evolución del virus y al surgimiento de variantes, muchas de las cuales han predominado y han sido clasificadas por la OMS como variantes de preocupación (Alpha, Beta, Gamma, Delta y Ómicron) debido a su mayor transmisibilidad y virulencia, su gran capacidad de evadir la neutralización por anticuerpos generados previamente y por su refractariedad a tratamientos y vacunas (150–152). La mayoría de las mutaciones significativas, que le confieren al virus ventajas replicativas o adaptativas, se limitan a variantes específicas, por ejemplo, en Alpha, Beta y Gamma las mutaciones incluyen los residuos E484K y N501Y, la primera le confiere al virus resistencia a varios anticuerpos neutralizantes, así como también a la neutralización por plasma convaleciente y suero postvacunación (153,154), mientras que la segunda aumenta la afinidad del RBD por ACE2 con el consecuente incremento de la infectividad y virulencia (155,156). Por otro lado, las mutaciones L452R y T478K presentes en Delta y Ómicron aumentan la afinidad de la *Spike* por ACE2 y confieren al virus la capacidad de evadir al sistema inmune. La mutación L452R incrementa la estabilidad de la *Spike* promoviendo la capacidad infectiva, fusogénica y replicativa del SARS-CoV-2 (157–160) A su vez en Ómicron se observan las mutaciones Q493R y Q498R que incrementan la afinidad por ACE2 (161,162). Una de las mutaciones comunes a todas las variantes es la D614G (163,164). Esta mutación se encuentra próxima al sitio de escisión por furina S1/S2. El cambio de aspártico por glicina interrumpe un enlace de hidrógeno y un puente salino interprotómero que involucra a aa_s de S2, cambiando alostéricamente la dinámica conformacional de los

estados *up* y *down* del RBD, favoreciendo el primero de ellos. También se ha visto que esta mutación le confiere a la *Spike* una mayor susceptibilidad a la escisión por furina. Todo ello lleva a una mayor infectividad y transmisibilidad del virus (165–167).

SARS-CoV-2 Spike(S)

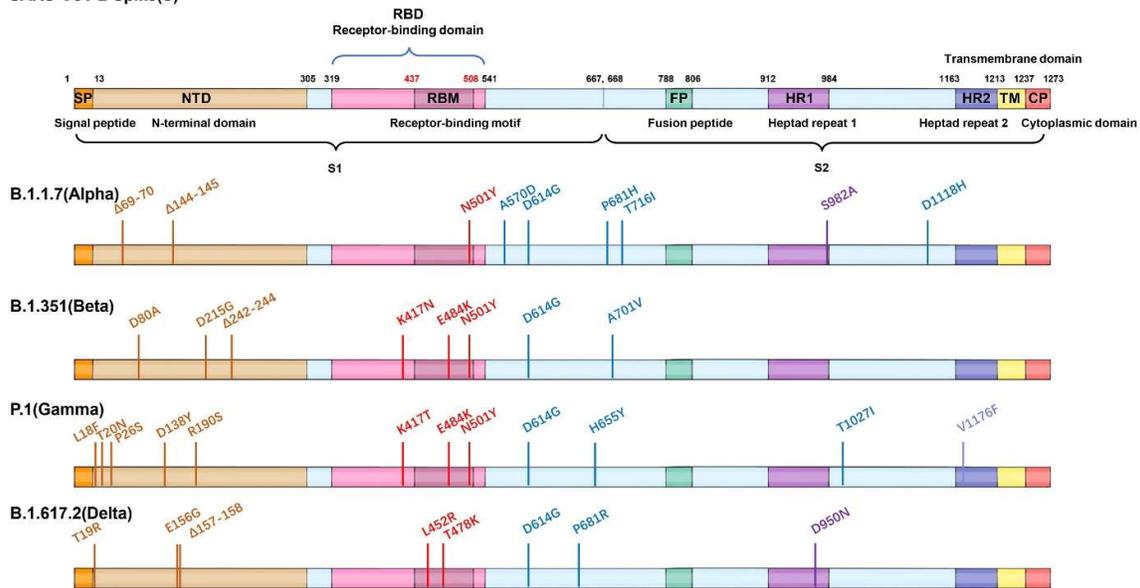


Figura 1.20. Esquema donde se muestran las mutaciones presentes en la proteína *Spike* de cuatro variantes de preocupación (Alfa, Beta, Gamma y Delta) del SARS-CoV-2 (162).

La aparición de variantes ha planteado un gran desafío en el control de la pandemia y si bien hoy en día la infección por SARS-CoV-2 está controlada, la reemergencia de nuevas variantes, como ya ha sucedido con otros CoVs, no solo obliga a una permanente vigilancia epidemiológica sino también a contar con terapias farmacológicas de respaldo de rápida implementación. Por tanto, el continuo estudio del comportamiento de este virus y su evolución es necesario para el desarrollo y actualización de vacunas y tratamientos antivirales más eficaces.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

2.1 Objetivo General

El objetivo principal de este trabajo fue llevar adelante una campaña de identificación y caracterización de moléculas orgánicas pequeñas o medianas capaces de bloquear la interacción *Spike/ACE2* impidiendo de esta manera la invasión del SARS-CoV-2 a la célula huésped.

Vale la pena destacar que este proyecto de investigación se desarrolló en paralelo a una campaña de descubrimiento de compuestos activos contra las proteasas de SARS-CoV-2. Uno de los objetivos comunes de ambas campañas de descubrimiento de fármacos fue la exploración de quimiotecas nacionales de compuestos generadas a partir de contribuciones de grupos de investigación del Institut Pasteur de Montevideo y de la Universidad de la República. Para muchos de estos compuestos se cuenta con información detallada sobre su bioactividad, modo de acción y/o propiedades farmacológicas contra distintos agentes patógenos o enfermedades no transmisibles tanto en el área de la medicina humana como veterinaria. Si bien se podrían haber explorado quimiotecas comerciales, nuestra motivación era valorizar el conocimiento nacional y agilizar posibles ciclos de optimización de compuestos candidatos mediante la interacción fluida con grupos locales dedicados a la síntesis química.

2.2 Objetivos específicos

1. Selección de compuestos candidatos de la quimioteca nacional.
2. Cribado de moléculas candidatas con actividad inhibitoria de la interacción *Spike/ACE2*.
3. Determinación de la citotoxicidad de los *hits* en líneas celulares humanas que son blanco de infección por SARS-CoV-2.
4. Determinación de la actividad antiviral de los hits con mejor actividad inhibitoria de la interacción *Spike/ACE2*.

2.3 Estrategia de trabajo

Etapa 1 - Selección *in silico* de candidatos

Con el fin de identificar inhibidores de la interacción entre *Spike* y ACE2, se inició el proceso seleccionando moléculas orgánicas de las quimiotecas locales análogas a compuestos previamente reportados en la literatura como posibles inhibidores de esta interacción. Para ello se emplearon programas computacionales de búsqueda de análogos estructurales.

Etapa 2 – Cribado experimental en busca de actividad inhibitoria contra *Spike/ACE2*

La actividad inhibitoria de los compuestos seleccionados se evaluó a una concentración fija de 100 μM (siempre y cuando la solubilidad del compuesto lo permitió) utilizando un kit comercial de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Este ensayo se basó en la detección de la unión *Spike-ACE2* a través de una reacción colorimétrica empleando anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP) que reconocieron un *tag* de histidina contenido en ACE2.

En función de los resultados obtenidos en esta primera fase de selección, el tamizaje se extendió hacia análogos de los *hits* experimentales identificados o bien hacia nuevos compuestos. La inclusión de análogos fue crucial ya que permitió realizar análisis de relación estructura-actividad (REA) con el fin de identificar tanto los farmacóforos como los grupos funcionales asociados a actividad inhibitoria.

Para los compuestos que inhibieron esta interacción en un porcentaje mayor al 50% a la concentración antes mencionada, se procedió a confirmar el resultado mediante una segunda metodología. Para ello se empleó un ensayo con células HEK-293 que sobreexpresan ACE2 humana en su membrana. Los compuestos se incubaron a 100 μM con el RBD de la *Spike* y luego se agregaron las células. El RBD se etiquetó y luego se reveló con un fluoróforo. La detección y cuantificación de la unión de RBD a ACE2 se realizó mediante técnica de citometría de flujo. Se confirmó el

resultado para aquellos compuestos que inhibieron la interacción en un porcentaje mayor al 50%.

Etapa 3 - Determinación de la citotoxicidad de los hits

La citotoxicidad de los compuestos identificados como *hits* (con una actividad inhibitoria > 50% a 100 μM) se evaluó sobre líneas celulares humanas provenientes de órganos o tejidos vulnerables a la infección y daño por SARS-CoV-2, como las células pulmonares (A549) y las células epiteliales intestinales (HT-29). Este análisis fue fundamental ya que definió el potencial de los compuestos para avanzar hacia los ensayos de actividad antiviral. Pasarón a la siguiente etapa aquellos compuestos que presentaron concentración citotóxica 50 (CC_{50}) $\geq 50 \mu\text{M}$.

Etapa 4 - Evaluación de la actividad antiviral

La actividad anti-SARS-CoV-2 de los compuestos que mostraron baja citotoxicidad contra células de mamíferos ($\text{CC}_{50} \geq 50 \mu\text{M}$) se analizó en ensayos de infección celular utilizando células Vero. Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con el Institut Pasteur de Corea, que dispone de laboratorios de seguridad biológica nivel 3 y ha desarrollado un ensayo contra SARS-CoV-2 de alto contenido y rendimiento que de manera simultánea evalúa citotoxicidad e infectividad. Se realizaron curvas dosis-respuesta para cada compuesto con diez puntos con concentraciones entre 0,1-50 μM . Fueron considerados *hits* aquellos compuestos que presentaron concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) < 50 μM .

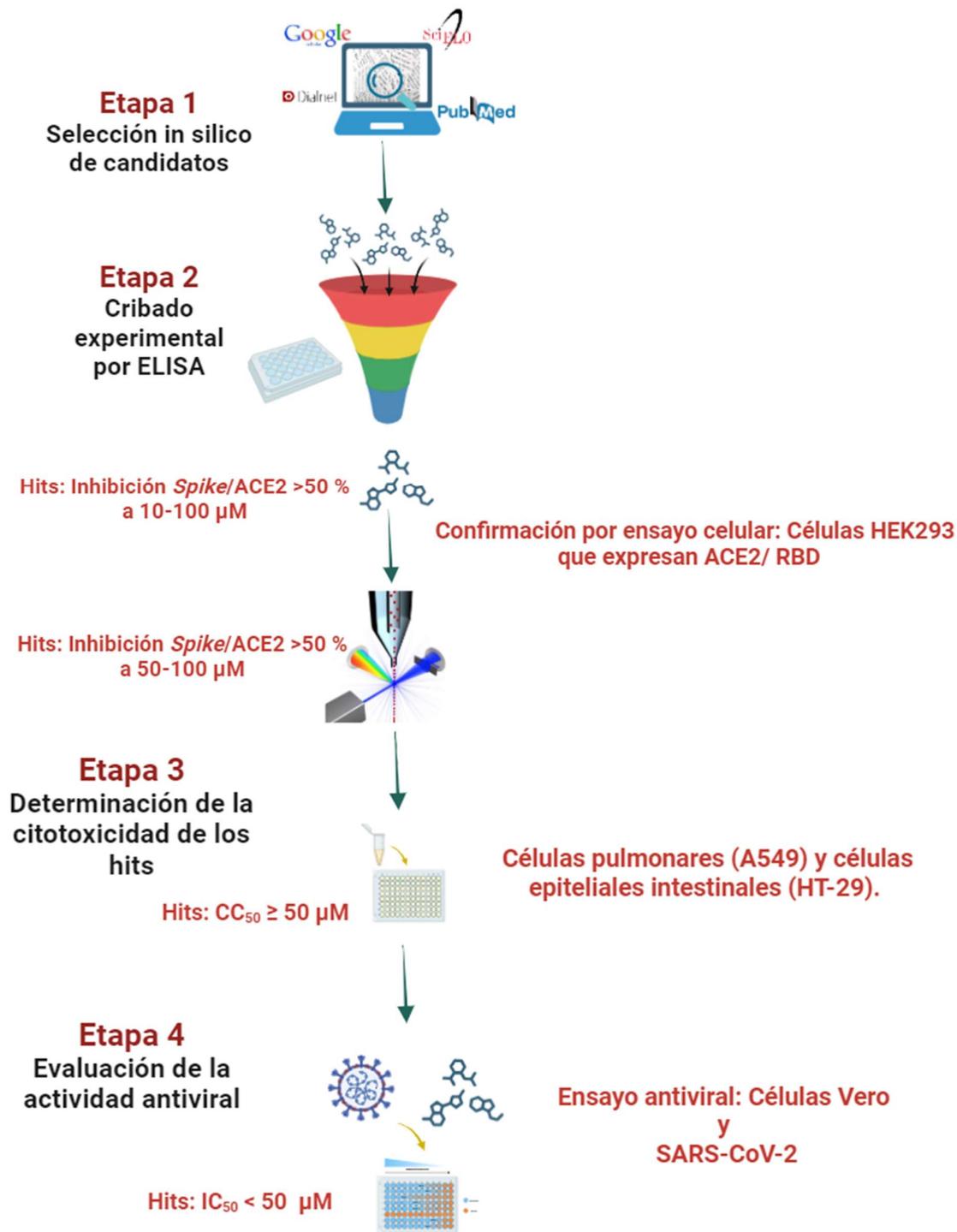


Figura 2.1. Esquema de la estrategia de trabajo para la identificación de inhibidores de la interacción *Spike*/ACE2. Los detalles metodológicos empleados en cada uno de estos ensayos se brindan en las diferentes secciones del próximo capítulo ([MATERIALES Y MÉTODOS](#)).

CAPÍTULO 3 – MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Etapa 1 - Selección *in silico* de candidatos

En primer lugar, se organizó y curó la base de datos de las quimiotecas nacionales en donde todas las moléculas que la componen fueron listadas con sus correspondientes características: Código de referencia, laboratorio de procedencia, código SMILES, peso molecular (PM), estructura, miligramos disponibles, actividad biológica, referencias bibliográficas. Luego se realizó una búsqueda bibliográfica de moléculas con potencial inhibitorio de esta interacción en buscadores web como Google Académico, Dialnet, Pubmed, Scielo, entre otros. Estas búsquedas se realizaron entre los meses de marzo y abril de 2021. Con las moléculas halladas se conformó una lista con sus códigos SMILES y sus estructuras (Anexo: Tabla A1). A partir de este listado se realizó una inspección visual de moléculas estructuralmente análogas en la base de datos de las quimiotecas nacionales. Aquellas que tenían similitud estructural fueron seleccionadas para el cribado. También se utilizó el *software* Chemfinder 15.0, en el cual se cargó la base de datos de las quimiotecas nacionales. Partiendo de la estructura de cada molécula reportada en la bibliografía, el programa realizó una búsqueda por estructura y/o subestructura en la base de datos cargada. Asimismo, el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) colaboró con la selección de moléculas. Para ello les fueron brindados los códigos SMILES de las moléculas reportadas en la bibliografía como ligandos/inhibidores *in vitro* de *Spike*. A partir de estos *scaffolds*, se realizaron determinaciones de similitud estructural sobre la base de datos de las quimiotecas nacionales utilizando el método de *fingerprint* de Morgan, con radio de 2, tanto de la clase de conectividad extendida (ECFP) como de la clase funcional (FCFP). Para ECFP se tienen en cuenta las siguientes características de cada átomo: número atómico, carga atómica, número de hidrógenos unidos, número de vecinos inmediatos que no son hidrógeno, la masa atómica y si el átomo es parte de un anillo. Para FCFP las características que se tienen en cuenta para cada átomo son: aromaticidad, dadores de enlaces de hidrógeno, aceptor de enlaces de hidrógeno, acidez, basicidad, halógeno. Los *fingerprints* generados fueron comparados mediante el coeficiente de Tanimoto. Las matrices obtenidas se graficaron en *heatmaps*. También se identificaron por *scripts* los pares de compuestos con coeficientes de Tanimoto ≥ 0.5 .

3.2 Etapa 2: Cribado experimental en busca de actividad inhibitoria contra Spike/ACE2

3.2.1 Preparación de compuestos

Se prepararon soluciones *stock* de los compuestos seleccionados a concentraciones de 10 o 20 mM, según su solubilidad, diluidos en 100% v/v de DMSO (#D5879, Sigma). De ser necesario y para favorecer su solubilidad, los compuestos fueron incubados en baño de ultrasonido o a 37°C durante 5 a 15 minutos. Luego se realizaron alícuotas de las soluciones madre con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Además, se contaba con soluciones previamente preparadas y congeladas de algunos compuestos utilizados en proyectos anteriores, con concentraciones que oscilaban entre 25 - 1 mM.

3.2.2 Cribado por ELISA de la quimioteca blanco molecular-dirigida

Se utilizaron dos ensayos de ELISA para el cribado de la quimioteca por razones que se explican en [Resultados-Ensayos de ELISA](#). A continuación, se detalla cada uno de ellos.

3.2.2.1. Ensayo de ELISA - Kit comercial de EpigenTek (# D-1004)

En este ensayo la subunidad S1 de la proteína *Spike* se encontraba pre-adsorbida a los pocillos de la placa. Siguiendo el protocolo, se comenzó agregando a cada pocillo 50 µL de cada compuesto de interés a 100 µM¹/ 0.5% v/v DMSO diluido en buffer de ensayo. Como control de inhibición, el *kit* proveía de un anticuerpo anti-ACE2 el cual se ensayó a 100 µg/mL. Para el blanco y para el control negativo se agregaron solamente 50 µL de buffer de ensayo con 0,5% v/v DMSO. Para cada muestra y control se realizaron duplicados. La placa conteniendo las muestras de compuestos y controles se incubó durante 15 minutos a TA (temperatura ambiente). Luego se añadieron 50 µL de ACE2-His a 1 µg/mL a todos los pocillos excepto a los del blanco, a los cuales se le agregaron 50 µL de buffer de ensayo, y la incubación se extendió por 45 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con 150 µL de buffer de lavado 1X. A cada pocillo se le agregó 50 µL de un

¹ Algunos compuestos con baja solubilidad se evaluaron a una concentración inferior según se indica en la Tabla A2 en Anexos.

anticuerpo anti-His-HRP diluido 1/2000 en buffer de lavado y se incubó durante 20 minutos a TA. A continuación, se realizaron 5 lavados con 150 μ L de buffer de lavado. Posteriormente se agregaron 100 μ L de la solución desarrolladora, se protegió de la luz y se incubó a TA durante 5-10 minutos hasta que el color azul se hizo visible, en ese momento se añadieron 100 μ L de la solución de detención de la reacción. Inmediatamente se midió la absorbancia a 450 y 655 nm en el equipo Varioskan™ (Thermo Scientific).



Figura 3.1. Esquema del procedimiento del ensayo de ELISA con el kit comercial de EpigenTek.

3.2.2.2. Ensayo de ELISA - Kit Adipogen (#AG-48B-0001)

Se comenzó sensibilizando la placa con 100 μ L/pocillo de RBD (aa_s 319-541) fusionado al extremo N-terminal de la región Fc de la IgG1 humana (RBD-Fc) a 1 μ g/mL e incubando durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se removió la solución de los pocillos mediante pipeteo e invirtiendo y golpeando energicamente la placa contra un papel absorbente. A continuación, se agregaron 200 μ L/pocillo de buffer de bloqueo y se dejó incubando durante 2 h a TA. En paralelo se realizó una pre-incubación de 1h a 37°C de una solución de ACE2-Biotina a 0,5 μ g/mL en buffer de ELISA con los compuestos a 20 μ M/0,1% v/v DMSO, así como con los controles. Como control de inhibición se utilizó un anticuerpo monoclonal (mAc) anti-ACE2 a una concentración de 1 μ g/mL. Como control negativo se utilizó la solución de ACE2-Biotina a 0,5 μ g/mL con 0,1% v/v DMSO. Transcurrido el tiempo de bloqueo se aspiró el líquido de los pocillos y se realizaron 3 lavados con 300 μ L/pocillo con buffer de lavado 1X. Seguidamente se agregó 100 μ L/pocillo de las muestras y controles por duplicado. Al blanco se le agregaron 100 μ L/pocillo de buffer de ELISA. Se incubó durante 1h a 37°C. Luego se removió el líquido y se repitieron los lavados. A continuación, se agregó a cada pocillo 100 μ L de una dilución 1/200 de Estreptavidina-HRP. Se incubó a 37°C durante 1h. Se repitieron los lavados y se

agregó 100 µL/pocillo del reactivo TMB. Luego de incubar 5 minutos a TA, la reacción colorimétrica se detuvo añadiendo a cada pocillo 50 µL de H₂SO₄ 2M. Seguidamente se midió la absorbancia a 450 nm y 620 nm en el equipo Multiskan™

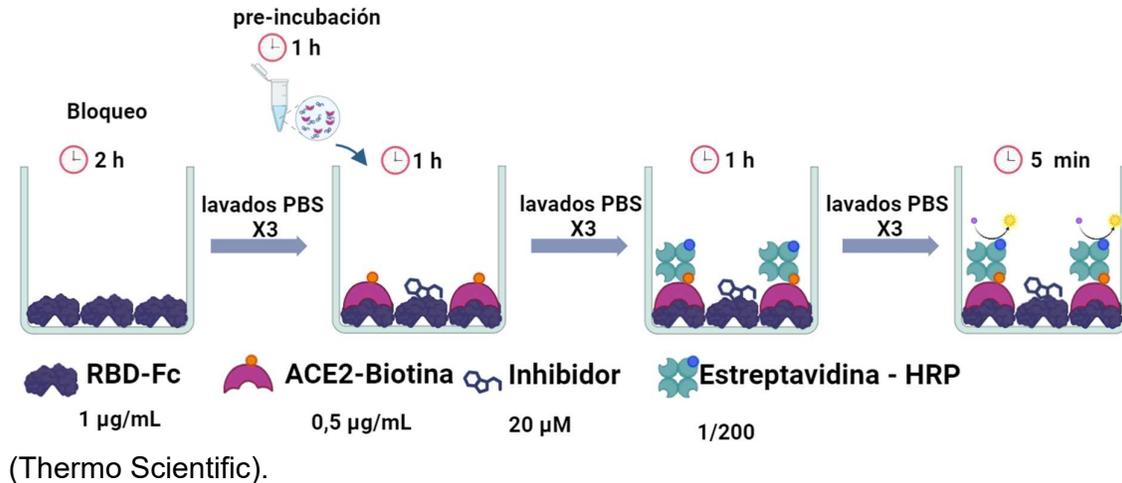


Figura 3.2. Esquema del procedimiento del ELISA con el kit comercial de Adipogen

Para todos los ensayos de ELISA la actividad inhibitoria de cada compuesto se expresó como porcentaje de inhibición de la unión *Spike*/ACE2 normalizada con los controles, calculada como: $\{[1 - (A_{450-655} \text{ Muestra} - A_{450-655} \text{ Blanco}) / (A_{450-655} \text{ Control negativo} - A_{450-655} \text{ Blanco})] \times 100\}$.

3.2.3. Ensayo celular de inhibición de la interacción RBD/ACE2

Este ensayo fue diseñado y puesto a punto por investigadores del laboratorio de Inmunovirología y del Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal del Institut Pasteur de Montevideo para la búsqueda de péptidos y anticuerpos con actividad inhibitoria de la interacción RBD/ACE2 y luego se adaptó para compuestos químicos. Para el ensayo se utilizó RBD-Streptag recombinante producido en células de insecto S2 por el laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur de Montevideo. También se utilizaron células HEK293 que sobreexpresan en su superficie ACE2 humana (HEK293T-hACE2) (NR-52511, BEI Resources).

En este ensayo se probaron aquellos compuestos que habían presentado actividad en el ELISA.

Dos días previos a iniciar el ensayo, se descongelaron y cultivaron las células en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v (Gibco) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. En una placa de 96 pocillos con fondo cónico, se agregó a cada pocillo 5 µL de RBD-Strep-tag a 1 ng/µL (34,4 nM) y 5 µL de una solución 1 mM/ 10% v/v DMSO del compuesto de interés. Se completó hasta un volumen final de 50 µL mediante agregado de buffer de ensayo (PBS 1X conteniendo BSA 1% p/v y EDTA 2 mM). Se agregaron los siguientes controles: como control de inhibición, 25 µL de suero de ratón anti-RBD diluido 1/250 + 5 µL a 1 ng/µL de RBD-Streptag. Como control de no inhibición: 5 µL a 1 ng/µL RBD-Strep-tag + 10% v/v de DMSO. Para cada compuesto se realizaron controles de interferencia, en donde se agregaron a los pocillos solamente 5 µL de los compuestos a 1 mM. A todos los pocillos se los llevó a un volumen final de 50 µL con buffer de ensayo. Para los pocillos del blanco se añadieron 50 µL de buffer de ensayo. Cada muestra y control se ensayó por duplicado. Las placas se incubaron durante 1h a 37°C, al cabo de lo cual se agregaron por pocillo 50 µL de una suspensión de 2x10⁶ células HEK293T-hACE2 (100.000 células/pocillo) y se incubó durante 1h en hielo. Luego de la incubación las células se lavaron 3 veces con 150 µL de buffer de ensayo, pipeteando para levantar el pellet y centrifugando la placa a 4°C y 400 g por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante por inversión de la placa y a todos los pocillos, excepto al del blanco (control de unión inespecífica del fluoróforo), se les colocó 30 µL de una dilución 1/400 de Strep-Tactin-Dye649 (#16461475, IBA Lifesciences) en buffer de ensayo. Se incubó la placa por 30 minutos a TA. A continuación, se realizaron 5 ciclos de lavado-centrifugación con 150 µL de buffer de ensayo, descartando el sobrenadante en cada uno de ellos. Por último, las células se resuspendieron en buffer de ensayo y se adquirieron en el citómetro Accuri C6 (BD Biosciences). Los resultados se analizaron a partir de gráficos *dot plots* y de histogramas utilizando el BD Accuri™ C6 Plus Software. La actividad inhibitoria de cada compuesto expresada como porcentaje de inhibición de la unión *Spike*/ACE2 normalizada a los controles, se calculó en base a la intensidad de fluorescencia media (IFM): $\{[(IFM \text{ Muestra} - IFM \text{ células sin RBD}) / (IFM \text{ células con RBD} - IFM \text{ Células sin RBD})] \times 100\}$.

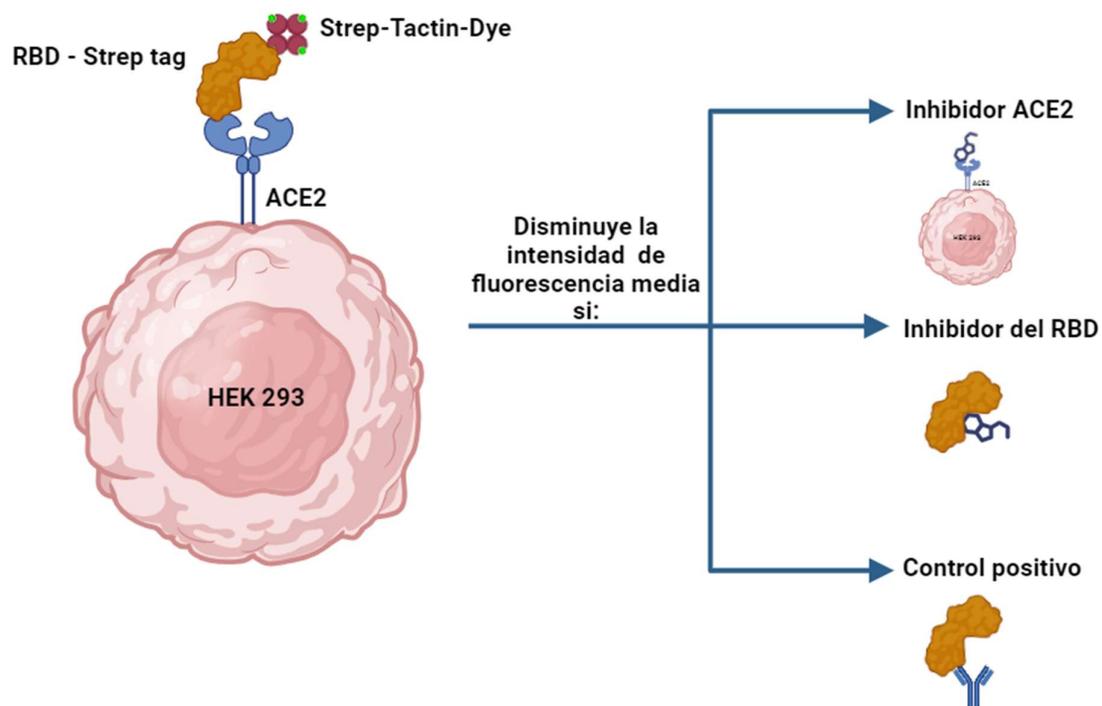


Figura 3.3. Esquema del ensayo celular de inhibición de la interacción RBD/ACE2. El RBD-Strep-tag se une a ACE2 sobreexpresada en células HEK293. Luego se une a este el Strep-Tactin-Dye. El fluoróforo excitado por el láser del citómetro emite fluorescencia que es captada por los detectores del citómetro. La intensidad de fluorescencia media disminuye proporcionalmente al nivel de inhibición de la interacción RBD/ACE2 mediada por el anticuerpo control (control positivo de inhibición) o el inhibidor.

3.3. Etapa 3 - Determinación de la citotoxicidad de los hits

Para aquellos compuestos seleccionados en base a los ensayos de ELISA y celular, se determinó su citotoxicidad frente a la línea celular de pulmón humano A549 (CCL-185, ATCC) y la línea celular de colon humano HT-29 (HTB-38, ATCC). Se utilizó el reactivo de proliferación celular WST-1 (#11644807001, Roche). La sal de tetrazolio es reducida a formazán por deshidrogenasas mitocondriales por lo que la cantidad de formazán formado es directamente proporcional a la actividad metabólica de las células y por lo tanto a su viabilidad. Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v (Gibco) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Para evaluar la viabilidad celular, se sembraron 100 µL de una suspensión celular (2x10⁴ células/µL) en una placa de cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37°C y una atmósfera de aire con 5% de CO₂. A continuación, se añadieron 100 µL/pocillo de los compuestos

disueltos en medio de cultivo a 100 µM/ 0,5-1% v/v DMSO por triplicado. Se añadió como control negativo 100 µL/pocillo de células no tratadas, y como control de muerte celular, las células fueron tratadas con Triton X-100 al 0,1% v/v, mientras que células tratadas con DMSO al 0,5-1% v/v fueron incluidas como control de citotoxicidad del vehículo. La incubación bajo estas condiciones se realizó por 24 h. Luego de ello se añadieron 100 µL/pocillo de WST-1 diluido 1/10 en medio de cultivo y la incubación se extendió por 1 h. La absorbancia se midió a 450 y 620 nm en el equipo Multiskan™ (Thermo Scientific). Se consideró la relación de ambas absorbancias para calcular la viabilidad. La citotoxicidad de cada compuesto se expresó como porcentaje de viabilidad celular normalizada con controles: $(A_{450-620} \text{ Muestra} - A_{450-620} \text{ Blanco}) / (A_{450-620} \text{ Control vehículo (DMSO al 0.5-1\% v/v)} - A_{450-620} \text{ Blanco}) \times 100$.

Para aquellos compuestos para los que la viabilidad celular fue < 50% a 100 µM, se procedió a determinar la CC₅₀ realizando el mismo procedimiento, pero añadiendo diferentes concentraciones del compuesto para realizar una curva de viabilidad de al menos 6 puntos. Los valores de CC₅₀ se calcularon utilizando GraphPad Prism (Versión 6.0) a partir del ajuste de datos a una función sigmoide de cuatro parámetros.

3.4. Etapa 4 - Evaluación de la actividad antiviral

La actividad contra el SARS-CoV-2 (cepa Wuhan) se evaluó mediante ensayo de infección de células Vero en el laboratorio de nivel de bioseguridad 3 y por el grupo de la Screening Discovery Platform del Institut Pasteur de Corea (168). Se emplearon dos protocolos diferentes que solo variaron en un paso inicial: pre-incubación o no de los compuestos con las partículas virales.

Protocolo A:

Las células Vero (ATCC CCL-81) se cultivaron en medio DMEM (Welgene) complementado con suero fetal bovino al 10% v/v (Gibco) y solución de antibiótico-antimicótico 1X (Gibco) a 37 °C y una atmósfera de aire con 5% CO₂. Para el ensayo se sembraron 1,2x10⁴ células en placas µClear negras de 384 pocillos

(Greiner Bio-One) 24 h antes del experimento. Para la curva dosis-respuesta de cada compuesto y controles se generaron diez puntos con concentraciones entre 0,1-50 μM . Como compuestos de referencia se utilizaron: Cloroquina (#C6628, Sigma), Remdesivir (#HY-104077, Med Chem Express) y Lopinavir (#S1380, Selleck Chem). También se incluyeron cuatro polipéptidos (P1, P2, P3 y P4) con actividad neutralizante sobre *Spike* (su diseño y producción se describe en (169)) a modo de control, para los cuales se generaron diez puntos con concentraciones entre 0,1-50 μM para P1, P2 y P3 y entre 0,02-10 μM para P4. A cada pocillo conteniendo células se agregó de manera secuencial cada compuesto o fármaco de referencia/polipéptido a una concentración dada y el virus SARS-CoV-2 ($\beta\text{CoV/KOR/KCDC03/2020}$; $\text{MOI}=0,0125$). Como control positivo, se agregó solamente DMSO al 0,5% v/v y como control negativo virus con DMSO al 0,5% v/v. Todas las condiciones fueron testeadas por duplicado. Luego de ello las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y una atmósfera de aire con 5% CO_2 . Culminado este tiempo las células se fijaron con PFA al 4% v/v (#50980495, Electron Microscopy Sciences) y se sometieron a ensayo de inmunofluorescencia. Para ello se utilizó un anticuerpo dirigido contra la proteína de nucleocápside (N) del SARS-CoV-2 (Sino Biological Inc.) y un anticuerpo secundario anti-conejo IgG (H+L) de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). El núcleo celular se tiñó con Hoechst 33342 (#H3570, Molecular Probes). Se utilizó un equipo Operetta CLS (PerkinElmer) para tomar las imágenes de microscopía de fluorescencia y se cuantificó el número de células y la tasa de infección usando el *software* Columbus™ (PerkinElmer). La actividad antiviral se normalizó utilizando los correspondientes controles (células infectadas y tratadas con vehículo: 100% infección, y células tratadas con vehículo, pero no infectadas: 0% infección). Los valores de IC_{50} y CC_{50} se calcularon a partir del ajuste de datos a las ecuaciones sigmoideas usando el *software* XLfit (Versión 5.5) o GraphPad Prism (Versión 6.0).

Protocolo B:

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el Protocolo A con la única diferencia que el compuesto, fármaco de referencia o polipéptido fue pre-incubado con SARS-CoV-2 durante 1h a 37°C, luego de lo cual esta mezcla se añadió a las células.

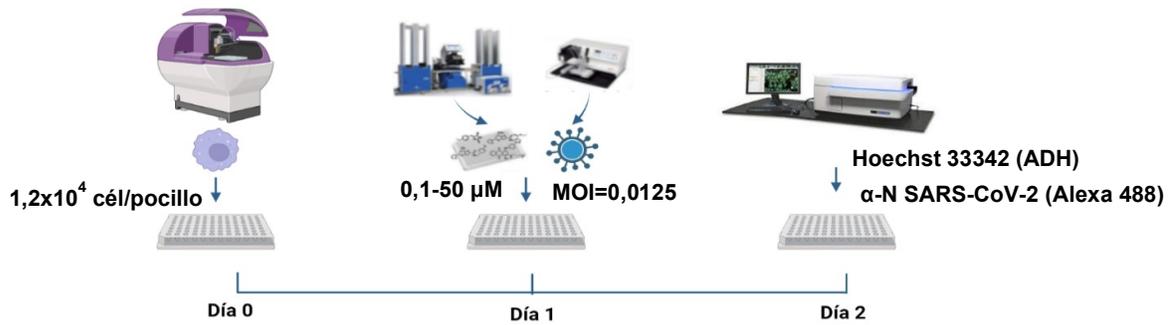


Figura 3.4. Esquema del ensayo antiviral.

3.6. Tratamiento de datos

La calidad de cada ensayo fue controlada por el factor Z' y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV). El factor Z' se define como $Z' = 1 - [3(\sigma_p + \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|]$ (siendo μ y σ la media y la desviación estándar, respectivamente, del control positivo, p , y el control negativo, n). El ensayo se considera aceptable si $Z \geq 0.5$ (170).

Para realizar gráficos y para el cálculo de promedios, desviaciones estándar, coeficiente de variación y demás operaciones se utilizó el GraphPad Prism (Versión 6.0).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo abordará inicialmente la presentación y análisis de los resultados generales obtenidos en cada ensayo. Posteriormente, se procederá a discutir con mayor profundidad los resultados más relevantes agrupados por familia química para facilitar el análisis de REA.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la actividad antiviral de varios de los compuestos estudiados en este proyecto fue determinada como parte de la campaña de identificación de inhibidores de las proteasas de SARS-CoV-2. Por lo tanto, con el propósito de enriquecer la discusión de los resultados, cuando se considere pertinente, se incorporarán a la misma datos de actividad antiviral de compuestos relacionados a *hits* de *Spike/ACE2* que, sin embargo, no fueron activos contra estos blancos moleculares.

4.1. Selección *in silico* de candidatos

Al inicio de este proyecto, las quimiotecas nacionales que teníamos a disposición se componían de un total de 2244 moléculas. Realizar el cribado experimental de ese número de compuestos hubiese resultado inviable desde el punto de vista técnico y económico. Técnicamente, no disponemos a nivel nacional de sistemas automatizados que faciliten la manipulación a pequeña escala y con alto rendimiento de un gran número de muestras. Económicamente, el costo de realizar dichos ensayos con kits comerciales habría sido significativo, estimándose en aproximadamente 37.125 a 43.875 US\$, dependiendo de la marca de los kits que hemos empleado, considerando el análisis de solo una réplica experimental y los controles sugeridos por las empresas.

De alguna forma, esta situación nos obligó a aplicar criterios de selección de un número acotado de moléculas de interés que serían luego evaluadas experimentalmente. Las opciones que se nos presentaban eran las siguientes: 1) preparar una quimioteca basada en blanco molecular (*target-focused library*) mediante una selección racional de moléculas nutrida por datos empíricos (y publicados) de análogos con potencial para inhibir la interacción *Spike/ACE2*, 2) preparar una quimioteca compuesta por “chasis” (*scaffolds*) químicos representativos de la diversidad química presente en las quimiotecas sin tener en

cuenta si los mismos guardaban o no relación estructural con moléculas con capacidad de inhibir a *Spike*/ACE2, y 3) preparar una colección aleatoria de compuestos. Las primeras dos aproximaciones tienen un componente racional, no así la tercera de ellas.

Si bien la segunda estrategia nos hubiese permitido explorar un espacio químico más amplio y potencialmente novedoso, estimamos que la chance de encontrar *hits* se vería comprometida. En contraposición, las posibilidades de encontrar *hits* serían mayores si se aplicara la primera aproximación, ya que en esta la búsqueda se nutre de información preexistente sobre la actividad de moléculas análogas. Por otro lado, si esta estrategia no diera lugar a la identificación de *hits* en nuestra quimioteca, la información obtenida aún sería valiosa ya que permitiría contrastar nuestros resultados con los de otros grupos de investigación. De hecho, las quimiotecas basadas en blanco molecular son generadas bajo la premisa que permiten cribar un menor número de compuestos para identificar *hits* y los grupos de estos últimos exhiben REA bien discernibles que facilitan los estudios posteriores de caracterización y optimización (171). Teniendo en cuenta todo esto, es que se optó por aplicar la estrategia empírica de selección de compuestos para el armado de la quimioteca de cribado.

Con ese fin, en primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de trabajos que reportaran la identidad de moléculas pequeñas capaces, o con el potencial de, inhibir la interacción *Spike*/ACE2. El sesgo hacia moléculas de bajo PM estuvo justificado por dos razones: por un lado, para incrementar la posibilidad de identificar moléculas con características tipo-fármaco, y por otro lado porque nuestras quimiotecas están conformadas por compuestos de síntesis orgánica y de bajo peso molecular. Varios de estos compuestos fueron diseñados para actuar sobre blancos moleculares convencionales y no PPIs. Las mismas contenían algunos pocos péptidos o péptidomiméticos.

Hasta marzo-abril de 2021, se habían identificado 116 moléculas con potencial de inhibir la interacción *Spike*/ACE2. La mayoría de estas moléculas fueron propuestas como tales a partir de estudios *in silico*. Únicamente 24 de ellas habían sido evaluadas *in vitro*, de las cuales 17 fueron probadas contra la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1), mientras que las restantes 7 fueron testeadas contra la

Spike del SARS-CoV, el cual, como se mencionó previamente, comparte un 76% de identidad de secuencia con el primero.

Se comenzó con una exploración visual (método manual) en la base de datos de nuestras quimiotecas en búsqueda de análogos estructurales de las moléculas identificadas en la literatura, seleccionando de esta manera 63 moléculas. Esta búsqueda se complementó con el uso del *software Chemfinder* (método computacional). Utilizando la búsqueda de candidatos por subestructura, se evidenció la recurrente presencia del templado estructural en una significativa cantidad de los compuestos. Por ejemplo, en la literatura se reportaba al cinamaldehído y geraniol como potenciales inhibidores de la interacción *Spike*/ACE2, al tratarse de moléculas pequeñas, su estructura fue identificada como subestructuras de varios de los compuestos (43 y 67, respectivamente). Como consecuencia, se obtuvo un extenso conjunto de moléculas identificadas mediante este enfoque de búsqueda, 111 moléculas, dos de ellas en común con la búsqueda manual. En total fueron identificadas 172 moléculas de las quimiotecas nacionales, muchas de ellas pertenecientes a la misma familia química.

Además, las estructuras tanto de los compuestos de nuestras quimiotecas como de aquellos identificados en la literatura como posibles inhibidores *in vitro* de la interacción *Spike*/ACE2 fueron proporcionadas al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos de la UNLP. Empleando *fingerprint* farmacofóricos de la clase funcional, este grupo de química computacional logró identificar 4 compuestos análogos a las moléculas reportadas.

A partir de estas búsquedas, se procedió a seleccionar las moléculas identificadas, y se añadieron análogos estructurales pertenecientes a la misma familia química para su posterior evaluación experimental. Este proceso condujo a la elección de 209 compuestos pertenecientes a diversas familias químicas (Figura 4.1).

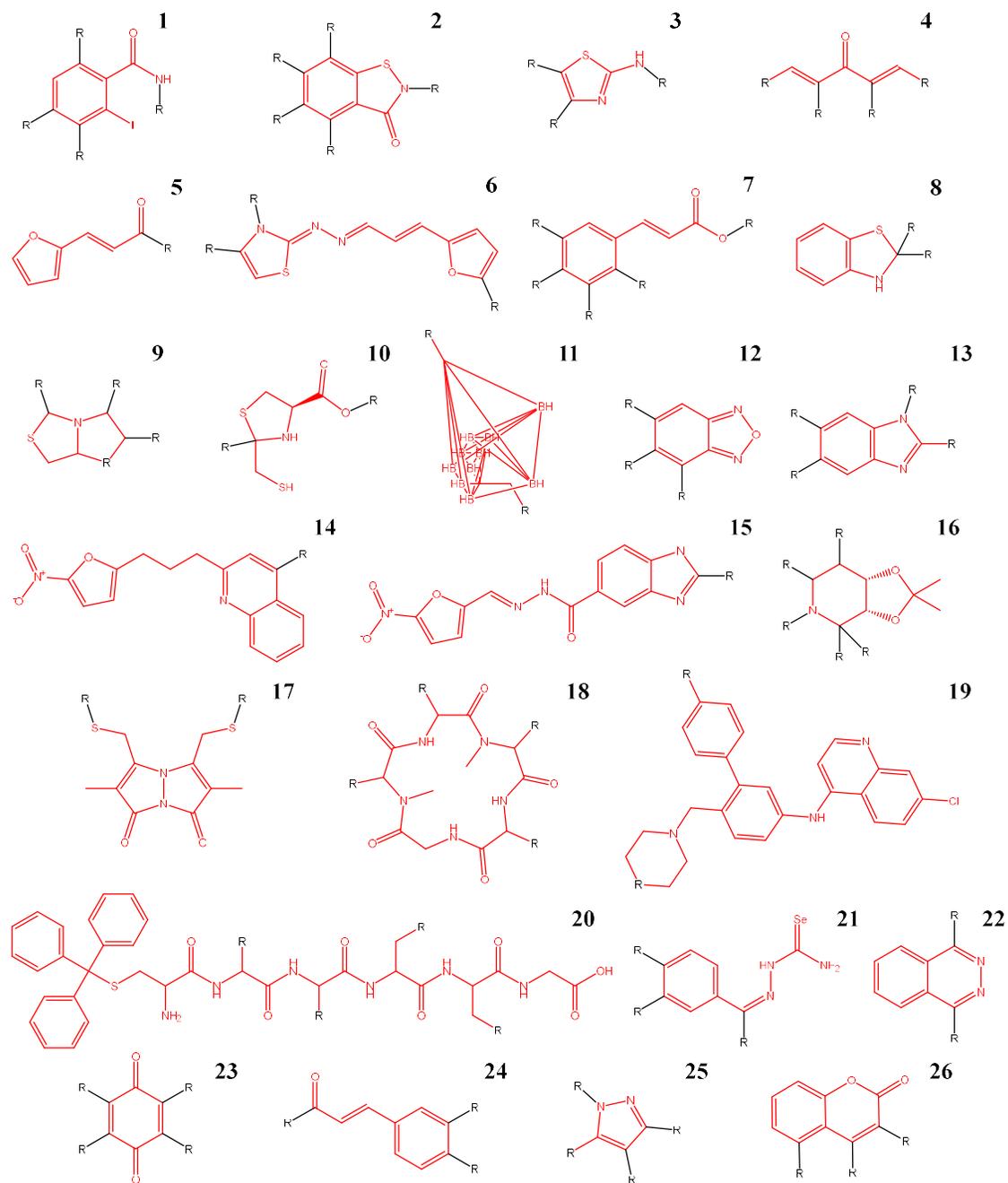


Figura 4.1. Se muestran los *scaffolds* representativos de las familias de compuestos probados en el primer cribado. **1 y 2:** Benzoisotiazolonas y precursores **3:** Aminotiazoles y derivados **4 y 5:** Arilidenonas **6** Hidrazinotiazoles y precursores **7:** Derivados del ácido cinámico **8, 9 y 10:** Bis-heterociclos y precursores **11:** Carboranos **12:** Furoxanos y Benzofuroxanos **13:** Benzoimidazoles **14 y 15:** Nitrofuranos **16:** Alcaloides **17:** Glucósidos y precursores **18 y 20:** Péptidos y ciclopéptidos **19:** Quinolinas **21:** Selenocarbazonas **22:** Benzodiazinas **23:** Quinonas **24:** Chalconas **25:** Pirazoles **26:** Cumarinas

Por lo general, los inhibidores de PPIs se caracterizan por ser moléculas voluminosas, complejas, rígidas, con elevados pesos moleculares y grupos hidrofóbicos (172). Durante el proceso de cribado, los resultados señalaron que la mayoría de los compuestos con actividad inhibitoria exhibían varias de estas características. Con base en esta información, se procedió a la selección de nuevos compuestos de la quimioteca que compartieran características similares para su posterior evaluación.

También se consideraron las características de la interacción *Spike*/ACE2. Como se mencionó en la introducción, en la interfaz de estas proteínas hay varios sitios drogables, algunos de naturaleza hidrofílica o moderadamente hidrofílica, que son propicios para la unión de compuestos con residuos polares. Además, la *Spike* presenta una hendidura hidrofóbica la cual es un *hot spot* para compuestos que contienen anillos aromáticos (173).

Así mismo, a medida que se actualizaba la bibliografía, se fueron incorporando nuevos compuestos. Por ejemplo, aunque se sabía que el RBD presentaba 4 enlaces disulfuro, su función y estabilidad eran desconocidos. En un trabajo publicado en 2022 se indica que dos de estos enlaces disulfuros, C379-C432 y C391-C525, son semiestables y susceptibles a la reducción, la cual desencadena cambios conformacionales importantes en la proteína que impiden su unión a ACE2 (174). Si bien estas cisteínas no están involucradas en la interacción con el receptor, actúan como un sitio alostérico y desestabilizar alguno de estos enlaces resulta en una buena estrategia para modular dicha interacción. Basándonos en esta publicación incorporamos compuestos con tioles libres.

En base a esto, posteriormente, y con la intención de identificar inhibidores más potentes y realizar análisis de REA, también se ensayaron 57 moléculas análogas a los compuestos identificados como activos en la primera ronda de tamizaje.

En resumen, se seleccionaron y evaluaron contra *Spike*/ACE2 un total de 266 compuestos, cuyas estructuras se detallan en la Tabla A2 en Anexos junto con sus respectivos resultados.

Para su análisis los compuestos se agruparon según su diversidad química en 21 familias químicas como se muestra en la Figura 4.2.

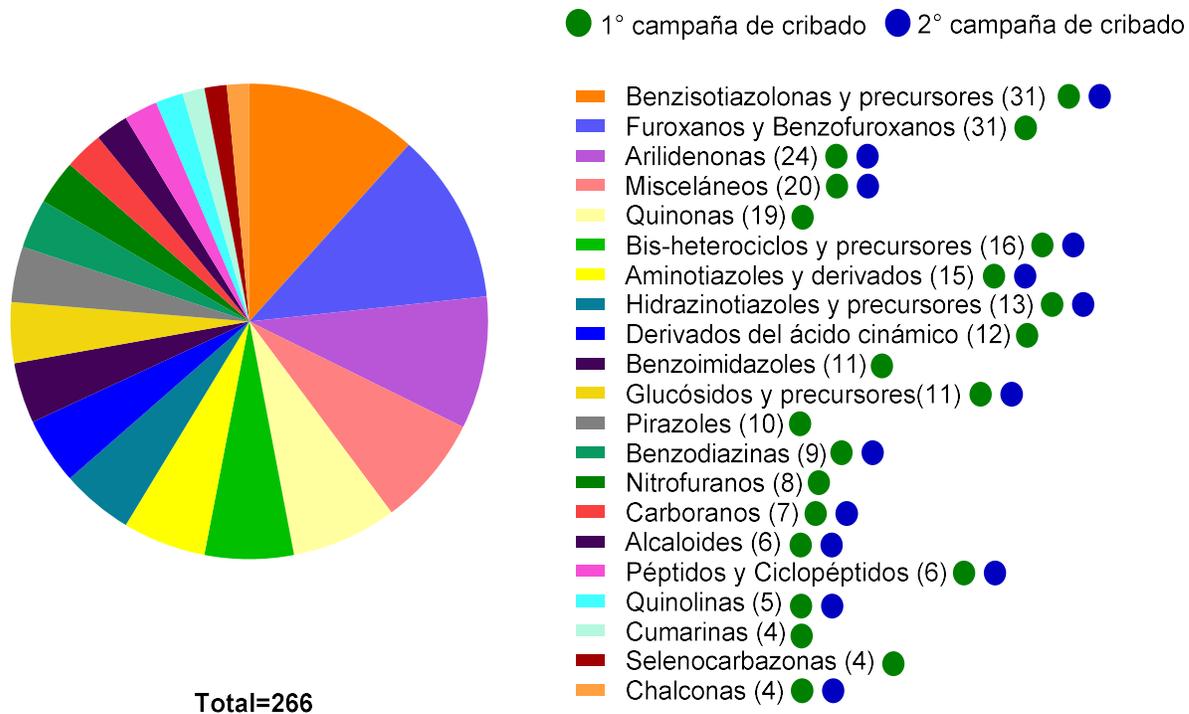


Figura 4.2. Gráfico de Torta que muestra el número de compuestos evaluados clasificados por familia química. En total, se ensayaron 266 compuestos, pertenecientes a 21 familias químicas. De estos, 209 compuestos de 21 familias químicas fueron estudiados en la primera campaña de cribado (círculos azules), mientras que 57 compuestos de 13 familias químicas fueron analizados en la segunda campaña de cribado (círculos verdes).

4.2 Cribado experimental en busca de actividad inhibitoria contra *Spike*/ACE2

4.2.1 Actividad Inhibitoria de la interacción *Spike*/ACE2 evaluada por ELISA

Para el cribado primario de los compuestos candidatos se empleó un kit comercial de ELISA de la empresa EpigenTek (EG) que permitió detectar la interacción *Spike*-ACE2. Este ensayo emplea la subunidad S1 completa de unión al receptor de la proteína *Spike* de SARS-CoV-2. Como se mencionó anteriormente (sección 1.5.1), esta subunidad consta de un total de 671 aa_s que abarcan al RBD (aa_s 319 a 541), y las secuencias que lo flanquean: dominio N-terminal (aa_s 14 a 305), región intermedia I (región entre S1 y S2) y motivo de corte de las subunidades 1 y 2 (aa_s 545 a 685). Si bien el RBD se destaca por su rol en la interacción con ACE2, las regiones lindantes tendrían funciones complementarias de estabilización a través de múltiples interacciones intra- o inter-subunidad así como en la dinámica conformacional de la proteína. Por lo tanto, consideramos a dichas regiones como *spots* alostéricos de interés para la identificación de ligandos desestabilizadores.

De manera complementaria, se decidió emplear un segundo kit de ELISA de la empresa Adipogen (AG) que, a diferencia del anterior, se compone del dominio RBD de la *Spike*. Por lo tanto, un “contra-cribado” con este ensayo podría identificar compuestos dirigidos específicamente contra este dominio de la proteína viral. Vale la pena destacar que, de acuerdo con lo indicado por los proveedores, la subunidad 1 y el RBD de la proteína *Spike* de cada *kit* pertenecen a la cepa Wuhan-Hu-1 de SARS-CoV-2 y fueron producidas de manera recombinante en células de mamífero.

Como se discutirá más adelante, el *kit* de EG presentó ciertos problemas de reproducibilidad por lo que el empleo del ensayo de AG serviría en parte para complementar algunos de los resultados obtenidos con el primero.

A modo de recuerdo se consideran *hits* aquellos compuestos con actividad inhibitoria > 50% a las concentraciones empleadas en cada ensayo: 100 y 50 µM contra S1 y ACE2 respectivamente, en el ensayo de EG, y 20 µM contra RBD y ACE2 en el ensayo de AG.

Cribado con Kit comercial de EpigenTek (EG)

Con el *kit* de ELISA de EG se evaluaron un total de 209 compuestos correspondientes a 20 familias y un subgrupo de varios singletes. Cuarenta y cuatro de estos presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50% a 100 o 50 μM . Estos *hits* pertenecen a 17 familias diferentes, lo cual remarca una gran diversidad química para los compuestos activos (Figura 4.3.).

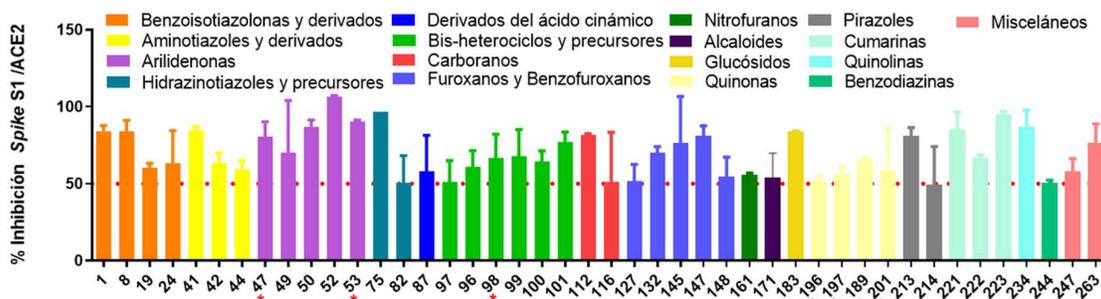


Figura 4.3. Compuestos inhibidores de la interacción S1/ACE2 en el ensayo de ELISA con el kit comercial de EpigenTek. Los compuestos se agrupan y colorean de acuerdo a la familia química a la que pertenezcan. Aquellos compuestos que se evaluaron a una concentración < 100 μM por su baja solubilidad se indican con un *. A excepción del compuesto 47, el cual fue evaluado a 5 μM , los demás compuestos con * fueron evaluados a 50 μM .

La tasa de identificación de *hits* para esta primera ronda de cribado fue del 20,2 %, un porcentaje considerable y aparentemente alto en comparación a los que normalmente se obtienen en campañas de cribado convencionales, y particularmente para aquellas que tienen por blanco molecular a las PPIs. Por ejemplo, en la bibliografía para ensayos de *high-throughput screening* dirigidos contra PPIs que emplean quimiotecas de miles de compuestos, se reportan tasas de éxito mucho más bajas, entre 0,6-4% y aún más bajas (0,02-0,7%) luego de la confirmación por otra/s metodología/s.

Sin embargo, la tasa de positividad obtenida en nuestra campaña no debería sorprender si tenemos en cuenta que los compuestos que hemos tamizado fueron seleccionados por su similitud con moléculas inhibitoras de *Spike/ACE2* o bien predichas *in silico* como tales. En general, los cribados realizados sobre quimiotecas basadas en blanco molecular (*target-focused*) presentan tasas de identificación de *hits* significativamente superiores a las obtenidas sobre quimiotecas aleatorias (171). Por ejemplo, y salvando las diferencias de blancos moleculares, pero habiendo aplicado una estrategia similar a la aquí descrita (*target-focused library*),

nuestra campaña de cribado sobre la M^{pro} de SARS-CoV-2 tuvo una tasa de *hit* similar, 29% (175) a la obtenida contra *Spike/ACE2* en esta primera ronda de cribado.

Si bien los ensayos realizados con este *kit* cumplieron uno de los criterios de validación, ej. valor del factor $Z' \geq 0.5$ ([Tratamiento de datos](#), ver explicación de este parámetro), para el 52% de las réplicas de muestras se observó una variabilidad considerable intraensayo, mientras que, para el control interno de inhibición, observamos una gran variabilidad interensayo (Figura 4.4.). Esto en parte nos llevó a considerar la realización de ensayos complementarios con *kit* de otro proveedor.

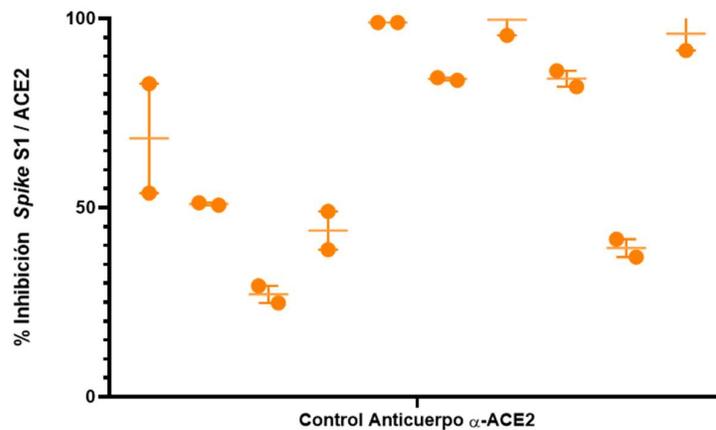


Figura 4.4. Se grafican las réplicas del control interno de inhibición de la interacción *Spike/ACE2* (Ac. α -ACE2) de los ensayos de ELISA realizados con el kit comercial de EpigenTek. Se puede ver gran variabilidad interensayo.

Cribado con Kit comercial de Adipogen (AG)

Con este *kit* se evaluó un total de 131 compuestos, de los cuales 57 eran nuevas moléculas, siendo análogos a los compuestos ensayados en el primer cribado (2° campaña de cribado) y 74 a compuestos previamente evaluados con el *kit* de EG donde 41 de ellos habían calificado como *hits*. En esta segunda ronda de cribado se identificó un total de 12 compuestos *hits* pertenecientes a 7 familias químicas distintas (Gráfico 4.5.).

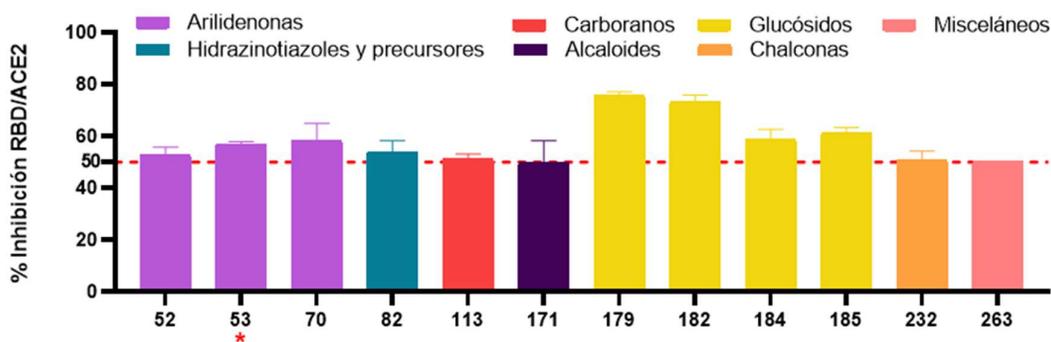


Figura 4.5. Compuestos inhibidores de la interacción RBD/ACE2 en el ensayo de ELISA con el kit comercial de Adipogen. Los compuestos se agrupan y colorean de acuerdo a la familia química a la que pertenezcan. Todos los compuestos fueron evaluados a 20 μ M, excepto por el 53 (*), que fue ensayado a 10 μ M por su baja solubilidad.

Por lo tanto, la tasa total de *hit* obtenida empleando el *kit* AG fue del 9 % (12 *hits* de 131 compuestos), siendo de 8.7% la tasa de *hit* para los nuevos compuestos probados (5 *hits* de 57 compuestos) y 9.5% la tasa de *hit* para los compuestos que ya habían sido probados con el *kit* de EG (7 *hits* de 74 compuestos). Únicamente 5 (52, 53, 82, 171, 263) de los 41 compuestos que habían sido identificados como activos con el *kit* de EG resultaron *hits* con el *kit* de AG (12%). A continuación, se comparan ambos métodos y se discuten algunas variables que explican estas diferencias.

Diferencias en los resultados de los cribados realizados con los kits de EG y AG

Ambos *kits* de ELISA empleados en los cribados comparten un mismo sistema de detección de la interacción *Spike*/ACE2 basada en la reacción colorimétrica catalizada por la HRP conjugada a diferentes polipéptidos (anticuerpo o estreptavidina). Sin embargo, aspectos diferenciales asociados a la naturaleza y preparación (sistemas de expresión, masa en microplaca) de algunos de sus componentes, y/o a los protocolos de ensayo (ver resumen en Tabla 4.1) nos impiden realizar comparaciones directas de los resultados obtenidos por ambos ensayos.

Por ejemplo, para el *kit* de EG, la S1 de la proteína *Spike* viene pre-adsorbida a la microplaca, en cambio el *kit* de AG provee el RBD de la *Spike* liofilizado, el cual hay que reconstituir y adsorber.

Con respecto a ACE2 humana y a HRP, el *kit* de EG proporciona estas proteínas en solución concentrada, a diferencia del *kit* de AG que las brinda liofilizadas. Además, el primer *kit* utiliza un anticuerpo α -His-tag conjugado a HRP que reconoce la cola de histidina fusionada a ACE2, mientras que, en el *kit* de AG, HRP está conjugada a estreptavidina, la cual se une a ACE2 biotinilada.

Una distinción fundamental en los procedimientos de los ensayos es el proceso de interacción entre los compuestos y ACE2 y, según el *kit*, la subunidad S1 o el RBD de la *Spike*. En el *kit* de AG, los compuestos se ponen en contacto inicialmente con ACE2 durante una pre-incubación de 60 minutos. Posteriormente, esta solución del compuesto más ACE2 es incorporada al pocillo que contiene el RBD adsorbido y se incuba durante unos 60 minutos adicionales. En contraste, en el *kit* de EG, se pre-incuba en el pocillo el compuesto con la subunidad S1 durante 15 minutos. Luego, se añade ACE2 al mismo seguido de una incubación adicional de 45 minutos. Por lo tanto, en el primer caso se favorece la interacción del compuesto con ACE2, no solo porque interactúa únicamente con esta proteína sino también por el tiempo de pre-incubación (1h). Para el *kit* de EG, en cambio, se favorece la interacción con la subunidad S1 de la *Spike* aunque el tiempo de incubación es menor (15 min).

Desafortunadamente, no disponemos de información sobre las molaridades de los componentes del *kit* de EG, pero seguramente sean diferentes a los del *kit* de AG ya que provienen de empresas distintas. Esto nos impide estimar el exceso en el cual se encontraban los compuestos con respecto a los blancos moleculares para el *kit* de EG, para así realizar comparaciones con el *kit* de AG, en el cual se adsorben 17 nM de RBD a la placa y luego se agrega ACE2 a 2 nM.

Un aspecto cuantitativo importante, es que el protocolo del *kit* de AG especificaba que la concentración de DMSO, utilizado como solvente de los compuestos, no podía exceder el 0,1% v/v. Esto nos obligó a reducir cinco veces la concentración a la cual incubamos los compuestos con *Spike*, respecto a la empleada en el ELISA de EG (100 μ M). Estas diferencias en concentración final de compuesto entre un *kit* y otro también se mantienen en gran medida en la incubación que involucra a la ACE2 (ej. 50 μ M compuesto para el *kit* de EG y 20 μ M compuesto para el *kit* de AG).

	Pre-incubación con S1 o RBD (<i>Spike</i>) Conc. del compuesto / Tiempo de incubación	Incubación con <i>Spike</i> /ACE2 Conc. del compuesto / Tiempo de incubación
EpigenTek	100 μ M en 0,5% v/v DMSO / 15 min	50 μ M en 0,25% v/v DMSO / 45 min
Adipogen	20 μ M en 0,1% v/v DMSO / 1 h	20 μ M en 0,1% v/v DMSO / 1 h

Tabla 4.1. Tabla comparativa de las concentraciones y tiempos de incubación de los compuestos con las proteínas de ambos ELISAs.

En la figura 4.6. se grafica el porcentaje de inhibición de la interacción *Spike*/ACE2 obtenido para los 41 compuestos que habían presentado actividad inhibitoria en el ELISA de EG y que fueron evaluados nuevamente con el ELISA de AG. Los porcentajes de inhibición son mucho más altos con el ensayo de EG; algunos compuestos presentan una actividad inhibitoria cercana al 100%, mientras que, en el ensayo de AG, solo dos compuestos superan el 60% de inhibición.

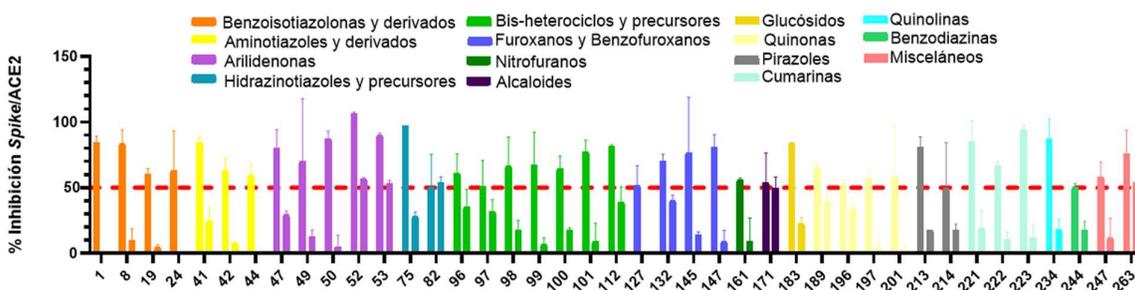


Figura 4.6. Comparación del porcentaje de inhibición obtenido con el kit de EG (barra izquierda) y con el kit de AG (barra derecha) para los 41 compuestos que resultaron *hits* en el ELISA de EG.

Salvando las diferencias entre ambos *kits*/protocolos descritos arriba, y asumiendo que la cantidad de *Spike* (S1 o RBD) absorbida a la microplaca es similar entre ambos *kits*, es probable que la mayor actividad inhibitoria obtenida con el *kit* de EG se deba a la mayor relación compuesto/*Spike* de este último ensayo respecto del de AG. A esto puede sumarse que, a diferencia del *kit* de AG (el cual contiene al RBD de *Spike*), el *kit* de EG emplea a la subunidad S1 de *Spike* (485 aa_s), la cual, además del RBD (222 aa_s), proporciona otros potenciales sitios de unión para los compuestos como ser el extremo N-terminal y la región intermedia I (región entre S1 y S2) de esta proteína. Ambos subdominios de la *Spike* no cuentan con aminoácidos implicados directamente en la interacción con ACE2, pero poseen un rol alostérico al modular los cambios conformacionales necesarios para que esta interacción ocurra (ver sección [1.5.1](#)). Por lo tanto, es razonable especular que los *hits* identificados con el *kit* de EG podrían estar afectando la unión *Spike*/ACE2 mediante mecanismos directos e indirectos. Esto también nos conduce a proponer que este pudiera ser otro de los factores que contribuyó a la mayor tasa de *hits* y a los valores de inhibición más altos observados en la primera ronda de cribado con el *kit* de EG en comparación con el *kit* de AG. Un aspecto crucial que también puede explicar la variabilidad entre ambos ensayos es el blanco molecular, ya sea *Spike* o ACE2, del compuesto evaluado. Por ejemplo, si la diana molecular de cierto compuesto fuera *Spike*, el *kit* de EG favorecería la interacción con esta proteína debido a la pre-incubación de ambos. En cambio, con el *kit* de AG se facilitaría la interacción con ACE2 ya que antes de entrar en contacto con el RBD, el compuesto es pre-incubado con la primera. Esto resalta la importancia de considerar cuidadosamente el diseño experimental y los protocolos de ensayo al interpretar los resultados.

4.2.2 Evaluación de la inhibición de la interacción RBD/ACE2 mediante ensayo celular

Con el fin de avanzar en la caracterización de los potenciales *hits* identificados en la campaña de cribado, una selección de ellos fue estudiada en un ensayo basado en células HEK293 que sobreexpresan ACE2 humana en su superficie y son expuestas a la forma recombinante de un RBD etiquetado con un strep-tag (péptido de biotina), el cual se detecta con estreptavidina (Strep-Tactin) conjugada a un fluoróforo (Ensayo celular, Figura 3.3.). Para evitar una rápida internalización del complejo RBD/ACE2, lo cual comprometería la detección de la interacción, este paso de incubación se realiza en frío (4°C aprox.) y por poco tiempo (1 h). En comparación a los ensayos bioquímicos empleados durante el cribado, el componente biológico de este ensayo, marcado por la eventual interacción de los compuestos con la célula (ej. absorción, metabolización, interacción con otros blancos moleculares), ofrece un entorno más fisiológico para explorar el potencial de los *hits*. Desde el punto de vista farmacológico, una de las propiedades deseables para un fármaco dirigido a impedir la invasión de SARS-CoV-2 a la célula mediante el bloqueo de la interacción *Spike*/ACE2 es que éste posea una permeabilidad reducida. Esto permitiría que el equilibrio de concentración entre el compartimento intra- y extra-celular esté desplazado hacia este último espacio y, por lo tanto, que el compuesto tenga mayores chances de encuentros moleculares con su diana. Generalmente, los compuestos voluminosos con grupos funcionales polares o cargados suelen tener más dificultades para atravesar membranas biológicas, mientras que moléculas de bajo PM y lipofílicas penetran membranas con mayor facilidad.

Estos estudios en células fueron realizados para un total de 30 compuestos que mostraron actividad, por ambos *kits* de ELISA, lo cual sugeriría un blanco molecular compartido (RBD o ACE2), así como algunos que mostraron actividad en solo uno de los ensayos de ELISA. Se seleccionaron compuestos representativos de diversas familias químicas, incluyendo benzotiazolonas, aminotiazoles, bis-heterociclos, quinonas y cumarinas, muchos de los cuales mostraron actividad en el ELISA de EG, pero no en el de AG.

En primer lugar, se analizaron diferentes concentraciones iniciales de RBD (0,25 a 1 ng/ μ L) para estimar la sensibilidad y funcionalidad del sistema reportero. Los resultados mostraron una clara correlación positiva entre intensidad de señal y

concentración de ligando (RBD, Figura 4.7). En función de estos resultados se optó por seleccionar la concentración de 1 ng/μL equivalente a 34.4 nM, dado que, a esta concentración inicial de RBD, la señal de intensidad media de fluorescencia no se superpone con la señal del control de unión inespecífico de la estreptactina con las células.

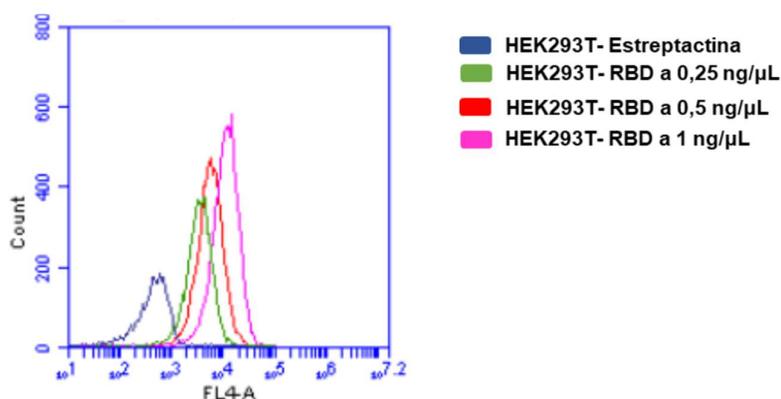


Figura 4.7. Ensayo celular con RBD y células HEK293 que sobreexpresan ACE2 en su superficie por citometría de flujo. Se grafican el número de eventos (Count) sobre la intensidad media de fluorescencia (FL4-A). Se pueden observar los histogramas para las diferentes concentraciones de RBD evaluadas. El histograma azul corresponde a las células incubadas con estreptactina sin RBD, el cual define a la población de células no unidas al RBD.

Los compuestos fueron evaluados a una concentración fija determinada por su solubilidad en 0,5 a 1% v/v de DMSO con valores que fueron de 5-100 μM. El primer paso consistió en incubar los compuestos durante 1h a 37°C con el RBD a 3,44 nM (dilución del RBD 1/10). Luego esta mezcla se agregó a las células que expresan ACE2 y la incubación se extendió por 1 hora en frío (0°C). Bajo estas condiciones de ensayo, los compuestos se encontraban en un exceso molar respecto de su potencial blanco molecular viral. No fue posible estimar la relación compuesto/ACE2 dado que no se conoce la concentración de ACE2 expresada por las células. No obstante, teniendo en cuenta los ensayos de titulación realizados con RBD (Figura 4.7) puede inferirse que la misma es ≥ 17.2 nM y que por lo tanto los compuestos también estarían en un exceso molar respecto al receptor celular.

De los 30 compuestos evaluados, solo 4 fueron capaces de inhibir la interacción RBD/ACE2 en más de un 50% (Figura 4.8). De los cinco compuestos previamente identificados como activos en ambos ELISA, dos de ellos (compuestos **52** y **53**) presentaron una actividad inhibitoria > 50% en este ensayo celular. Los compuestos

82 y **171** exhibieron porcentajes de inhibición entre 40-50%, mientras que el compuesto **263** mostró una actividad inhibitoria muy baja (14.4%) en estas condiciones. Por otro lado, de los 27 compuestos identificados como *hits* en el ELISA de EG, además de los compuestos **52** y **53**, solo los compuestos **116** y **183**, presentaron porcentajes de inhibición superiores al 50%.

En cuanto a los 12 compuestos activos identificados con el *kit* de AG, 7 fueron evaluados en este ensayo. Como se mencionó anteriormente, los compuestos **52** y **53** inhibieron la interacción en más de un 50% mientras que 2 de ellos (**82** y **171**) mostraron porcentajes de inhibición entre 40-50%.

En base a esta información la tasa de *hits* de este ensayo para los compuestos identificados como activos por el *kit* de EG, de AG o ambos es del 14.8% (4 de 27), 28.6% (2 de 7) y 40% (2 de 5), respectivamente.

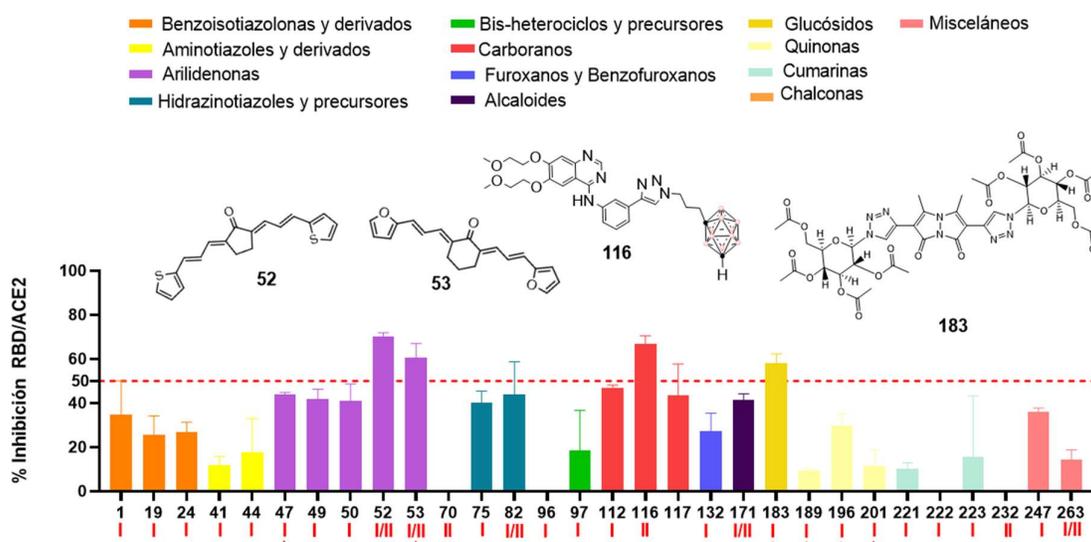


Figura 4.8. Ensayo celular para evaluar la interacción RBD/ACE2. 30 compuestos identificados como *hits* con el ELISA de EG (I), de AG (II), o ambos (III). Se agrupan y colorean por familia química a la que pertenecen. Los compuestos fueron evaluados a 100 μ M, 50 μ M (*) o 5 μ M (compuesto **47**). Solo 4 de los compuestos presentaron actividad inhibitoria > 50%.

En su conjunto, estos resultados fueron considerados promisorios teniendo en cuenta la complejidad del ensayo ya que permitió confirmar la actividad inhibitoria de varias moléculas candidatas.

4.3 Determinación de la citotoxicidad de los *hits*

Para continuar con la caracterización de los compuestos que presentaron actividad en los ensayos de ELISA, se evaluó su citotoxicidad sobre tipos celulares derivados de tejidos humanos que son blanco de infección por el virus: epitelio pulmonar (línea celular A549) y enterocitos (línea celular HT-29). Además de la información que este análisis brindaría sobre cierta actividad *off-target* e indeseada de los *hits* sobre las células huésped, su ejecución era considerada de relevancia para determinar cuáles de ellos estarían en condiciones de ser sometidos a estudios de actividad antiviral por nuestros colegas del Institut Pasteur Korea.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron empleando el reactivo WST-1, una sal de formazán estabilizada. Este compuesto es metabolizado por las células en un proceso de biorreducción catalizado por deshidrogenasas (principalmente mitocondriales) y reductasas. Por lo tanto, el desarrollo de color es proporcional al número y viabilidad celular. Para cada ensayo, todos los pocillos de las placas de cultivo fueron inspeccionados al microscopio antes de agregar el WST-1 con el fin de observar la citomorfología y posible insolubilidad de algunos compuestos para luego correlacionar estas observaciones con el resultado de viabilidad. Los *hits* fueron ensayados a una concentración inicial de 100 μM o, en el caso que a ésta se detectara la presencia de cristales, de 50 μM .

Para aquellos compuestos que a esta última concentración redujeran la viabilidad celular más de un 50%, se realizó una curva concentración-respuesta para determinar su CC_{50} .

4.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos sobre células A549

Se evaluaron 26 compuestos en esta línea celular, de los cuales solamente 3 presentaron una CC_{50} menor a 100 μM . Estos fueron el **113**, **171** y **179**.

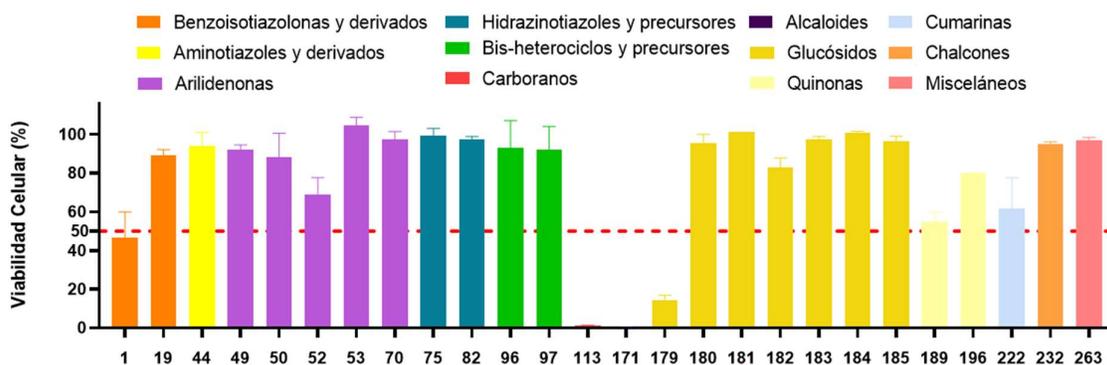


Figura 4.9. Citotoxicidad contra células A549 de selección de compuestos hits. Los compuestos fueron ensayados a una concentración de 100 μM , excepto por el **181** y **183** (*) que fueron evaluados a 50 μM debido a su insolubilidad a 100 μM .

El compuesto **113**, un carborano, presentó una CC_{50} de 60 μM . Por su parte, el compuesto **171**, conocido como vocamina, es un alcaloide *bis*-indólico extraído de la planta *Peschiera fuchsiaefolia*, con un CC_{50} de 27,2 μM . Por último, el compuesto **179**, un bimano que representa un precursor común a varios de los glucósidos estudiados también resultó citotóxico, CC_{50} de 38,8 μM . Los demás integrantes de esta familia, compuestos más grandes y complejos, cuyos tioles están oxidados, no presentaron citotoxicidad, aunque algunos de ellos tuvieron que ser evaluados a 50 μM ya que se observaron cristales amorfos al microscopio al estar disueltos a una concentración de 100 μM en medio de cultivo completo con 0,5% v/v DMSO. Cabe mencionar que lamentablemente no pudimos continuar con la caracterización de esta familia de compuestos debido a la falta de disponibilidad de material sólido por parte del laboratorio proveedor ².

² La línea de investigación asociada a estos compuestos había sido discontinuada por el laboratorio de origen al momento de solicitar la reposición de los mismos.

4.3 Actividad antiviral y citotoxicidad sobre células Vero

El ensayo de actividad antiviral fue realizado por personal de la Screening Discovery Platform del Institut Pasteur Korea. Este ensayo emplea SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1) y células de epitelio renal de mono verde las cuales son permisivas a la infección por este virus ya que expresan ACE2 en su membrana celular. Además, las mismas son deficientes en INF I y II, requeridos para la respuesta antiviral celular, lo que las hace más susceptibles a la infección y replicación del virus (<https://www.atcc.org/products/ccl-81>).

Los compuestos de interés fueron evaluados bajo dos condiciones metodológicas ligeramente diferentes. En la primera de ellas, **método A**, los compuestos y virus infectivos no son pre-incubados sino que son agregados simultáneamente a las células. En el **método B**, los compuestos son incubados con los virus infectivos durante 1 hora a 37°C, previo al agregado de esta mezcla a las células ([Ensayo antiviral](#)).

El **método A** es comúnmente usado para el cribado de compuestos químicos que interfieran con la replicación viral, independientemente si los mismos actúan sobre blancos moleculares del patógeno o la célula huésped (175–177). Estas condiciones de ensayo resultan exigentes para la detección de compuestos cuyo modo de acción es interferir con la primera etapa del reconocimiento virus/célula ya que existe una competencia simultánea entre el compuesto y el receptor celular libre por la interacción con la partícula viral. El **método B** es una adaptación del anterior, que, debido al paso inicial de pre-incubación compuesto/virus, favorecería la identificación de moléculas con actividad virucida (es decir que dañen directamente al virus) y/o inhibidora de la invasión del virus a la célula. Si los compuestos interfieren con la unión *Spike*/ACE2 por interactuar específicamente con la proteína viral, esta estrategia de pre-incubación promovería esta interacción por sobre la competencia con ACE2 por la unión a *Spike*.

Un aspecto común a ambos métodos es que, además de cuantificarse la replicación viral, se evalúa el número y viabilidad de las células tratadas e infectadas. Ambas mediciones (carga viral y celular) se realizan a las 24 h pos-infección/tratamiento.

Como se destacó anteriormente, es sumamente importante determinar si bajo las condiciones de infección los compuestos de interés presentan o no actividad citotóxica ya que esto permitiría confirmar o descartar, respectivamente, resultados falsos positivos (ej. compuestos citotóxicos que destruyen el nicho biológico donde replica el virus).

Se seleccionaron para los estudios de actividad antiviral aquellos compuestos que demostraron actividad en más de un ensayo de cribado, así como aquellos representativos de familias donde varios integrantes resultaron activos en un solo ensayo, como en el caso de las benzisotiazolonas. Se excluyeron aquellos compuestos que mostraron citotoxicidad a 50 μ M contra las líneas celulares de epitelio pulmonar e intestinal humano. Es importante señalar que algunos de los compuestos evaluados poseían actividad inhibitoria contra las proteasas M^{pro} y/o PL^{pro}. Por otra parte, se incluyeron como controles polipéptidos con actividad neutralizante sobre *Spike* (169), a los que aquí llamaremos P1, P2, P3 y P4, y fármacos con probada actividad anti-SARS-CoV-2 como Remdesivir, Lopinavir y Cloroquina.

4.3.1 Actividad antiviral

En el **Experimento 1**, se sometieron a evaluación por el **método A** un total de 14 compuestos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2. Contrariamente a las expectativas iniciales, se observó que la actividad antiviral de la gran mayoría de los compuestos identificados como activos en los estudios preliminares fue nula o marginal.

Compuesto	Experimento 1	Experimento 2		LogP o/w
	IC ₅₀ (uM) / CC ₅₀ (uM) / IS Método A	IC ₅₀ (uM) / CC ₅₀ (uM) / IS Método A	IC ₅₀ (uM) / CC ₅₀ (uM) / IS Método B	
1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	3.18
44	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	1,38
49	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	4,5
50	16 / 23,5 / > 1,5	10,3 / 21,6 / 2,1	21 / > 50 / > 2,4	3,7
52	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	5,6 / > 50 / > 8,9	5,2
53	-	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	4,2
70	-	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	-3.4
75	-	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	-1.5
82	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	6.2
96	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	2.7
97	-	37,3 / > 50 / > 1,34	36,9 / > 50 / > 1,4	2,3
113	8,4 / 32,9 / 3,9	-	-	-
116	> 50 / > 50 / > 1	11,3 / > 50 / > 4,4	10 / > 50 / > 5	-
117	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	-
189	-	30,5 / 31,4 / 1,0	26,4 / 28,3 / 1,1	2.5
196	30,1 / 30,6 / 1	30,1 / 40,7 / 1,4	44,5 / > 50 / > 1,1	2,3
222	28,9 / 30,3 / 1,0	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	0,7
223	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	5.2
232	-	33,3 / 30,2 / 1	> 50 / > 50 / > 1	2,9
263	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	0,2
P1	2,78 / > 50 / > 1	0.70 / > 50 / > 1	0.60 / > 50 / > 1	-
P2	15,06 / > 50 / > 1	-	-	-
P3	2,18 / > 50 / > 1	-	-	-
P4	7,82 / > 10 / > 1	6.49 / > 10 / > 1	6.01 / > 10 / > 1	-
Cloroquina	17,8 / > 50 / > 1	11,8 / > 50 / > 1	10,8 / > 50 / > 1	4,2
Lopinavir	21,5 / > 50 / > 1	17,7 / > 50 / > 1	27,4 / > 50 / > 1	4.4
Remdesivir	7,8 / > 50 / > 1	8,2 / > 50 / > 1	11,8 / > 50 / > 1	1,5

Tabla 4.2. Tabla de actividad antiviral, citotoxicidad, selectividad y Log P de compuestos hits. El **método B** incluye una pre-incubación (1 h a 37°C) del virus con los compuestos a diferencia del **método A**. Para el **Experimento 1** se partió de compuestos en estado sólido y se prepararon soluciones frescas inmediatamente antes de su uso. En el **Experimento 2**, se realizaron soluciones frescas de aquellos compuestos que no habían sido evaluados en el **Experimento 1**, y para el resto se partió de soluciones madres preparadas con anterioridad (**Experimento 1**). En verde se destacan compuestos con actividad antiviral y en rojo falsos positivos (por marcada actividad citotóxica). Los valores de Log P fueron predichos por el servidor SwissADME.

Solamente el compuesto **113** mostró buena actividad antiviral y selectividad (Figura 4.12.), lo cual arroja una tasa de *hit* antiviral del 7%.

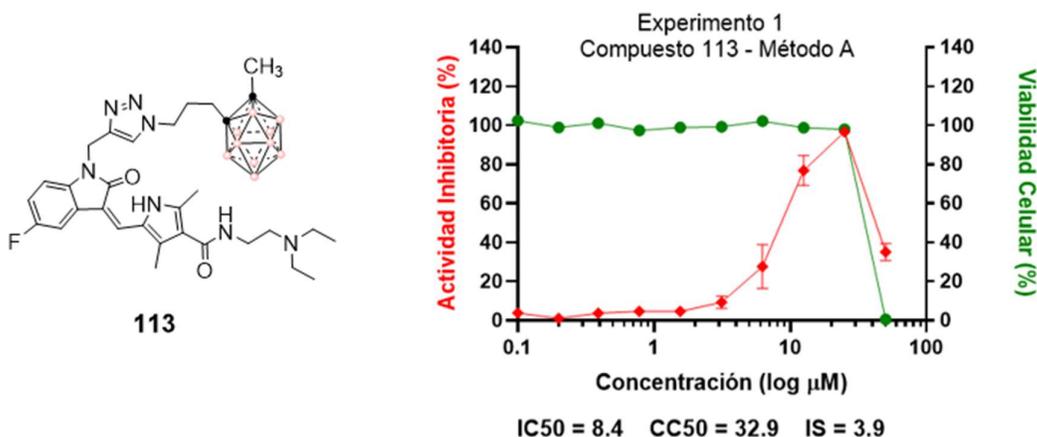


Figura 4.12. A la izquierda se observa la estructura del compuesto **113**. A la derecha se grafica la actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **113** en el **Experimento 1**.

Tres compuestos, **50**, **196** y **222**, presentaron una alta actividad citotóxica que solapó su actividad antiviral por lo que fueron considerados como falsos positivos (Figura 4.13). Para los compuestos **196** y **222** la actividad antiviral aumentó en el momento en que disminuyó la viabilidad celular, a diferencia del compuesto **50** para el cual la actividad antiviral (100%) precedió a la actividad citotóxica (48%) a 25 μM . Este patrón sugiere que el compuesto **50** tiene un potencial antiviral sustancial. Además, la aparición repentina de actividad antiviral sugiere que el compuesto podría tener un mecanismo de inhibición rápida y eficaz. Un estudio de REA con análogos de este compuesto permitiría racionalizar modificaciones químicas que mejoren su actividad antiviral y reduzcan su citotoxicidad.

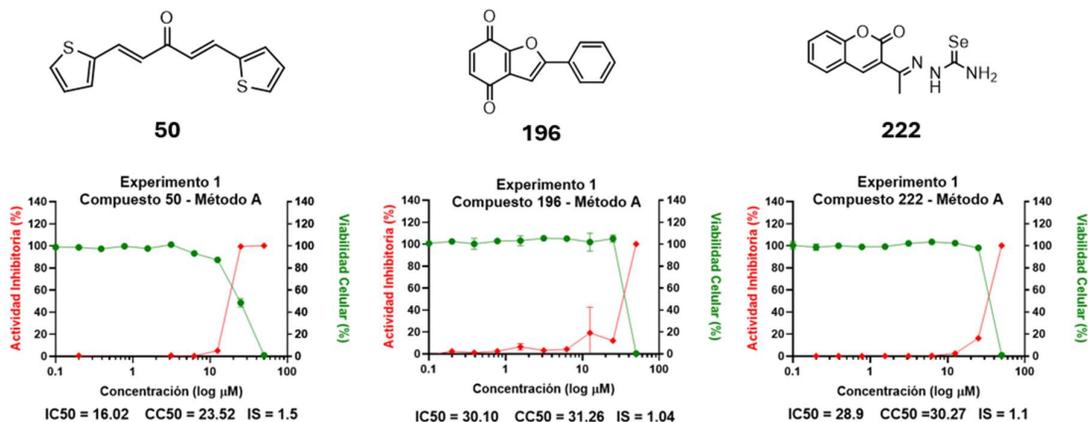


Figura 4.13. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) de los compuestos **50**, **196** y **222** en el **Experimento 1**. Arriba de cada gráfico se muestra la estructura del compuesto.

Por el contrario, bajo las mismas condiciones de ensayo, 4 polipéptidos paratópicos, P1, P2, P3 y P4, con una alta afinidad por el RBD de *Spike* (169) lograron reducir sustancialmente la carga viral con valores de IC₅₀ en el orden nM y sin efectos tóxicos sobre las células (Figura 4.14.).

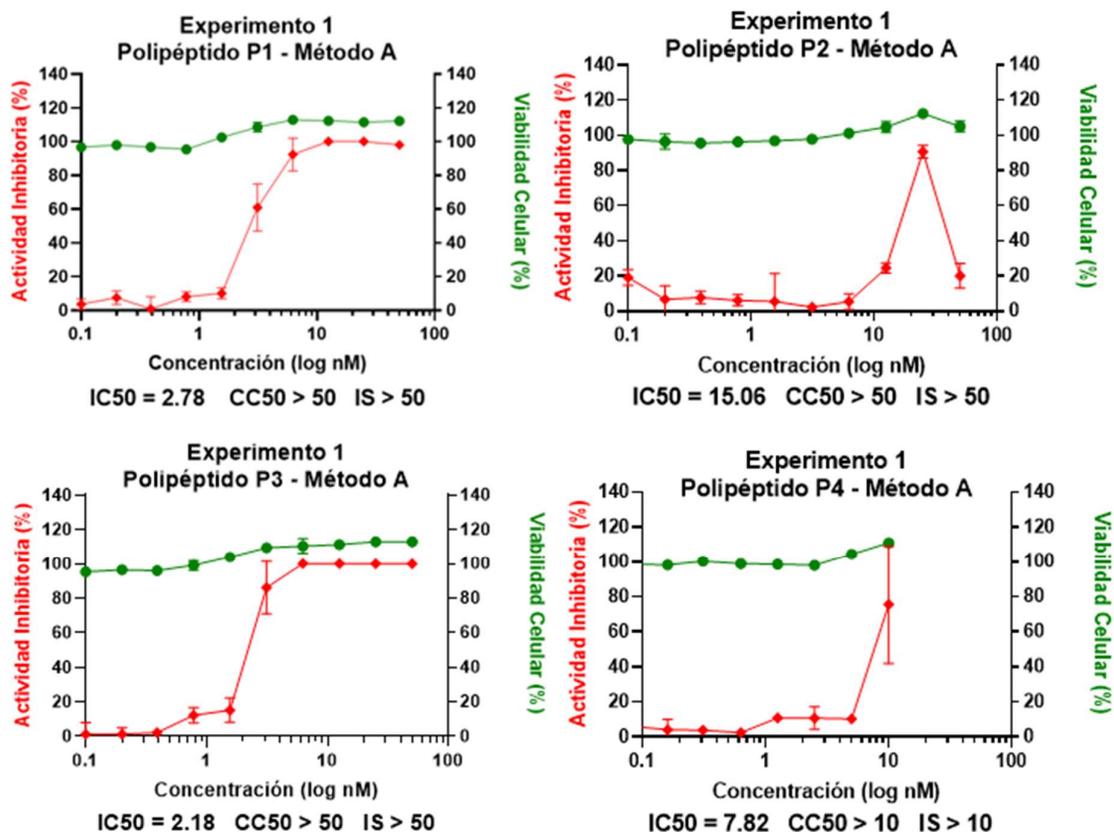


Figura 4.14. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) de los 4 polipéptidos neutralizantes: P1, P2, P3 y P4 en el Experimento 1.

Los resultados obtenidos con los compuestos estarían indicando una baja afinidad de los mismos por su(s) blanco(s) molecular(es). Si bien las condiciones experimentales del ensayo de actividad antiviral difieren marcadamente a las empleadas para los compuestos en los ensayos bioquímicos de cribado y celulares, la baja tasa de *hits* con actividad anti-SARS-CoV-2 nos llevó a cuestionar las posibles causas subyacentes, especialmente para los compuestos que previamente habían presentado actividad inhibitoria en tres ensayos distintos (compuestos 52 y 53).

Otros factores que podrían explicar, al menos en parte, el reducido o nulo efecto antiviral de los compuestos ensayados serían aquellos que contribuyan a una baja biodisponibilidad de los mismos en el medio extracelular, como por ejemplo una alta capacidad para permear membranas de manera pasiva o activa (ej. mediante transportadores).

Una de las propiedades fisicoquímicas a partir de la cual se puede inferir la capacidad de una molécula de permear membranas es su lipofilia, la cual se expresa cuantitativamente en el parámetro logP. El análisis de los valores de logP (SwissADME, <http://www.swissadme.ch/>) para todos los compuestos evaluados en el ensayo antiviral (Tabla 4.2.) mostró que algunos presentaban valores alrededor o superiores a 5(143). Por ejemplo, el logP calculado para los compuestos **52** y **53** es de 5.2 y 4.2, respectivamente. Estos valores sugieren que estos compuestos son lipofílicos y, por tanto, tendrían capacidad de ingresar a la célula. Cabe señalar que para los carboranos no fue factible realizar esta estimación debido a su tamaño.

En base a este análisis y dado que en la mayoría de los ensayos previos, los compuestos fueron pre-incubados con S1 o RBD (excepto para el ELISA de AG que la pre-incubación se realizó con ACE2), los *hits* (un total de 19 moléculas) fueron evaluados por el **método B** que incluye una pre-incubación de los compuestos con el virus durante 1 hora a 37°C. Paralelamente, estos mismos compuestos fueron re-ensayados por el **método A**. Respecto al **Experimento 1** (14 *hits* analizados), en este segundo experimento se sumaron 5 nuevos *hits*, los cuales fueron identificados en el curso de los estudios anteriores. El conjunto de resultados se presenta en la Tabla 4.2. Cuatro de los compuestos (**52**, **97**, **116** y **196**) evaluados por el **método B** en el **Experimento 2** mostraron actividad antiviral. Notablemente, la potencia (IC₅₀) de dos de ellos, **52** (5,6 µM) y **116** (10 µM), fue similar a la de los fármacos control más activos, Cloroquina (IC₅₀ = 10,8 µM) y Remdesivir (IC₅₀ = 11,8 µM), y superior a la de Lopinavir (IC₅₀ = 27,4 µM). Debido a sus bajos valores de IC₅₀ estos dos compuestos presentaron una aparente mayor selectividad (IS = 8,9 y 5 para **52** y **116**, respectivamente) que los otros dos *hits* menos activos (**97** IC₅₀/IS = 36,9 / > 1,4 y **196** IC₅₀/IS = 44,5 / > 1,1). La tasa de *hits* para el **Experimento 2** por el **método A** es de 10% y similar a la obtenida en el **Experimento 1**, mientras que esta se duplica (21%) cuando el **método** del ensayo es el **B**.

Un dato interesante confirmado por el **Experimento 2** fue que dos de los *hits* del **método B** (**52** y **196**) carecieron de actividad cuando la pre-incubación virus/compuestos se omitió (**método A, Experimento 1 y 2**). Por el contrario, los otros dos *hits* (**97** y **116**) mostraron actividad antiviral independientemente si eran o no pre-incubados con las partículas virales (**Experimento 2, método A y B**). Al respecto, un caso llamativo fue el del compuesto **116** que en un ensayo previo sin paso de pre-incubación no había mostrado ser activo (**Experimento 1**).

A continuación, se discuten estos resultados con mayor detalle. El conjunto de resultados de los ensayos de ELISA y celulares (modelo de interacción RBD/ACE2 e infección viral) sugiere fuertemente que la actividad anti-SARS-CoV-2 del compuesto **52** estaría dada por una inhibición de la interacción RBD/ACE2 que impediría el ingreso del virus a la célula. Sin embargo, no podemos descartar que parte de esta sea consecuencia de una actividad virucida. En este caso, durante el período de pre-incubación el compuesto atravesaría la envoltura viral, que tiene una composición similar a la membrana celular, ya que deriva de ésta; una vez dentro del virión, el compuesto podría estar interaccionando e inhibiendo otros blancos moleculares esenciales para las etapas tempranas del desensamblaje o replicación viral. Para lograr una mejor comprensión del mecanismo de acción de este *hit* se requerirían estudios complementarios adicionales.

Por otro lado, curiosamente, el compuesto **53**, que no solo comparte una estructura química muy similar a la del **52** (Figura 4.15) sino que también presentó potencia inhibitoria contra *Spike/ACE2* en los ensayos bioquímicos y celular, careció de actividad antiviral por ambos métodos (Figura 4.16). Este resultado resalta la complejidad de las interacciones moleculares que se estarían dando en un contexto de virus completo y la relevancia de los modelos celulares de infección para estudiar la actividad biológica de los compuestos de interés.

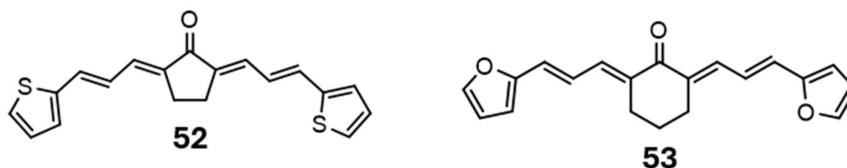


Figura 4.15. Estructura de los compuestos **52** y **53**. Ambos compuestos difieren en el anillo central (ciclopentanona vs. ciclohexanona) y los sustituyentes terminales (tiofeno vs. furano).

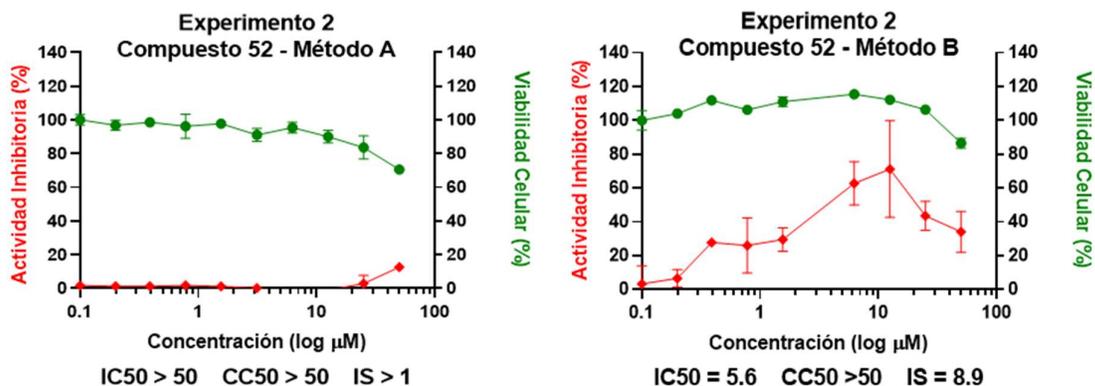


Figura 4.16. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **52** en el **Experimento 2** ensayado por el **método A** y **B**.

El compuesto **116**, un carborano, había sido evaluado en el **Experimento 1**, resultando inactivo. Se volvió a evaluar en el **Experimento 2** presentando actividad antiviral muy similar por ambos métodos, con muy buena selectividad (Figura 4.17). La diferencia entre el **Experimento 1** y el **Experimento 2** es que para el primero se empleó una solución fresca del compuesto, mientras que para el segundo la solución madre del compuesto sufrió un ciclo de congelamiento/descongelamiento. Dado que la estructura de los carboranos es inestable frente a este procedimiento, esto nos conduce a pensar que el compuesto sufrió degradación durante el mismo y que los productos de la descomposición son los que aportan actividad antiviral. Se discutirá esto, en base a la estructura del compuesto más adelante.

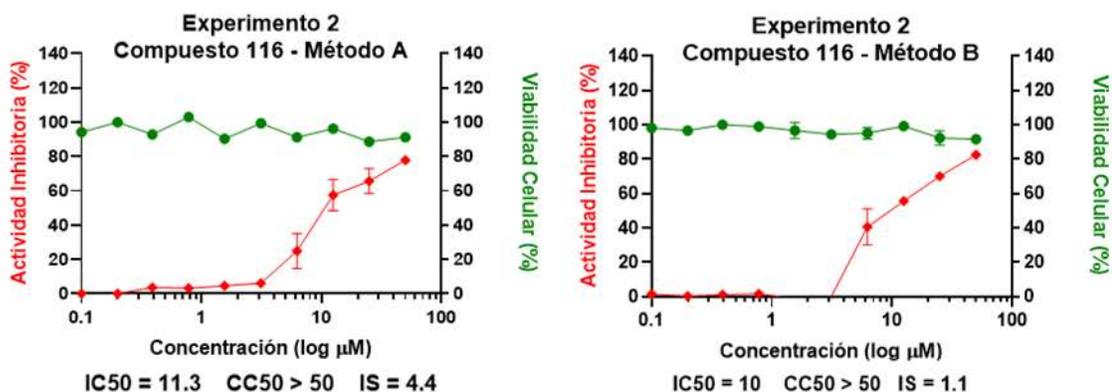
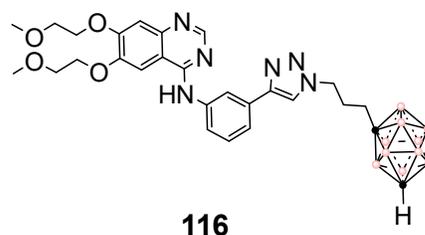


Figura 4.17. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **116** en el Experimento 2 ensayado por el método A y B.

El compuesto **97** mostró capacidad de inhibir la replicación viral, pero a altas concentraciones. No se observaron diferencias significativas entre uno y otro método. Este compuesto sólo había presentado actividad inhibitoria contra la interacción *Spike/ACE2* en el ensayo de ELISA de EG, al igual que el compuesto **96**, y ambos pertenecientes a la familia de los bis-heterociclos y precursores. Sin embargo, este último careció de actividad antiviral por ambos métodos.

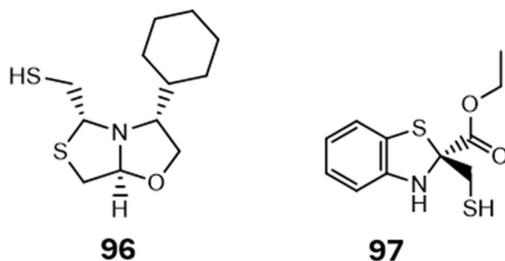


Figura 4.18. Estructura de los compuestos **96** y **97**.

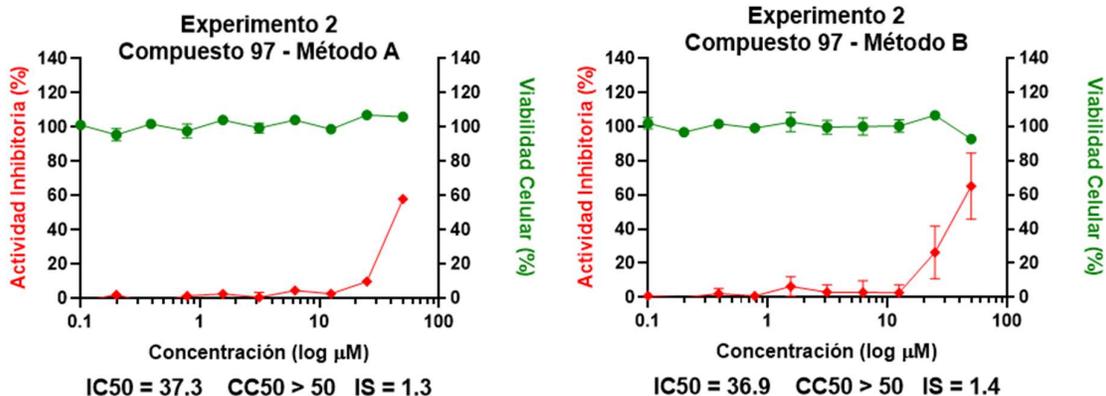
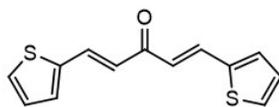


Figura 4.19. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **97** en el Experimento 2 ensayado por el método A y B.

Algunos compuestos, como el **50** y **189**, presentaron citotoxicidad hacia las células Vero por ambos métodos. Por su parte, el **196** y el **232** mostraron citotoxicidad solo por el **método A**. Para estos compuestos a medida que la actividad antiviral aumenta disminuye la viabilidad celular, lo que remarca la importancia de evaluar la citotoxicidad en conjunto con la actividad antiviral. Tanto el compuesto **50** como el **189** habían presentado $\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ y $\text{CC}_{50} = 91,2 \mu\text{M}$ para células A549 respectivamente. Este comportamiento sobre las células Vero podría deberse a una sensibilidad intrínseca de este tipo celular por estos compuestos, o bien que la infección viral exacerba la citotoxicidad de estos compuestos o viceversa, los compuestos exacerban el efecto citopático del virus.

En el caso del compuesto **50**, este resulta citotóxico a concentraciones $\geq 25 \mu\text{M}$ por el **método B**, mientras que por el **método A**, como ya se había observado en el **experimento 1**, su citotoxicidad comienza a ser notoria a partir de concentraciones $\geq 12,5 \mu\text{M}$. Una posible explicación para este fenómeno es que la pre-incubación con el virus favorezca el ingreso del compuesto al virión, lo que resultaría en una menor cantidad de compuesto disponible para ejercer su acción citotóxica en el interior celular o bien que bajo estas condiciones la actividad virucida del compuesto contribuya a reducir el efecto citopático del virus (Figura 4.20).



50

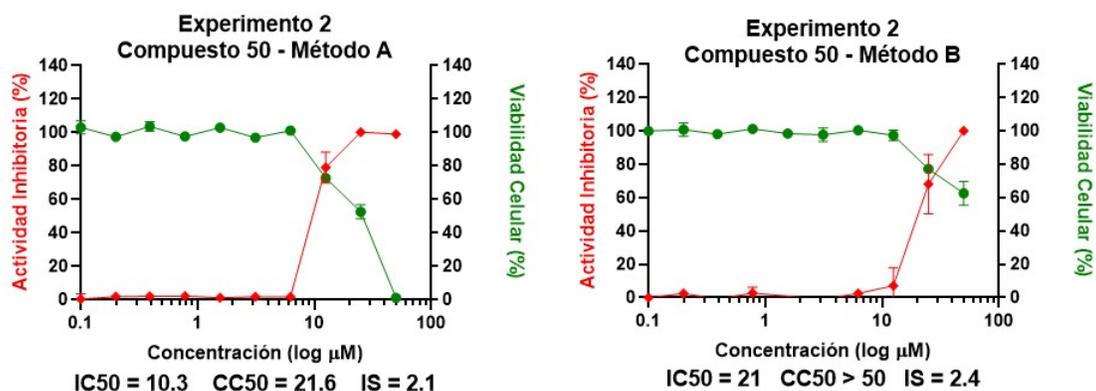
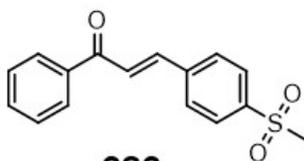


Figura 4.20. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **50** en el Experimento 2 ensayado por el método A y B.

El compuesto **232** por el **método B** no mostró ser citotóxico en el rango completo concentraciones ensayadas (0,2-50 μM) mientras que por el **método A** fue marcadamente citotóxico (viabilidad celular del 0%) solo a 50 μM (Figura 4.21).



232

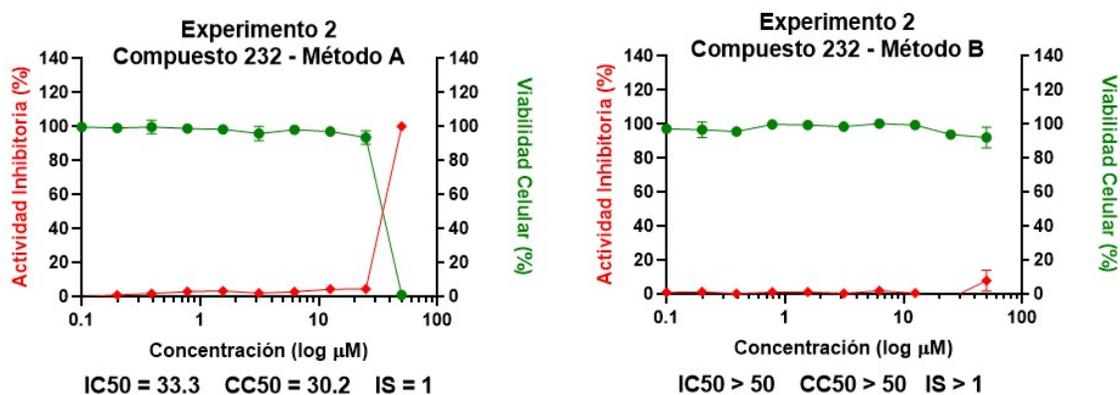
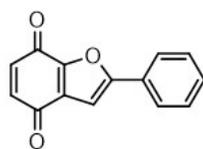


Figura 4.21. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **232** en el Experimento 2 ensayado por el método A y B.

La molécula **196**, a diferencia de estos últimos compuestos, por el **método B** demostró inhibir la replicación viral en más de un 50% a concentraciones de 25 a 50 μM sin afectar la viabilidad celular (100 a 90 %). Sin embargo, por el **método A** este compuesto resultó marcadamente citotóxico a 50 μM (37% de viabilidad celular) pero mostró una tendencia lineal e incremental a inhibir la replicación viral (1 al 13.5%) en el rango de 3,1 a 25 μM , para el cual no se vio alterada de manera significativa la viabilidad celular (100 a 93%) (Figura 4.22).



196

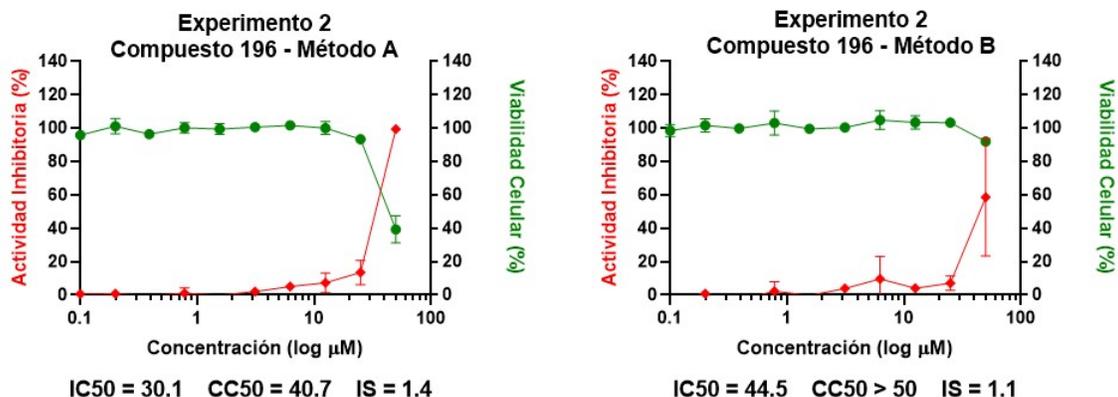


Figura 4.22. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **196** en el **Experimento 2** ensayado por el **método A** y **B**.

Por último, el compuesto **222** había mostrado ser altamente citotóxico (0% viabilidad celular) a una concentración de 50 μM en el **Experimento 1**, mientras que a esta misma concentración careció totalmente de citotoxicidad en el **Experimento 2** por ambos métodos en el rango completo de concentraciones ensayado (0,1 a 50 μM). En principio, podría sospecharse que la pérdida de citotoxicidad se debe a una posible degradación del compuesto durante el ciclo de congelamiento/descongelamiento. Por el **método B** este compuesto posee una actividad antiviral a 25 μM (inhibición de la replicación = 15% y de 26.7% a 50 μM)

muy similar a la observada por el **método A** (inhibición de la replicación = 11% μM a 25) (Figura 4.23).

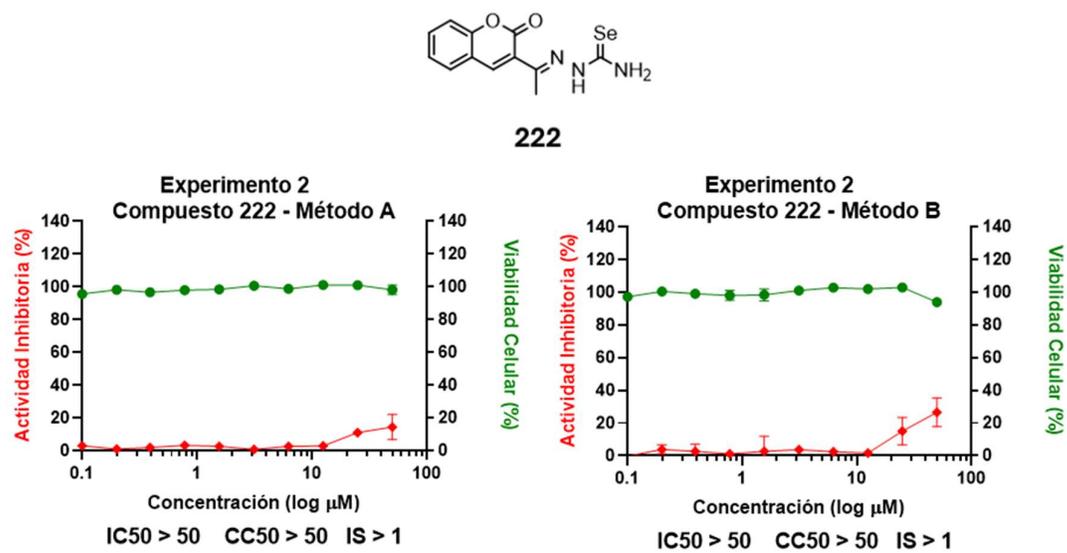


Figura 4.23. Actividad antiviral (rombos rojos) y citotoxicidad (círculos verdes) del compuesto **222** en el Experimento 2 ensayado por el **método A** y **B**.

4.4 Análisis de relación estructura-actividad

A continuación, se discutirán de manera integral los resultados obtenidos para los compuestos que presentaron actividad en el ensayo antiviral. Las familias a las que pertenecen estos compuestos son las siguientes: arilidenonas, *bis*-heterociclos y carboranos.

4.4.1 Arilidenonas

La gran mayoría de los compuestos pertenecientes a esta familia fueron diseñados y sintetizados para su evaluación contra *Trypanosoma cruzi* (178–181), un organismo eucariota unicelular (protozooario) y patógeno humano. Este trabajo fue llevado a cabo por el Grupo de Química Medicinal de Facultad de Ciencias y el Laboratorio de Moléculas Bioactivas del CENUR Litoral Norte, ambos pertenecientes a la UdelaR. Otros compuestos fueron concebidos y sintetizados como parte de un proyecto cuyo objetivo era explorar el espacio químico en torno a plataformas químicas derivadas de biomasa, específicamente del furfural y del 5-hidroximetilfurfural³. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos del Institut Pasteur de Montevideo y el Departamento de Química Orgánica de Facultad de Química, UdelaR.

Estos compuestos se caracterizan por su síntesis sencilla, siguiendo los principios de la química verde, lo que resulta en bajos costos de producción y, en la mayoría de los casos, se asocia a altos rendimientos.

A su vez, estos compuestos contienen enlaces α , β -insaturados, y son conocidos como aceptores de Michael, los cuales además presentan diversas propiedades farmacológicas, como anticancerígenas, antimicrobianas y antivirales (182–184).

³ Proyecto CSIC I+D (llamado 2020-ID345): Valorización de plataformas química de biomasa aplicando principios de química verde: producción de compuestos bioactivos. Responsable Williams Porcal (FQ, Udelar).

Se evaluaron 24 compuestos de esta familia (Figura 4.24). De estos, solo 8 fueron sometidos al ensayo ELISA de EG, ya que los restantes 16 se incorporaron más tarde a la quimioteca, y fueron evaluados solo con el ELISA de AG. A nivel biológico, ninguno de los 16 compuestos analizados en las líneas celulares A549 y/o HT-29 presentaron citotoxicidad a 100 μ M. Los resultados se pueden ver en la **Tabla 4.3**.

A continuación, se discutirán los resultados para los compuestos con mayor actividad y sus análogos más cercanos.

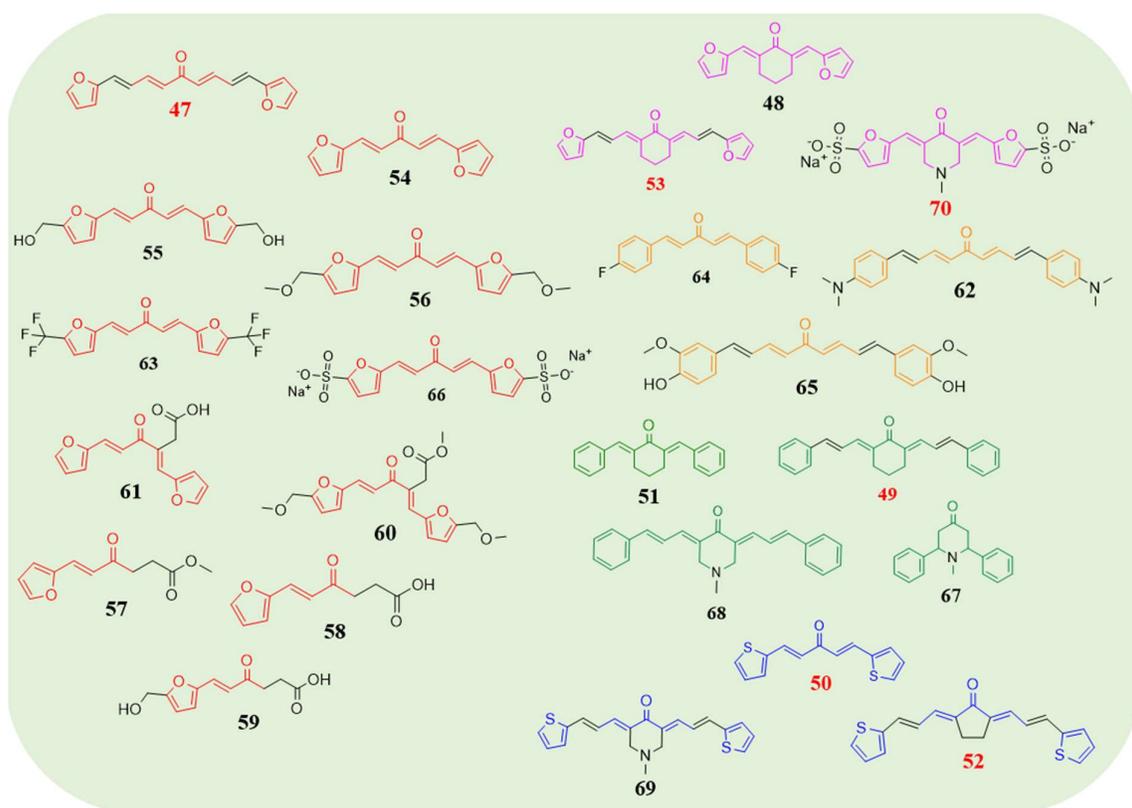


Figura 4.24. Estructuras de los 24 compuestos pertenecientes a la familia Arilidenonas.

Compuesto	Inhibición Kit EG (%) ^a	Inhibición Kit AG (%) ^b	Inhibición HEK 293/RBD (%) ^c	CC ₅₀ (μM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
				A549 ^d	HT29 ^e	Método A IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^f		Método A IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^g	
47	80,4 ± 9,8*	29,9 ± 2,0*	44 ± 0,5*	-	>100	-	-	-	-
48	20,3 ± 2,1	5,8 ± 7,9	-	-	-	-	-	-	-
49	70,2 ± 23,8	12,8 ± 3,6	41,8 ± 3,1	>100	>100	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0
50	87 ± 4,3	5,2 ± 6,0	41,0 ± 5,4	>100	-	16 / 23.5 / 1.5	10,3 / 21,6 / 2,1	21 / > 50 / 2,4	
51	20 ± 14,1	6,4 ± 2,2	-	-	-	-	-	-	-
52	105,7 ± 0,8	57,1 ± 0,5	70,2 ± 1,2	>100	>100	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0	5,6 / > 50 / 8,9	
53	91,5 ± 0,8*	52,9 ± 2,0*	79,9 ± 0,0*	>100	>100		> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0	
54	-	0 ± 4,8	-	-	-	-	-	-	-
55	-	13,4 ± 9,2	-	>100	-	-	-	-	-
56	-	5,5 ± 8,5	-	-	-	-	-	-	-
57	-	0 ± 3,0	-	-	-	-	-	-	-
58	-	1,3 ± 2,8	-	-	-	-	-	-	-
59	-	19,1 ± 8,7	-	>100	-	-	-	-	-
60	-	8,7 ± 8,2	-	>100	-	-	-	-	-
61	-	2,4 ± 6,2	-	-	-	-	-	-	-
62	-	40 ± 2,4*	-	>100	-	-	-	-	-
63	-	29,2 ± 0,1	-	>100	-	-	-	-	-
64	-	26,1 ± 4,5	-	>100	-	-	-	-	-
65	-	11,2 ± 0,4	-	>100	-	-	-	-	-
66	-	16,6 ± 0,2	-	>100	-	-	-	-	-
67	-	3,4 ± 2,1	-	>100	-	-	-	-	-
68	-	35,1 ± 0,01	-	>100	-	-	-	-	-
69	-	14,3 ± 0,8	-	>100	-	-	-	-	-
70	41,4 ± 14,7	58,14 ± 4,8	0 ± 0,7	>100	>100		> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0	

Tabla 4.3. Resultados de ensayos bioquímicos y biofísicos obtenidos para 24 compuestos de la familia de las Arilidendonas. **a)** Inhibición de la interacción S1/ACE2 (%) con el ELISA de EG, los compuestos fueron evaluados a una concentración inicial de 100 μM. **b)** Actividad inhibitoria (%) de la interacción RBD/ACE2 con el ELISA de AG, en este ensayo los compuestos se evaluaron a 20 μM. **c)** Ensayo celular (%) para el cual los compuestos se evaluaron a una concentración inicial de 100 μM. **Citotoxicidad** para los compuestos evaluados a una concentración de 100 μM contra línea celular de **d)** pulmón o **e)** intestino humano. **Ensayo antiviral:** IC₅₀, CC₅₀ e índice de selectividad (IS), obtenidos en el **f)** Experimento 1 por método A y en el Experimento 2 por el **g)** método A y **h)** método B. En verde se destacan los resultados de compuestos que cumplen el criterio de *hit* para determinado ensayo. Los compuestos probados a menor concentración se indican con (*). Los compuestos 53 y 62 fueron evaluados en el ELISA de EG y en el ensayo celular a concentración inicial de 50 μM y el compuesto 47 a 5 μM mientras que para el ELISA de AG los dos primeros se evaluaron a 10 μM y el 49 a 1 μM.

Los primeros compuestos de esta serie que fueron evaluados bioquímicamente (ELISA de EG) a una concentración de 100 μM son el **48**, **50** y **51**. Estos tres compuestos difieren en los sustituyentes terminales de las cadenas alifáticas y el grupo central. El compuesto **50** resultó ser el más activo (87% inhibición), mientras que **48** y **51** mostraron porcentajes bajos y similares de inhibición (20%), lo cual en principio sugiere que para arilidenonas de cadenas alifáticas cortas, el anillo del grupo central (ciclohexano) y/o bien el reemplazo de los grupos tiofenos por furanos o bencenos tienen un impacto negativo en la interacción con S1/ACE2 (ver comentario al respecto a continuación del próximo párrafo). En base a estos resultados, la exploración se amplió a análogos con cadena alifática más larga y mayor número de insaturaciones: compuestos **47**, **49**, **52** y **53**. De acuerdo con el porcentaje de inhibición mostrado, estos compuestos pueden ordenarse como sigue: **53** (106%) > **52** (92%) > **47** (80%) \approx **49** (70%). A diferencia de **49** y **52** (evaluados a una concentración de 100 μM), los compuestos **47** y **53** fueron ensayados a 5 μM y 50 μM , respectivamente. Esto se debió a su baja solubilidad en medio acuoso, lo cual nos obligó a preparar soluciones *stock* de menor concentración en 100% v/v DMSO. Por lo tanto, es de esperar que la potencia inhibitoria de **47** y **53** sea comparativamente superior a la estimada para sus análogos.

Además, todos estos compuestos se probaron en el ELISA de AG, y mostraron el siguiente orden de actividad: **52** (57% a 20 μM) > **53** (53% a 10 μM) > **47** (30% a 1 μM) > **49** (13% a 20 μM) > **51** (6% a 20 μM) \approx **48** (6% a 20 μM) \approx **50** (5% a 20 μM) > **54** (0% a 20 μM).

Un dato interesante que emerge de estos estudios, y teniendo en cuenta las variaciones en concentración que fueron ensayadas, es la buena correlación de actividad observada en ambos ELISA para varios de los compuestos más activos (**47**, **49**, **52** y **53**). Esto indicaría que los mismos tendrían por blanco molecular a RBD o ACE2, por tratarse de proteínas compartidas por ambos ensayos a pesar de las diferencias entre estos. Si se tiene en cuenta que en el ELISA de AG se favorece la interacción con ACE2 debido a la pre-incubación y considerando que para ambos ensayos la actividad fue similar, se podría pensar que la afinidad de estos compuestos sería por el RBD. Otra conclusión que puede extraerse de estos resultados es que el largo de la cadena alifática y/o el número de insaturaciones es

el determinante principal de la actividad inhibitoria. Esto resulta evidente al comparar la actividad por pares de análogos: **47** > **54**, **49** > **51**, **52** > **50** y **53** > **48**. Este efecto es particularmente marcado (10 a 30 veces de incremento en actividad) en arilidenonas con sustituyentes furano (**53** y **47**) o tiofeno (**52**) y menor (2 a 3,5 veces de incremento en actividad) con benceno (**49**). En segundo lugar de relevancia en cuanto a contribución a bioactividad aparecen los grupos furanos, ya que, como se destacó anteriormente, los compuestos activos que los contenían (**49** y **53**) fueron ensayados a concentraciones 2 a 20 veces inferiores al resto y mostraron una capacidad inhibitoria similar o superior al resto.

Los resultados anteriores no permiten discriminar si la ganancia de actividad en compuestos con cadenas alifáticas más largas se debe a un efecto estérico, ej. los grupos terminales tienen posibilidad de contactar residuos y/o ocupar superficies más distantes/extensas, o funcional, ej. el mayor número de enlaces insaturados ofrece mayores sitios de interacción con residuos electrofílicos, sobre el blanco molecular. Para indagar un poco más sobre estas posibilidades se decidió ensayar una molécula distantemente relacionada a las anteriores, el compuesto **70**, que se caracterizaba por ser más hidrofílica, tener un menor número de insaturaciones, un *core* central (*N*-metil-4-piperidinona) y sustituyentes terminales diferentes y voluminosos (sulfonil-furano) en ambas cadenas alifáticas. Interesantemente, este compuesto resultó ser activo por el ELISA de EG (40% de inhibición a 100 μM) y de AG (58% de inhibición a 20 μM). Comparado a su análogo más simple (**48**, 6% inhibición a 20 μM), las modificaciones introducidas a **70** resultaron beneficiosas para su actividad, aunque no en los niveles alcanzados por otro par de compuestos relacionados: **53** (53% a 10 μM) y **47** (30% a 1 μM). Estos resultados apuntan a que el efecto estérico y/o de interacciones no covalentes disponibles en **70** compensan, al menos parcialmente, la contribución positiva de cadenas alifáticas largas con múltiples enlaces insaturados.

Debido a que el compuesto **70** presentó actividad, se evaluaron tres análogos más que tenían en común el anillo central *N*-metil-4-piperidinona, pero diferían en la extensión de la cadena alifática (de 0: **67** a 3 carbonos: **68** y **69**) y sus sustituyentes (bencenos: **67** y **68**, y tiofeno: **69**). De acuerdo con la actividad inhibitoria mostrada a 20 μM los compuestos se ordenan así: **68** (35%) > **69** (14%) > **67** (3%). Nuevamente pudimos confirmar el rol relevante de la cadena alifática insaturada, ya

que el compuesto carente de esta (**67**) resultó prácticamente inactivo (ej. 10 veces menos activo que su análogo directo: **68**).

Por su similitud estructural, también es posible comparar los siguientes pares de análogos (ensayados a 20 μM) con cadenas alifáticas de 3 carbonos que difieren solo en la naturaleza química del anillo central: **68** (*N*-metil-4-piperidinona, 35% inhibición) vs. **49** (ciclohexanona, 13% inhibición), y **69** (*N*-metil-4-piperidinona, 14% inhibición) vs. **52** (ciclopentanona, 57% inhibición). Claramente, las modificaciones tuvieron impactos opuestos. En el caso de los análogos sustituidos con grupos bencenos, el anillo heterociclo metilado (de mayor volumen que un ciclohexano) resultó beneficioso, mientras que la inclusión de este grupo fue en detrimento de la actividad cuando los sustituyentes terminales eran tiofenos. En este caso, un anillo de menor volumen como el ciclopentano mejoró la actividad.

Con respecto al ensayo celular de inhibición RBD/ACE2, a excepción del compuesto **70** (0% inhibición a 100 μM), el resto de *hits* resultantes de los ELISAs fueron activos en el siguiente orden decreciente: **53** (80% inhibición a 50 μM) > **52** (70% inhibición a 100 μM) > **47** (44% inhibición a 5 μM) \approx **49** (42% inhibición a 100 μM) \approx **50** (41% inhibición a 100 μM). Este orden de potencia reproduce en buena medida el obtenido en el ELISA de AG y confirmaría que el RBD sería el blanco preferente de los mismos. La nula actividad del compuesto **70** resultó llamativa y podría estar indicando que la conformación de la interacción RBD/ACE2 sobre la cual pudo interferir en los ensayos bioquímicos podría no estar representada en el bioensayo.

La actividad contra el SARS-CoV-2 fue estudiada para estos mismos compuestos, con la excepción del **47** para el cual se decidió no continuar con su caracterización debido a su baja solubilidad. Cuando el ensayo de actividad antiviral omitió la pre-incubación de los *hits* con las partículas virales (**método A**), solo el compuesto **50** resultó activo ($\text{IC}_{50} = 10\text{-}16 \mu\text{M}$). Al incluir dicho paso de incubación (**método B**), la actividad antiviral de **50** se vio moderadamente alterada ($\text{IC}_{50} = 21 \mu\text{M}$) y la del compuesto **52** se hizo notoria ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$), resultando el más activo de la serie y con una potencia comparable a la de fármacos control. Notablemente, estos dos compuestos tienen en común grupos tiofenos como sustituyentes de las cadenas alifáticas.

Al igual que en el ensayo celular de RBD/ACE2, el compuesto **70** fue inactivo contra el virus, hecho que de alguna forma confirmaría que en condiciones biológicas más exigentes este compuesto perdería afinidad por su sitio de unión. Algo similar podría explicar la inusual falta de actividad antiviral del compuesto **53**. En el conjunto de evaluaciones previas, este compuesto había mostrado de manera consistente una buena actividad inhibitoria de la interacción RBD/ACE2. En ese sentido, es importante destacar que en el ensayo de infección viral los compuestos se exponen y deben interactuar con la forma nativa de la *Spike* (secuencia completa y con conformación trimérica) o en la interfaz de esta con su receptor, con el cual, como ya mencionamos anteriormente, se establece un equilibrio de unión muy dinámico a nivel conformacional.

En línea con ese razonamiento, pero desde el punto de vista del ligando, evidencias similares surgen al comparar la estructura de **53** con su análogo activo, el **52**. Si bien ambos poseen 3 carbonos con enlaces insaturados, estos compuestos difieren en las sustituciones terminales (furanos vs. tiofenos) y en el núcleo central (ciclohexanona vs. ciclopentanona). El simple cambio de ciclopentano a ciclohexano genera una pérdida de planaridad de la molécula, como se muestra en la Figura 4.25, que podrían explicar cambios en la unión a *Spike* contribuyendo a rigidizar las regiones de contacto. Llamativamente el compuesto **50** que presentó actividad por ambos métodos, también muestra dicha planaridad en su estructura tridimensional, lo que reafirmaría que esta característica estructural podría contribuir a la actividad (Figura 4.26).

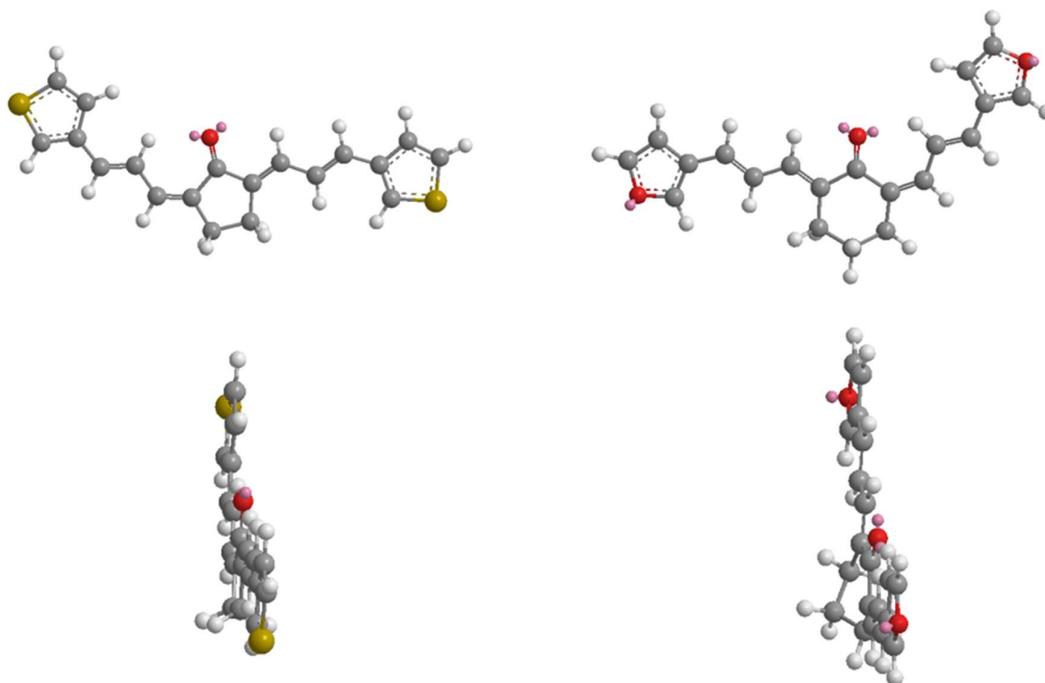


Figura 4.25. Estructuras tridimensionales de los compuestos 52 (izquierda) y 53 (derecha). Las figuras 3D fueron obtenidas con el *software* Chem3D a partir de los códigos SMILES. Se realizó minimización de energía mecánica molecular (MMFF94).

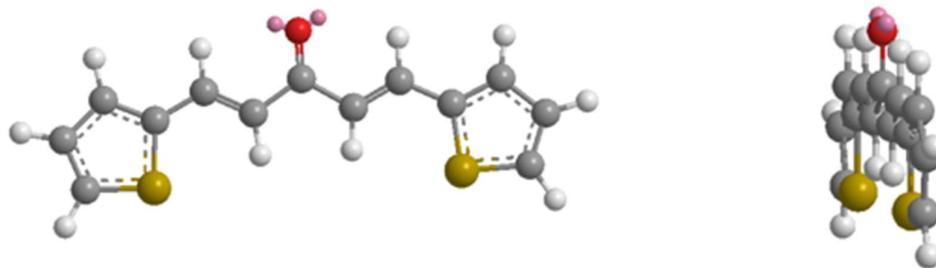


Figura 4.26. Estructura tridimensional del compuesto 50. La figura 3D fue obtenida con el *software* Chem3D a partir de los códigos SMILES. Se realizó minimización de energía mecánica molecular (MMFF94).

3.4.3 Bis-heterociclos y precursores

Esta familia fue seleccionada ya que la mayoría de los compuestos que la integran presentan un grupo tiol (-SH) libre (Figura 4.27), que podría reducir y/o formar heterodisulfuros con algunos de los residuos de cisteína de la *Spike* (precisamente del RBD) que se encuentran formando puentes disulfuros. Los compuestos fueron sintetizados por el grupo de Química Farmacéutica de la Facultad de Química, Udelar. El conjunto de resultados se presenta en la Tabla 4.4.

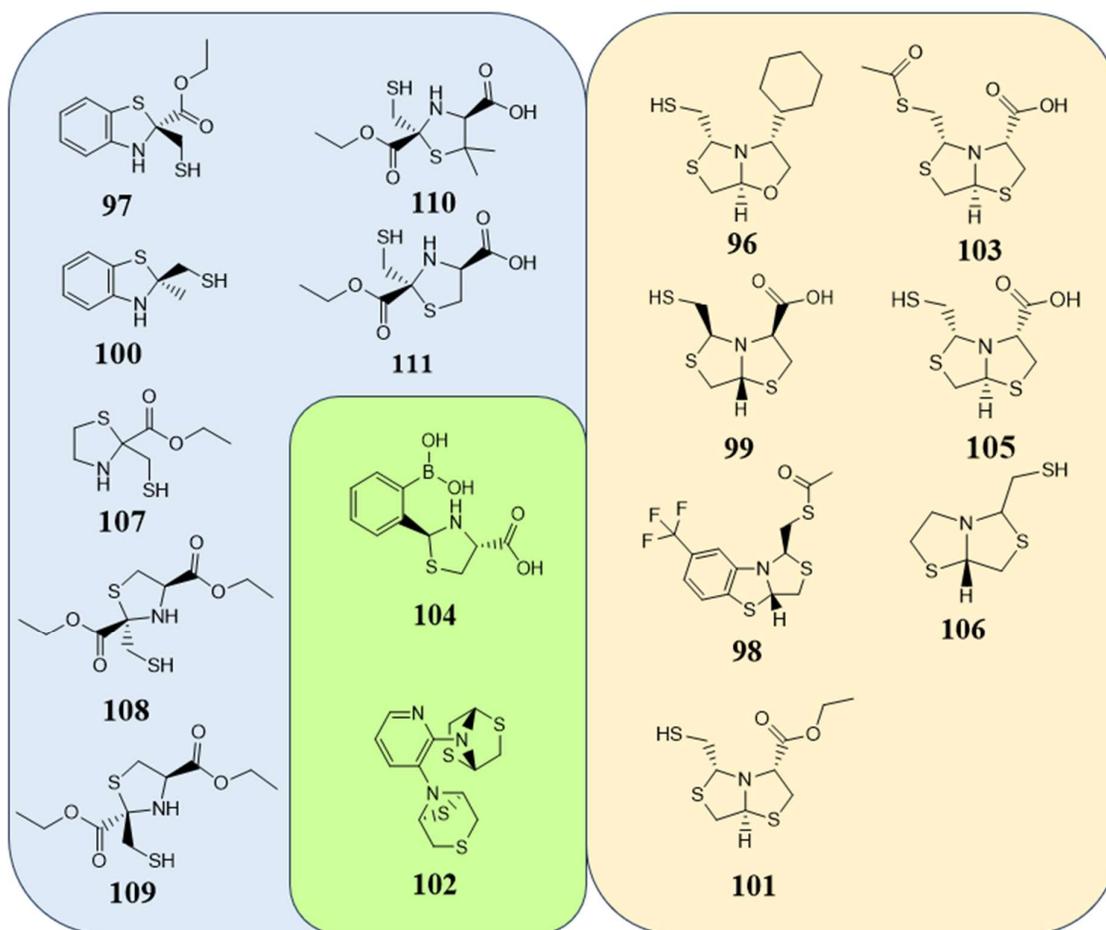


Figura 4.27. Estructuras de los 16 compuestos pertenecientes a la familia Bis-heterociclos y precursores.

Se analizaron 16 compuestos por el ELISA de EG a una concentración de 100 μM , dentro de los cuales se distingue un subgrupo de 6 con destacada y similar (por la gran dispersión de los valores) actividad inhibitoria: **101** (79%) \approx **98** (70%) \approx **99** (68%) \approx **96** (65%) \approx **100** (64%) \approx **97** (57%). Estos *hits* poseen en su estructura un *scaffold* bistiazolidina (**98**, **99** y **101**), oxazolidintiazolidina (**96**), o 2-mercaptometil

benzotiazolidina (**97** y **100**). El segundo subgrupo está integrado por compuestos con moderada actividad inhibitoria: **102** (25%) \approx **106** (24%) \approx **107** (23%) \approx **104** (23%) \approx **110** (19%) \approx **108** (17%) que pertenecen a los siguientes grupos químicos: mercaptometil tiazolidina (**107**, **108** y **110**), mercaptometil bistiazolidina (**106**), ditionazabicyclo (**102**) y 4-carboxitiazolidina (**104**), siendo, estos últimos dos intermedios sintéticos. Finalmente, un par de compuestos pertenecientes al subgrupo de las bistiazolidinas (**105**: 7% y **103**: 0%) presentaron muy baja o nula actividad.

La presencia de un grupo tiol libre no pareció ser un factor estrictamente clave en la actividad de todos estos compuestos, ya que algunas moléculas donde el átomo de S se hallaba protegido mostraron actividad alta (**98**) o bien moderada en aquellos donde este grupo no está presente (**102** y **104**). Para la familia de las bistiazolidinas, con igual configuración (ver Fig. 4.26, compuestos **101**, **103** y **105**), el dejar el grupo carboxilato desprotegido (**105**) o el grupo tiol acetilado (**103**) tuvo un efecto negativo en la actividad. Cabe destacar que el enantiómero de **105**, el compuesto **99**, a diferencia de él muestra una actividad destacada, 7% vs 68%, respectivamente. Claramente, la fusión de un anillo aromático al *scaffold* mercaptometil tiazolidina (**97** y **100**) repercutió positivamente en la actividad de los análogos de esta familia.

Además de los seis *hits* anteriores, se evaluaron por el *kit* de AG 3 compuestos adicionales que habían mostrado actividad moderada (**102** y **104**) o nula (**103**), y se sumaron dos 2-etoxicarbonil-2-mercaptometil tiazolidina nuevas (**109** y **111**). Todos los compuestos mostraron actividad inhibitoria en el siguiente orden: **96** (36%) \approx **97** (32%) > **103** (26%) > **102** (20%) \approx **98** (18%) \approx **100** (17%) > **111** (13%) \approx **104** (12%) \approx **109** (11%) > **103** (26%) > **101** (10%) \approx **99** (7%). Los nuevos representantes del *scaffold* 2-etoxicarbonil-2-mercaptometil tiazolidina mostraron actividades comparables a las identificadas para sus análogos mediante el *kit* de EG. Mientras la oxazolidintiazolidina **96** y la 2-mercaptometil benzotiazolidina **97** retuvieron buena actividad, para el resto de los *hits* (**98-101**) se observó una disminución relativa de actividad que superó a la prevista por la menor concentración (2 veces) de compuesto empleada en este ensayo. Entre los casos más notorios se encuentran las 2-mercaptometil bistiazolidinas **99** y **101**. En contraposición, el compuesto **103**, identificado como inactivo por el *kit* de EG, resultó activo por el *kit* de AG. Teniendo en cuenta estos resultados y que en este ensayo el blanco molecular viral es

únicamente el RBD, los compuestos **96** y **97** emergen como estructuras privilegiadas contra este dominio. De ambos, solo la 2-mercaptometil benzotiazolidina **97** resultó activa en ensayos celulares, registrando una inhibición de la interacción RBD/ACE2 del 25% y una actividad antiviral moderada por ambos métodos: $IC_{50} = 37 \mu M$.

El hecho que este *hit* haya presentado una potencia antiviral casi idéntica independientemente si se lo pre-incubaba o no con las partículas virales previo a la infección sugiere que este reacciona rápidamente con su blanco molecular (*Spike*) o bien que tiene otras dianas moleculares adicionales. En el marco del proyecto de búsqueda de inhibidores contra las proteasas, se evaluó este compuesto contra M^{pro} resultando activo con un $IC_{50} = 1,74 \mu M$. Esto sugiere que la inhibición de esta enzima sería el principal determinante de la actividad antiviral de este compuesto.

Compuesto	Inhibición Kit EG (%) ^a	Inhibición Kit AG (%) ^b	Inhibición HEK 293/RBD (%) ^c	CC ₅₀ (μM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
				A549 ^d	HT29 ^e	Método A IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^f	Método A IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^g	Método B IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^h	
96	64,8 ± 9,4	35,6 ± 9,4	0 ± 3,1	>100	>100	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,1	> 50 / > 50 / 1,2	
97	56,5 ± 12,4	31,6 ± 6,7	24,9 ± 1,2	>100	>100	-	37,3 / > 50 / 1,34	36,9 / > 50 / 1,4	
98	70 ± 13,9	17,5 ± 5,4	-	-	-	-	-	-	
99	67,6 ± 17,5	7,4 ± 3,2	-	-	-	-	-	-	
100	64,4 ± 6,9	17,4 ± 1,6	-	-	-	-	-	-	
101	79,4 ± 5,8	9,5 ± 9,5	-	-	-	-	-	-	
102	19,5 ± 16,3	20,1 ± 4,7	-	-	-	-	-	-	
103	0,3 ± 3,5	26,3 ± 2,1	-	-	-	-	-	-	
104	18,9 ± 19	11,6 ± 0,0	-	-	-	-	-	-	
105	7,3 ± 16,7	-	-	-	-	-	-	-	
106	23,9 ± 12,2	-	-	-	-	-	-	-	
107	23,3 ± 3,8	-	-	-	-	-	-	-	
108	16,6 ± 6,5	-	-	-	-	-	-	-	
109	-	10,5 ± 1,0	-	-	-	-	-	-	
110	18,5 ± 9,8	-	-	-	-	-	-	-	
111	-	12,6 ± 1,0	-	-	-	-	-	-	

Tabla 4.4. Resultados de ensayos bioquímicos y biofísicos obtenidos para 16 compuestos de la familia de los Bis-heterociclos y precursores. **a)** Inhibición de la interacción S1/ACE2 (%) con el ELISA de EG, los compuestos fueron evaluados a una concentración inicial de 100 μM. **b)** Actividad inhibitoria (%) de la interacción RBD/ACE2 con el ELISA de AG, en este ensayo los compuestos se evaluaron a 20 μM. **c)** Ensayo celular (%) para el cual los compuestos se evaluaron a una concentración inicial de 100 μM. **Citotoxicidad** para los compuestos evaluados a una concentración de 100 μM contra línea celular de **d)** pulmón o **e)** intestino humano. **Ensayo antiviral:** IC₅₀, CC₅₀ e índice de selectividad (IS), obtenidos en el **f)** experimento 1 por método A y en el experimento 2 por el **g)** método A y **h)** método B. En verde se destacan los resultados de compuestos que cumplen el criterio de *hit* para determinado ensayo.

3.4.4 Carboranos

Estos compuestos fueron sintetizados por el Grupo de Química Medicinal del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias, UdelaR, con el fin de desarrollar fármacos para el tratamiento de glioblastoma, uno de los tumores más agresivos del sistema nervioso central. El objetivo fue crear compuestos híbridos que integraran dos estrategias terapéuticas, la terapia de captura de neutrones de boro y la inhibición del receptor de tirosina quinasa, como quimioterapia. Con esta finalidad, utilizaron *clusters* de boro icosaédricos conjugados a inhibidores de dichos receptores, los cuales fueron: erlotinib, sunitinib y lapatinib (185–187). En total, se evaluaron siete compuestos de esta familia (Figura 4.28.). Los resultados se muestran en la Tabla 4.5. Se comenzó evaluando el compuesto **112** (posee una molécula de erlotinib conjugada en su anillo benceno a un biscarborano de cobalto mediante un *linker* 1-(2-(2-oxietoxi)etil)-1*H*-1,2,3-triazol debido a que presentaba algunas características asociadas a inhibidores de PPIs como ser complejidad estructural y buen volumen.

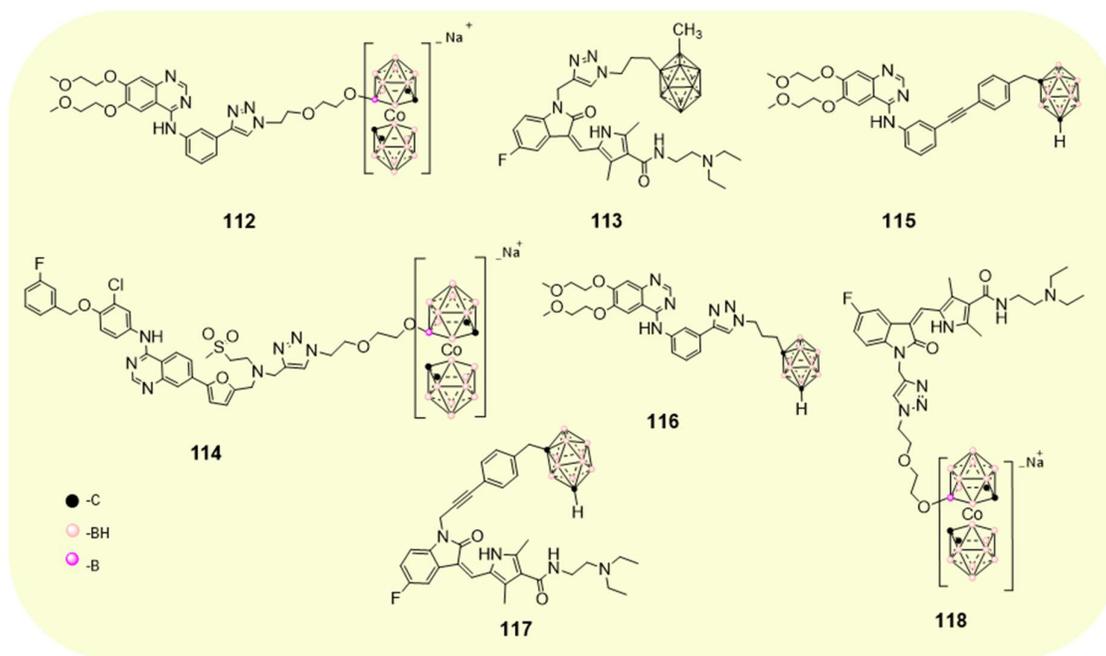


Figura 4.28. Estructuras de los 7 compuestos carboranos.

Como en el ELISA de EG este compuesto resultó activo (81% inhibición a 100 μM), se amplió el estudio a otros análogos closo-carboranilos: **116** (contiene erlotinib con un *linker* [1,2,3]triazolilpropilo), **113** y **117** sustituyen al erlotinib por una molécula de sunitinib conjugada al carborano a través del nitrógeno de la indolinona con un *linker* de [1,2,3]triazolilpropilo y etinilbencilo, respectivamente. La actividad de estos tres compuestos fue muy similar (41-56% inhibición), siendo el derivado de erlotinib ligeramente superior (51%) e inferior a la del **112**. Esto indica que la molécula de erlotinib contribuye a la actividad, particularmente cuando se conjuga al carborano con un *linker* del tipo 1-(2-(2-oxietoxi) etil)-1*H*-1,2,3-triazol.

Compuesto	Inhibición Kit EG (%) ^a	Inhibición Kit AG (%) ^b	Inhibición HEK 293/RBD (%) ^c	CC ₅₀ (μM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1	ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
				A549 ^d	HT29 ^e	Método A IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^f	Método A IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^g	Método B IC ₅₀ SARS-CoV-2 (μM) / CC ₅₀ (μM) / IS ^h
112	81,44 ± 0,9	20,7 ± 2,6	47,0 ± 0,9	-	-	14,4 / > 50 / 3,5	-	-
113	45,9 ± 20,4	51,6 ± 1,1	-	~ 60	-	8,4 / > 32,9 / 3,9	-	-
114	-	0 ± 2,1	-	-	-	> 50 / > 50 / 1,0	-	-
115	-	32,6 ± 1,1	-	-	-	> 50 / > 50 / 1,0	-	-
116	56,3 ± 15,1	-	67 ± 2,4	-	>100	> 50 / > 50 / 1,0	11,3 / > 50 / 4,4	10 / > 50 / 5,0
117	40,7 ± 12,2	-	43,7 ± 9,9	-	>100	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0	> 50 / > 50 / 1,0
118	-	6 ± 3,1	-	-	-	> 50 / > 50 / 1,0	-	-

Tabla 4.5. Resultados de ensayos bioquímicos y biofísicos obtenidos para 7 compuestos de la familia de los carboranos. **a)** Inhibición de la interacción S1/ACE2 (%) con el ELISA de EG, los compuestos fueron evaluados a una concentración inicial de 100 μM . **b)** Actividad inhibitoria (%) de la interacción RBD/ACE2 con el ELISA de AG, en este ensayo los compuestos se evaluaron a 20 μM . **c)** Ensayo celular (%) para el cual los compuestos se evaluaron a una concentración inicial de 100 μM . **Citotoxicidad** para los compuestos evaluados a una concentración de 100 μM contra línea celular de **d)** pulmón o **e)** intestino humano. **Ensayo antiviral:** IC₅₀, CC₅₀ e índice de selectividad (IS), obtenidos en el **f)** experimento 1 por **método A** y en el **experimento 2** por el **g)** método A y **h)** método B. En verde se destacan los resultados de compuestos que cumplen el criterio de *hit* para determinado ensayo.

Con el ELISA de AG (concentración de compuestos 20 μM) se probaron los análogos más activos de erlotinib (**112**) y sunitinib (**113**), nuevos derivados de ambos conteniendo *linkers* tipo etinilbencilo (**115**) y derivado de [1,2,3]-triazol (**118**), respectivamente, y un biscarborano conjugado a lapatinib (**114**). No se pudieron evaluar **116** y **117** por no encontrarse a disposición al momento del ensayo. Excepto

por el derivado de lapatinib (0% inhibición), el resto de los compuestos mostró el siguiente orden de actividad inhibitoria: **113** (52%) > **115** (33%) > **112** (21%) > **118** (6%). Este ensayo vuelve a destacar a los sustituyentes erlotinib y sunitinib como contribuyentes químicos importantes a la actividad contra S1/RBD, y por otro lado lleva a descartar al lapatinib (**114**), y al motivo diéter derivado de [1,2,3]triazol (**118**) como sustituyente y *linker* de fusión al sunitinib, respectivamente, del biscarborano.

Se seleccionaron para el ensayo celular los compuestos **112**, **116** y **117**. Estos tres compuestos fueron activos con valores de inhibición similares: 47%, 67% y 44%, respectivamente. En primera instancia, los 7 derivados fueron ensayados por el **Método A (Experimento 1)** para determinar su actividad antiviral. En este experimento decidimos incluir al núcleo biscarborano de cobalto (Figura 4.29) presente en los compuestos **112**, **114** y **118**. Esto fue motivado por el hecho que, en solución, algunos de estos derivados (ej. Erlotinib) han mostrado ser inestables pudiéndose desprender el biscarborano de la estructura, el cual descubrimos es capaz de inhibir moderadamente a la M^{pro} de SARS-CoV-2.

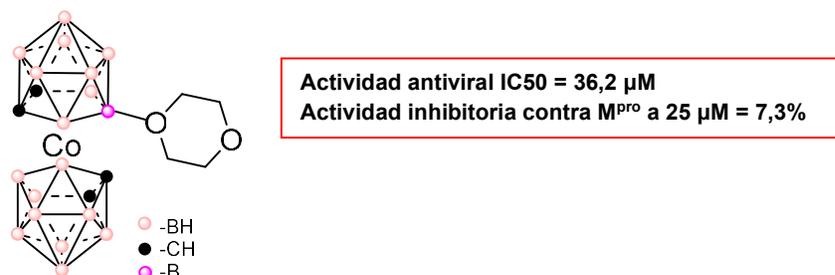


Figura 4.29. Estructura del biscarborano de cobalto presente en los compuestos **112**, **114** y **118**

Los derivados de erlotinib **112** (IC₅₀ = 14 μM) y sunitinib **113** (IC₅₀ = 8 μM) y, en menor medida, el carborano libre (IC₅₀ = 36 μM) mostraron actividad antiviral, los primeros con una potencia similar o menor a la de los fármacos control. Estos resultados pusieron en evidencia diferencias netas en el comportamiento de los derivados de erlotinib y sunitinib que no habían sido identificadas o predichas por los experimentos anteriores, y que en principio apuntarían a un aporte positivo de la estructura inhibidora de receptores de tirosin-quinasa cuando son fusionadas al núcleo carborano que presenta una actividad antiviral intrínseca. Para el compuesto **112** y para el biscarborano de cobalto, no así para el **113**, parte de su actividad

antiviral podría deberse a la capacidad de inhibir a la M^{pro} (IC₅₀ de 3.9 μM y 93% inhibición a 25 μM, respectivamente; Resultados no publicados aún).

Exceptuando al derivado de lapatinib (**114**) o al de sunitinib con el *linker* diéter derivado de [1,2,3]triazol (**118**), fue llamativa la falta de actividad antiviral de otros derivados de erlotinib (**115** y **116**) y sunitinib (**117**). Una de las razones que explicaría este comportamiento sería atribuible a un rol funcional del *linker* en la actividad o estabilidad del complejo carborano-fármaco pudiendo intervenir directamente en la unión al blanco molecular o facilitando la interacción de otras secciones de la molécula con este. Por ejemplo, el compuesto **113** incorpora un *cluster* de boro enlazado al sunitinib mediante un [1,2,3]-triazolpropilo, lo que lo distingue del compuesto **117**, inactivo, que contiene en su estructura etinilbencilo como enlace. Los 1,2,3-triazoles, como el usado en el enlace del compuesto **113**, como se comentó anteriormente, tienen propiedades medicinales y se han empleado en el diseño de estructuras para diversas aplicaciones terapéuticas, por lo que no podemos descartar que esta subestructura aporte a la bioactividad del compuesto (188). A su vez, los químicos responsables de la síntesis y caracterización de estos compuestos notaron que los derivados de sunitinib o erlotinib con mayor actividad contra células tumorales eran aquellos que tenían al grupo triazolilpropilo como *linker* (188–190). Otra diferencia notable entre el [1,2,3]-triazolpropilo y el etinilbencilo radica en la flexibilidad y polaridad del primero frente a la rigidez e hidrofobicidad del segundo.

Sin embargo, los resultados del experimento 1 (Tabla 4.5.) muestran que cuando el *linker* triazolpropilo es incorporado al complejo erlotinib-carborano (**116**) su efecto sobre la actividad antiviral es negativo respecto del compuesto con un derivado diéter de triazol como *linker* (**112**), lo cual sugiere una relación más compleja entre los múltiples componentes de estos compuestos.

Otra posibilidad es que en las configuraciones de los compuestos **112** y **113**, los enlaces entre el carborano y los fármacos sean más débiles en medio acuoso dando lugar a la fragmentación del compuesto en sus módulos farmacofóricos individuales. Por ejemplo, la descomposición podría llevar a la liberación del triazolilpropilo del **113**, que como mencionamos presenta propiedades medicinales y que unido al

derivado del erlotinib en la molécula **116** podría no estar alcanzando el blanco molecular debido a un posible impedimento estérico.

También podría liberarse el biscoarborano de cobalto, el cual es *per se* bioactivo contra el virus, en parte por su capacidad de inhibir a la M^{pro}. Siguiendo esa línea de razonamiento, decidimos re-evaluar la actividad del compuesto **116** el cual contiene erlotinib y un *linker* idéntico al del derivado **113** con sunitinib. Luego de un ciclo de congelamiento-descongelamiento, que esperábamos induzca la conversión del compuesto en sus precursores, **116** mostró ser tan activo (IC₅₀ ~10 μM) como su análogo **112** o la variante con sunitinib (**113**). Este resultado puede tomarse como un indicio preliminar de la hipótesis de inestabilidad de ciertos enlaces, y para su confirmación restaría determinar si las especies químicas individuales están presentes en el medio de ensayo, así como evaluar la actividad antiviral de los fármacos erlotinib y sunitinib, ya que los derivados que los incluían (**112** y **113**) fueron más activos que el biscoarborano.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 Conclusiones

Cuando se inició este trabajo de tesis nos encontrábamos inmersos en plena pandemia, en ese momento aún no existían vacunas disponibles y el desenlace era incierto. La imperante necesidad de encontrar fármacos efectivos contra el SARS-CoV-2 se presentaba como una urgencia. Inhibir la interacción *Spike*/ACE2 aparecía como una estrategia válida para bloquear el ciclo replicativo desde su fase inicial. A pesar de los desafíos que presenta la inhibición de PPIs mediante moléculas pequeñas, la ciencia y tecnología han avanzado en múltiples áreas en las últimas dos décadas para hacer frente a estos desafíos siendo que las PPIs representan una gran parte de las interacciones moleculares en la naturaleza.

En el transcurso de esta tesis:

- De un total de 2244 compuestos disponibles en las quimiotecas nacionales, se realizó una selección racional (blanco molecular-dirigida) de compuestos candidatos a ser inhibidores de la interacción RBD/ACE2.
- Agrupados en 21 familias de acuerdo con su similitud química, se evaluaron 266 de esos compuestos candidatos empleando dos *kits* comerciales de ELISA de las empresas EpigenTek y Adipogen. Además de por algunos aspectos técnicos, estos ensayos se distinguían por tener a la S1 o solo al RBD, respectivamente, de la *Spike* como dianas proteicas virales.
- Se evaluaron 218 compuestos con el *kit* de EpigenTek, de los cuales 44 pertenecientes a 17 familias diferentes mostraron actividad inhibitoria superior al 50%, resaltando la diversidad química entre los compuestos efectivos.
- Con el *kit* de Adipogen se evaluaron 131 compuestos. Solo 12 compuestos, pertenecientes a 7 familias químicas distintas, presentaron actividad inhibitoria superior al 50%.
- Se probaron 74 compuestos con ambos ensayos de ELISA. La mayoría de estos compuestos presentó actividad, sin embargo, solo 5 de estas moléculas presentaron una actividad inhibitoria superior al 50% de acuerdo con las condiciones de cada ensayo: **52**, **53** (arilidenonas), **82** (hidrazinotiazoles), **171** (glucósidos y precursores) y **263** (misceláneos). Estos compuestos podrían

estar actuando sobre un mismo blanco molecular presente en ambos *tests* de ELISA: RBD o ACE2. El resto de los compuestos que resultaron activos por uno u otro ensayo podrían estar estableciendo interacciones con secuencias (NTD, intermedia I, para el kit de EG) o regiones conformacionales (ej. interfaz de las anteriores con RBD o ACE2) de las especies moleculares presentes en cada uno de ellos.

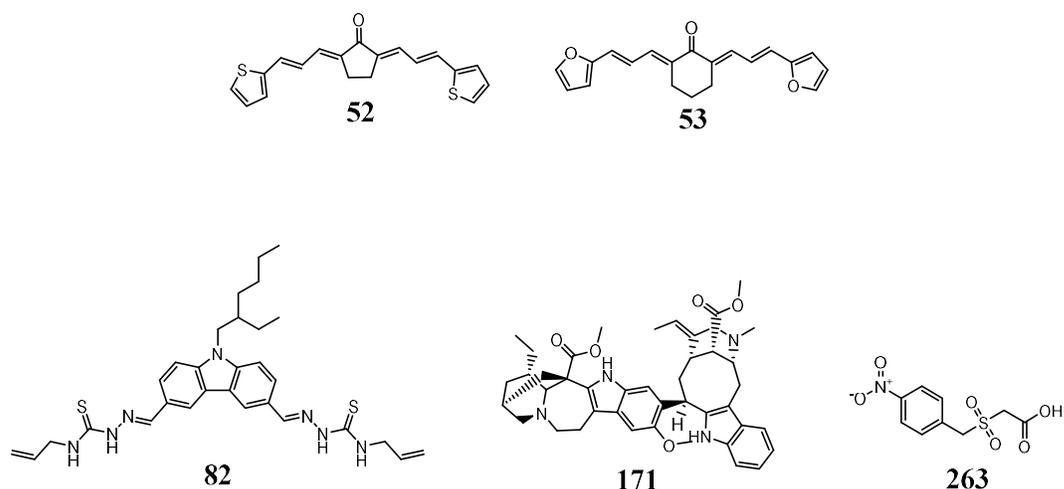


Figura 5.1 Estructura de los 5 compuestos que presentaron actividad inhibitoria > 50% en ambos ensayos de ELISA.

- Se seleccionaron 30 compuestos para validar los resultados obtenidos mediante un ensayo celular por citometría de flujo, solo 4 de ellos fueron capaces de inhibir la interacción RBD/ACE2 en más de un 50%. De los 5 *hits* identificados como activos en ambos ELISA, solo dos calificaron como *hits* en este ensayo: **52** y **53**.
- La mayoría de los compuestos clasificados como *hits* en los ensayos de ELISA y celular no resultaron citotóxicos a concentraciones ≥ 100 μM en líneas celulares humanas de tejidos de relevancia clínica para COVID-19 (epitelio pulmonar e intestinal).
- Se ensayó la actividad antiviral de 20 compuestos y 4 polipéptidos (control) no citotóxicos y activos en ensayos previos. Siete compuestos (pertenecientes a 3 familias químicas: arilidenonas, bis-heterociclos y carboranos) y los 4 polipéptidos paratóxicos inhibieron la proliferación de

SARS-CoV-2 con IC_{50} 5,6 a $<50 \mu\text{M}$ o sub- μM , respectivamente. La actividad antiviral de 4 de estos compuestos (dos arilidenonas: **50** y **52** y dos carboranos: **113** y **116**) fue igual o menor que la de los fármacos control (lopinavir, remdesivir y cloroquina, $IC_{50} = 9\text{-}22 \mu\text{M}$). El índice de selectividad de las moléculas bioactivas estuvo entre 1,3 a 9, destacándose el **52** como el más selectivo.

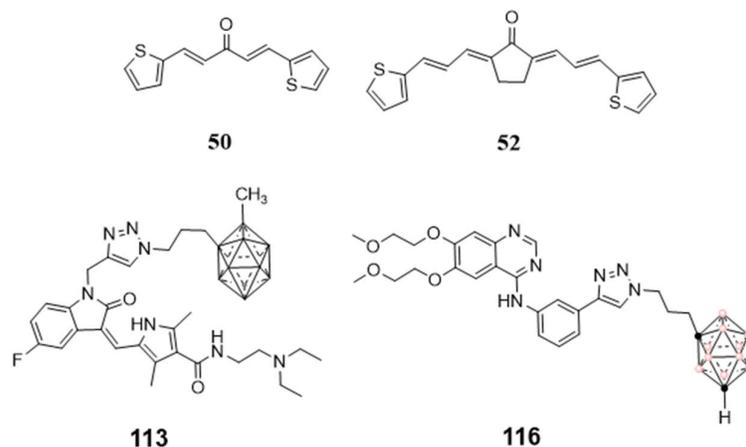


Figura 5.2. Estructura de los 4 compuestos que presentaron actividad antiviral igual o menor que la de los fármacos control (lopinavir, remdesivir y cloroquina, $IC_{50} = 9\text{-}22 \mu\text{M}$).

- El análisis de REA permitió identificar determinantes químicos y estructurales de la actividad para la familia de las arilidenonas, bis-heterociclos y precursores y carboranos.
- Algunos de los compuestos con destacada actividad inhibitoria *in vitro* no presentaron actividad antiviral. Las discrepancias entre resultados de diferentes ensayos resaltan la complejidad y necesidad de múltiples enfoques a la hora de abordar este tipo de interacciones. Hemos reconocido la complejidad de evaluar interacciones proteína-proteína, la necesidad de utilizar múltiples ensayos y métodos para validar resultados, y la importancia de considerar las variables experimentales que pueden influir en la interpretación de los datos.

4.2 Perspectivas

La aparición de nuevos CoVs o la reemergencia de variantes más letales de SARS-CoV-2, representa una amenaza permanente para la salud pública. Su alta prevalencia y distribución mundial, su capacidad de saltar la barrera de especies, su gran diversidad y capacidad de recombinación genética sumado a la globalización y al crecimiento de actividades que involucran animales-humanos-ecosistemas, vuelve altamente probable el surgimiento de nuevos CoVs. Una evidencia clara de ello ha sido que en solo dos décadas han surgido tres nuevos CoVs altamente patogénicos para los humanos (MERS, SARS y SARS-CoV-2). Este escenario epidemiológico se ve agravado por factores ambientales/ecológicos (cambio climático e invasión de hábitats naturales de vectores y reservorios, etc), sociales (pobreza, saneamiento y agua potable) y de salud pública (falta o limitada asistencia médica) adversos en amplias regiones del mundo superpobladas. Por otro lado, un dato no menor expuesto dramáticamente por la última pandemia ha sido la ausencia casi total de fármacos dirigidos contra CoV. Esta situación agravó el control primario de los focos epidémicos y dejó sin opciones terapéuticas a los casos severos de COVID-19. Todo esto realza la necesidad de seguir investigando y desarrollando nuevos fármacos y herramientas de estudio para estos virus (16–18).

En este estudio, se han identificado compuestos con actividad contra la interacción *Spike/ACE2* y/o anti-SARS-CoV-2 en las condiciones mencionadas. Sin embargo, las condiciones de ensayo empleadas no permiten discriminar de manera certera el origen de la actividad biológica observada, aunque aportan indicios preliminares. Por ejemplo, una baja carga viral puede ser causada no solo por bloqueo del ingreso del virus a la célula, sino también por actividad virucida o por la inhibición de la replicación viral por acción de los compuestos sobre (otros) blancos moleculares virales y/o de la célula huésped.

A futuro, para aquellos compuestos que han demostrado una destacada actividad antiviral, como los compuestos **50**, **52** y **116**, habría que realizar estudios adicionales para confirmar que esta actividad está vinculada exclusivamente a la inhibición de esta interacción o si son otros los blancos moleculares de su acción. Una vez confirmado el blanco molecular, se propone llevar a cabo estudios estructura-actividad para elucidar el farmacóforo con el objetivo de optimizar la

molécula y mejorar la eficacia del compuesto, así como también ensayos que permitan comprender el mecanismo de acción. Un foco especial de estudio debería ser elucidar el sitio específico de *Spike* y/o ACE2 al cual los mismos se están uniendo, ya que los *hits* identificados pertenecen a familias químicas que no guardan relación estructural. Posiblemente, estos compuestos se estén uniendo a regiones diferentes de estas proteínas. Este análisis podría llevar a plantearnos posibles combinaciones de compuestos y al diseño de nuevas moléculas mediante hibridación molecular, preservando los farmacóforos de cada molécula. Como se mencionó en la introducción la terapia combinada se presenta como una opción ideal a la hora de tratar infecciones por virus de ARN, considerando sus altas tasas mutacionales. También es importante determinar si los compuestos con actividad antiviral afectan a múltiples blancos ya que cada vez hay más evidencia que varios compuestos tienen actividad sobre más de un blanco molecular. Los fármacos *multitarget* ofrecen ventajas significativas, como mayor eficacia, reducen el riesgo de surgimiento de resistencia a fármacos al afectar múltiples puntos en una vía biológica, menor toxicidad (191). También sería importante estudiar los *hits* aquí identificados contra las variantes actualmente en circulación, así como evaluar la actividad inhibitoria contra la *Spike* de al menos las variantes identificadas como de preocupación, ya que esta información sería valiosa para comprender el mecanismo de unión ligando-receptor.

En el caso de compuestos que han mostrado actividad contra la interfaz *Spike* /ACE2, pero no han presentado actividad antiviral, como lo son compuestos pertenecientes a la familia de las arilidenonas, carboranos, bis-heterociclos, entre otros, se deberían realizar estudios para comprender los posibles mecanismos subyacentes a esta discrepancia con el fin de optimizar las moléculas.

Por último, más allá de su potencial aplicación como fármacos, estos compuestos podrían desempeñar un papel crucial como herramientas valiosas para continuar esclareciendo los procesos moleculares involucrados en la interacción entre estas dos proteínas y por ende comprender los complejos mecanismos de relación entre el virus y la célula huésped, principalmente a nivel de reconocimiento e internalización del patógeno.

Referencias

1. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., et al. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
2. The 2019-nCoV Outbreak Joint Field Epidemiology Investigation Team, & Li, Q. (2020). Notes from the Field: An outbreak of NCIP (2019-nCoV) infection in China — Wuhan, Hubei Province, 2019–2020. *China CDC Weekly*, 2(5), 79-80. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.022>
3. Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., et al. (2020). The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5, 536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
4. Tan, W., Zhao, X., Ma, X., Wang, W., Niu, P., Xu, W., et al. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
5. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., et al. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
6. Drosten, C., van der Werf, S., Rabenau, H., Fouchier, R. A. M., Cinatl, J., Grywna, K., et al. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 10, 1967-1976. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
7. Raj, V. S., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., & Haagmans, B. L. (2014). MERS: Emergence of a novel human coronavirus. *Current Opinion in Virology*, 5, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.010>
8. Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*, 395(10223), 470-473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)
9. Munster, V. J., Koopmans, M., van Doremalen, N., van Riel, D., & de Wit, E. (2020). A novel coronavirus emerging in China: Key questions for impact assessment. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 692-694. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2000929>
10. Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., et al. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1199-1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
11. Chan, J. F. W., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K. W., Chu, H., Yang, J., et al. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a family cluster. *The Lancet*, 395(10223), 514-523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)
12. World Health Organization. (2020). Novel coronavirus (2019-nCoV): Situation report, 11. Retrieved from <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf>
13. World Health Organization. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation report-51. Retrieved from <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf>

14. Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 121(1), 190-193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>
15. Fenner, F. (1987). Coronaviridae. In *Veterinary Virology* (p. 505). Academic Press.
16. Coleman, C. M., & Frieman, M. B. (2014). Coronaviruses: Important emerging human pathogens. *Journal of Virology*, 88(10), 5209-5212. <https://doi.org/10.1128/JVI.03488-13>
17. Gao, G. F. (2018). From "A"IV to "Z"IKV: Attacks from emerging and re-emerging pathogens. *Cell*, 172(6), 1157-1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.025>
18. Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., et al. (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490-502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
19. Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 635-664. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005>
20. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
21. Khailany, R. A., Safdar, M., & Ozaslan, M. (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*, 19, 100682. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>
22. Zhang, Z., Nomura, N., Muramoto, Y., Ekimoto, T., Uemura, T., Liu, K., et al. (2022). Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nature Communications*, 13(1), 4399. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>
23. Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virology Journal*, 16, 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
24. Perlman, S., & Masters, P. (2013). Coronaviridae. In Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Eds.), *Fields Virology* (6th ed., Vol. 1, pp. 826-858). Lippincott Williams & Wilkins.
25. Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 65, 193-292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
26. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., et al. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450-454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
27. Hofmann, H., Pyrc, K., Van Der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., & Pöhlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7988-7993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409465102>
28. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., et al. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
29. Raj, V. S., Mou, H., Smits, S. L., Dekkers, D. H. W., Müller, M. A., Dijkman, R., et al. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 495(7440), 251-254. <https://doi.org/10.1038/nature12005>
30. Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., & Dean, D. C. (1989). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 337(6377), 420-422. <https://doi.org/10.1038/357420a0>
31. Liu, D. X., Liang, J. Q., & Fung, T. S. (2020). Human coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). In *Encyclopedia of Virology* (4th ed., Vol. 1-5, pp. 428-440). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>

32. Tortorici, M. A., & Veessler, D. (2019). Structural insights into coronavirus entry. *Advances in Virus Research*, 105, 93-116. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.08.002>
33. Koch, J., Uckelely, Z. M., Doldan, P., Stanifer, M., Boulant, S., & Lozach, P. Y. (2021). TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *The EMBO Journal*, 40(16), e107821. <https://doi.org/10.15252/emj.2021107821>
34. Baggen, J., Vanstreels, E., Jansen, S., & Daelemans, D. (2021). Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nature Microbiology*, 6(11), 1219-1232. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00958-0>
35. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(5), 155-170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
36. Verma, S., & Prabhakar, Y. (2015). Target based drug design - A reality in virtual sphere. *Current Medicinal Chemistry*, 22(13), 1603-1630. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150209151209>
37. Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., & Jiang, S. (2009). The spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 226-236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
38. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(10), 1141-1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
39. Huang, J., Huang, H., Wang, D., Wang, C., & Wang, Y. (2020). Immunological strategies against spike protein: Neutralizing antibodies and vaccine development for COVID-19. *Clinical and Translational Medicine*, 10(6), e319. <https://doi.org/10.1002/ctm2.184>
40. Martínez-Flores, D., Zepeda-Cervantes, J., Cruz-Reséndiz, A., Aguirre-Sampieri, S., Sampieri, A., & Vaca, L. (2021). SARS-CoV-2 vaccines based on the spike glycoprotein and implications of new viral variants. *Frontiers in Immunology*, 12, 660871. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.701501>
41. Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., et al. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450-456. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
42. Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Walls, A. C., Beltramello, M., et al. (2020). Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*, 183(4), 1024-1042.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
43. Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H. D., Starr, T. N., Malone, K. D., Chu, H. Y., et al. (2021). Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host & Microbe*, 29(3), 463-476.e6. <https://doi.org/DOI: 10.1016/j.chom.2021.02.003>
44. Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J. C. C., et al. (2020). Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*, 9, e61312. <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>
45. McCarthy, K. R., Rennick, L. J., Nambulli, S., Robinson-McCarthy, L. R., Bain, W. G., Haidar, G., et al. (2023). Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science*, 379(6626), 1150-1155. <https://doi.org/10.1126/science.abf6950>
46. Starr, T. N., Greaney, A. J., Addetia, A., Hannon, W. W., Choudhary, M. C., Dingens, A. S., et al. (2024). Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19. <https://doi.org/10.1126/science.abf9302>

47. Li, Y., Wang, T., Zhang, J., Shao, B., Gong, H., Wang, Y., et al. (2021). Exploring the regulatory function of the N-terminal domain of SARS-CoV-2 spike protein through molecular dynamics simulation. *Advanced Theory and Simulations*, 4(10), 2100144. <https://doi.org/10.1002/adts.202100152>
48. Braet, S. M., Buckley, T. S. C., Venkatakrisnan, V., Dam, K. M. A., Bjorkman, P. J., & Anand, G. S. (2023). Timeline of changes in spike conformational dynamics in emergent SARS-CoV-2 variants reveal progressive stabilization of trimer stalk with altered NTD dynamics. *eLife*, 12, e85572. <https://doi.org/10.7554/eLife.82584>
49. Magazine, N., Zhang, T., Wu, Y., McGee, M. C., Veggiani, G., & Huang, W. (2022). Mutations and evolution of the SARS-CoV-2 spike protein. *Viruses*, 14(3), 409. <https://doi.org/10.3390/v15091787>
50. Suryadevara, N., Shrihari, S., Gilchuk, P., VanBlargan, L. A., Binshtein, E., Zost, S. J., et al. (2021). Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Cell*, 184(9), 2316-2331.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.029>
51. McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., Walls, A. C., et al. (2021). N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*, 184(9), 2332-2347.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.028>
52. Xia, S., Yan, L., Xu, W., Agrawal, A. S., Algaissi, A., Tseng, C. T. K., et al. (2019). A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Science Advances*, 5(4), eaav4580. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav4580>
53. Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., et al. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Research*, 30(4), 343-355. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>
54. Zhou, J., Xu, W., Liu, Z., Wang, C., Xia, S., Lan, Q., et al. (2022). A highly potent and stable pan-coronavirus fusion inhibitor as a candidate prophylactic and therapeutic for COVID-19 and other coronavirus diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(4), 1652-1661. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.07.026>
55. Shin, Y. H., Jeong, K., Lee, J., Lee, H. J., Yim, J., Kim, J., et al. (2022). Inhibition of ACE2-spike interaction by an ACE2 binder suppresses SARS-CoV-2 entry. *Angewandte Chemie International Edition*, 61(11). <https://doi.org/10.1002/anie.202114843>
56. Karoyan, P., Vieillard, V., Gómez-Morales, L., Odile, E., Guihot, A., Luyt, C. E., et al. (2021). Human ACE2 peptide-mimics block SARS-CoV-2 pulmonary cells infection. *Communications Biology*, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02137-6>
57. Monteil, V., Eaton, B., Postnikova, E., Murphy, M., Braunsfeld, B., Crozier, I., et al. (2022). Clinical grade ACE2 as a universal agent to block SARS-CoV-2 variants. *EMBO Molecular Medicine*, 14(8), e15830. <https://doi.org/10.15252/emmm.202215830>
58. Vaarala, M. H., Porvari, K. S., Kellokumpu, S., Kyllönen, A. P., & Vihko, P. T. (2001). Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues. *Journal of Pathology*, 193(1), 134-140. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(200101\)193:1<134::AID-PATH754>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1096-9896(200101)193:1<134::AID-PATH754>3.0.CO;2-R)
59. Fraser, B. J., Beldar, S., Seitova, A., Hutchinson, A., Mannar, D., Li, Y., et al. (2022). Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. *Nature Chemical Biology*, 18(9), 963-971. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01043-5>
60. Larzabal, L., Nguewa, P. A., Pio, R., Blanco, D., Sanchez, B., Rodríguez, M. J., et al. (2011). Overexpression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer is associated with poor

prognosis in patients with squamous histology. *British Journal of Cancer*, 105(10), 1608-1614. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.421>

61. Ko, C. J., Huang, C. C., Lin, H. Y., Juan, C. P., Lan, S. W., Shyu, H. Y., et al. (2015). Androgen-induced TMPRSS2 activates matriptase and promotes extracellular matrix degradation, prostate cancer cell invasion, tumor growth, and metastasis. *Cancer Research*, 75(14), 2949-2960. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2070>

62. Limburg, H., Harbig, A., Bestle, D., Stein, D. A., Moulton, H. M., Jaeger, J., et al. (2019). TMPRSS2 is the major activating protease of influenza A virus in primary human airway cells and influenza B virus in human type II pneumocytes. *Journal of Virology*, 93(21), e00649-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00649-19>

63. Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W., & Matrosovich, M. (2006). Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *Journal of Virology*, 80(19), 9896-9898. <https://doi.org/10.1128/JVI.01118-06>

64. Hoffmann, M., Schroeder, S., Kleine-Weber, H., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: New treatment option for COVID-19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(6), e00754-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00754-20>

65. Li, G., Hilgenfeld, R., Whitley, R., & De Clercq, E. (2023). Therapeutic strategies for COVID-19: Progress and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(6), 449-475. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00672-y>

66. Vincent, M. J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B. R., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., et al. (2005). Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology Journal*, 2(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-69>

67. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., et al. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30(4), 269-271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>

68. Thomé, R., Lopes, S. C. P., Costa, F. T. M., & Verinaud, L. (2013). Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. *Immunology Letters*, 153(1-2), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.07.004>

69. Trougakos, I. P., Stamatelopoulos, K., Terpos, E., Tsitsilonis, O. E., Aivalioti, E., Paraskevis, D., et al. (2021). Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00703-5>

70. Yang, H., Xie, W., Xue, X., Yang, K., Ma, J., Liang, W., et al. (2005). Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biology*, 3(10), e400. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030324>

71. Singer, J., Gifford, R. J., & Robertson, D. L. (2020). CoV-GLUE: A web application for tracking SARS-CoV-2 genomic variation. <https://doi.org/10.20944/preprints202006.0225.v1>

72. Shin, D., Mukherjee, R., Grewe, D., Bojkova, D., Baek, K., Bhattacharya, A., et al. (2020). Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature*, 587(7835), 657-662. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>

73. Tan, H., Hu, Y., Jadhav, P., Tan, B., & Wang, J. (2022). Progress and challenges in targeting the SARS-CoV-2 papain-like protease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(15), 7561-7580. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00303>

74. Malone, B., Urakova, N., Snijder, E. J., & Campbell, E. A. (2022). Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-

- CoV-2 drug design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 21–39. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>
- 75.** Kocic, G., Hillen, H. S., Tegunov, D., Dienemann, C., Seitz, F., Schmitzova, J., et al. (2021). Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nature Communications*, 12(1), 279. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0>
- 76.** Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Woolner, E., Perry, J. K., Feng, J. Y., Porter, D. P., et al. (2020). Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *Journal of Biological Chemistry*, 295(33), 6785–6797. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013679>
- 77.** Wang, Y., Zhang, D., Du, G., Du, R., Zhao, J., Jin, Y., et al. (2020). Remdesivir in adults with severe COVID-19: A randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*, 395(10236), 1569–1578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31022-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
- 78.** Butler, C. C., Hobbs, F. D. R., Gbinigie, O. A., Rahman, N. M., Hayward, G., Richards, D. B., et al. (2023). Molnupiravir plus usual care versus usual care alone as early treatment for adults with COVID-19 at increased risk of adverse outcomes (PANORAMIC): An open-label, platform-adaptive randomised controlled trial. *The Lancet*, 401(10373), 281–293. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02597-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02597-1)
- 79.** Saramago, M., Bárria, C., Costa, V. G., Souza, C. S., Viegas, S. C., Domingues, S., et al. (2021). New targets for drug design: Importance of nsp14/nsp10 complex formation for the 3'-5' exoribonucleolytic activity on SARS-CoV-2. *FEBS Journal*, 288(17), 5130–5147. <https://doi.org/10.1111/febs.15815>
- 80.** Bouvet, M., Lugari, A., Posthuma, C. C., Zevenhoven, J. C., Bernard, S., Betzi, S., et al. (2014). Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), 25783–25796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577353>
- 81.** Yan, L., Yang, Y., Li, M., Zhang, Y., Zheng, L., Ge, J., et al. (2021). Coupling of N7-methyltransferase and 3'-5' exoribonuclease with SARS-CoV-2 polymerase reveals mechanisms for capping and proofreading. *Cell*, 184(13), 3474-3485.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.033>
- 82.** Robson, F., Khan, K. S., Le, T. K., Paris, C., Demirbag, S., Barfuss, P., et al. (2020). Coronavirus RNA proofreading: Molecular basis and therapeutic targeting. *Molecular Cell*, 79, 710–727. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.027>
- 83.** Ahmed-Belkacem, R., Hausdorff, M., Delpal, A., Sutto-Ortiz, P., Colmant, A. M. G., Touret, F., et al. (2022). Potent inhibition of SARS-CoV-2 nsp14 N7-methyltransferase by sulfonamide-based bisubstrate analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(8), 6231–6249. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00120>
- 84.** Kannan, S., Subbaram, K., Ali, S., & Kannan, H. (2020). Molecular characterization and amino acid homology of nucleocapsid (N) protein in SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV, and bat coronavirus. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14, 757–763. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.SPL1.13>
- 85.** Wu, W., Cheng, Y., Zhou, H., Sun, C., & Zhang, S. (2023). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: Its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virology Journal*, 20, Article 74. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6>
- 86.** Rak, A., Isakova-Sivak, I., & Rudenko, L. (2023). Overview of nucleocapsid-targeting vaccines against COVID-19. *Vaccines*, 11, Article 71. <https://doi.org/10.3390/vaccines11121810>

- 87.** Ge, Y., Tian, T., Huang, S., Wan, F., Li, J., Li, S., et al. (2021). An integrative drug repositioning framework discovered a potential therapeutic agent targeting COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, Article 67. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00568-6>
- 88.** Luan, X., Li, X., Li, Y., Su, G., Yin, W., Jiang, Y., et al. (2022). Antiviral drug design based on structural insights into the N-terminal domain and C-terminal domain of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Science Bulletin*, 67(22), 2327–2335. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2022.10.021>
- 89.** Cubuk, J., Alston, J. J., Incicco, J. J., Singh, S., Stuchell-Breerton, M. D., Ward, M. D., et al. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nature Communications*, 12, Article 1936. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21953-3>
- 90.** McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15, 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- 91.** Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., et al. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
- 92.** Park, A., & Iwasaki, A. (2020). Type I and Type III interferons – Induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. *Cell Host & Microbe*, 27(6), 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
- 93.** Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation, and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- 94.** Andino, R., & Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology*, 479–480, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.022>
- 95.** Kirkegaard, K., van Buuren, N. J., & Mateo, R. (2016). My cousin, my enemy: Quasispecies suppression of drug resistance. *Current Opinion in Virology*, 20, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.011>
- 96.** Shyr, Z. A., Cheng, Y. S., Lo, D. C., & Zheng, W. (2021). Drug combination therapy for emerging viral diseases. *Drug Discovery Today*, 26(10), 2367–2376. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.008>
- 97.** Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801–8811. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>
- 98.** Delmas, B., & Laude, H. (1990). Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *Journal of Virology*, 64(11), 5367–5375. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.11.5367-5375.1990>
- 99.** Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., et al. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- 100.** Xia, S., Zhu, Y., Liu, M., Lan, Q., Xu, W., Wu, Y., et al. (2020). Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(7), 765–767. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2>
- 101.** Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>

- 102.** Chan, Y. A., & Zhan, S. H. (2022). The emergence of the spike furin cleavage site in SARS-CoV-2. *Molecular Biology and Evolution*, 39(1). <https://doi.org/10.1093/molbev/msab327>
- 103.** Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular Cell*, 78(4), 779–784.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
- 104.** Li, X., Duan, G., Zhang, W., Shi, J., Chen, J., & Chen, S. (2020). A furin cleavage site was discovered in the S protein of the 2019 novel coronavirus. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 15(2), 103–108. <https://doi.org/10.12113/202002001>
- 105.** Mille, J. K., & Whittaker, G. R. (2014). Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), 15214–15219. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407087111>
- 106.** Park, J. E., Li, K., Barlan, A., Fehr, A. R., Perlman, S., McCray, P. B., et al. (2016). Proteolytic processing of middle east respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), 12262–12267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608147113>
- 107.** Menachery, V. D., Dinnon, K. H., Yount, B. L., McAnarney, E. T., Gralinski, L. E., Hale, A., et al. (2020). Trypsin treatment unlocks barrier for zoonotic bat coronavirus infection. *Journal of Virology*, 94(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.01774-19>
- 108.** Wrobel, A. G., Benton, D. J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., et al. (2020). SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(8), 763–767. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0468-7>
- 109.** Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
- 110.** Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bosch, B. J., Frenz, B., Rottier, P. J. M., DiMaio, F., et al. (2016). Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*, 531(7592), 114–117. <https://doi.org/10.1038/nature16988>
- 111.** Burkard, C., Verheije, M. H., Wicht, O., van Kasteren, S. I., van Kuppeveld, F. J., Haagsma, B. L., et al. (2014). Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathogens*, 10(11), e1004502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
- 112.** Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A., & Pöhlmann, S. (2013). Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Research*, 100(3), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.028>
- 113.** Walls, A. C., Tortorici, M. A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch, B. J., Rey, F. A., et al. (2017). Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(42), 11157–11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>
- 114.** Shi, W., Cai, Y., Zhu, H., Peng, H., Voyer, J., Rits-Volloch, S., et al. (2023). Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 postfusion spike in membrane. *Nature*, 619(7969), 403–409. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06273-4>
- 115.** Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., et al. (2020). Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, 588(7837), 327–330. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2772-0>

- 116.** Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., et al. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, *581*(7807), 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
- 117.** Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, *369*(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- 118.** Sztain, T., Ahn, S. H., Bogetti, A. T., Casalino, L., Goldsmith, J. A., Seitz, E., et al. (2021). A glycan gate controls opening of the SARS-CoV-2 spike protein. *Nature Chemistry*, *13*(10), 963–968. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00758-3>
- 119.** Zhao, P., Praissman, J. L., Grant, O. C., Cai, Y., Xiao, T., Rosenbalm, K. E., et al. (2020). Virus-receptor interactions of glycosylated SARS-CoV-2 spike and human ACE2 receptor. *Cell Host & Microbe*, *28*(4), 586–601.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.004>
- 120.** Nguyen, K., Chakraborty, S., Mansbach, R. A., Manrique, P. D., Korber, B., & Gnanakaran, S. (2021). Exploring the role of glycans in the interaction of SARS-CoV-2 RBD and human receptor ACE2. *Biophysical Journal*, *120*(3), 15a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.11.359>
- 121.** Biering, S. B., Gomes de Sousa, F. T., Tjang, L. V., Pahmeier, F., Zhu, C., Ruan, R., et al. (2022). SARS-CoV-2 spike triggers barrier dysfunction and vascular leak via integrins and TGF- β signaling. *Nature Communications*, *13*(1), 3765. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34910-5>
- 122.** Gerencer, M., & McGuffin, L. J. (2023). Are the integrin binding motifs within SARS-CoV-2 spike protein and MHC class II alleles playing the key role in COVID-19? *Frontiers in Immunology*, *14*, 123. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1177691>
- 123.** Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L. C., Lely, A. T., Navis, G. J., & van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*, *203*(2), 631–637. <https://doi.org/10.1002/path.1570>
- 124.** Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, *367*(6485), 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
- 125.** Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., et al. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>
- 126.** Mehdipour, A. R., & Hummer, G. (2021). Dual nature of human ACE2 glycosylation in binding to SARS-CoV-2 spike. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *118*(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.2100425118>
- 127.** Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., et al. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, *581*(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- 128.** Day, C. J., Bailly, B., Guillon, P., Dirr, L., Jen, F.-E. C., Spillings, B. L., et al. (2021). Multidisciplinary approaches identify compounds that bind to human ACE2 or SARS-CoV-2 spike protein as candidates to block SARS-CoV-2-ACE2 receptor interactions. *mBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.03681-20>
- 129.** Hanson, Q. M., Wilson, K. M., Shen, M., Itkin, Z., Eastman, R. T., Shinn, P., et al. (2020). Targeting ACE2-RBD interaction as a platform for COVID-19 therapeutics: Development and drug-repurposing screen of an AlphaLISA proximity assay. *ACS*

- Pharmacology & Translational Science*, 3(6), 1352–1360.
<https://doi.org/10.1021/acscptsci.0c00161>
- 130.** Lin, C. D., Li, Y., Zhang, Y. B., Liu, Z. Y., Mu, X., Gu, C., et al. (2021). Correction to: Ceftazidime is a potential drug to inhibit SARS-CoV-2 infection in vitro by blocking spike protein–ACE2 interaction. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00619-y>
- 131.** Sammons, R. M., Bohanon, A. L., Kowtha, A., Dejong, A., Cho, E. J., Kaoud, T. S., et al. (2022). High-throughput assay for identifying diverse antagonists of the binding interaction between the ACE2 receptor and the dynamic spike proteins of SARS-CoV-2. *ACS Infectious Diseases*, 8(11), 2259–2270. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.2c00297>
- 132.** Tsegay, K. B., Adeyemi, C. M., Gniffke, E. P., Sather, D. N., Walker, J. K., & Smith, S. E. P. (2021). A repurposed drug screen identifies compounds that inhibit the binding of the COVID-19 spike protein to ACE2. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.685308>
- 133.** Xu, M., Pradhan, M., Gorshkov, K., Petersen, J. D., Shen, M., Guo, H., et al. (2022). A high throughput screening assay for inhibitors of SARS-CoV-2 pseudotyped particle entry. *SLAS Discovery*, 27(2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2021.12.005>
- 134.** Unni, S., Aouti, S., Thiyagarajan, S., & Padmanabhan, B. (2020). Identification of a repurposed drug as an inhibitor of spike protein of human coronavirus SARS-CoV-2 by computational methods. *Journal of Biosciences*, 45(1). <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00102-w>
- 135.** Law, J. L. M., Logan, M., Joyce, M. A., Landi, A., Hockman, D., Crawford, K., et al. (2021). SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding-domain (RBD) induces neutralizing antibodies against variant strains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1. *Vaccine*, 39(40), 5769–5779. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.081>
- 136.** Makurvet, F. D. (2021). Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access. *Medical Drug Discovery*, 9, 100075. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100075>
- 137.** Zinzalla, G., & Thurston, D. E. (2009). Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: A challenge for the future. *Future Medicinal Chemistry*, 1(1), 65–93. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.12>
- 138.** Wendt, M. D. (2012). Protein-protein interactions as drug targets. *Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 1–56. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.138>
- 139.** Smith, M. C., & Gestwicki, J. E. (2012). Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: Topology, surface area, and affinity. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 14. <https://doi.org/10.1017/erm.2012.10>
- 140.** Mangani, S. (Ed.). (2019). *Disruption of protein-protein interfaces*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37999-4>
- 141.** Scott, D. E., Bayly, A. R., Abell, C., & Skidmore, J. (2016). Small molecules, big targets: Drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 533–550. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.29>
- 142.** Keskin, O., Gursoy, A., Ma, B., & Nussinov, R. (2008). Principles of protein-protein interactions: What are the preferred ways for proteins to interact? *Chemical Reviews*, 108, 1225–1244. <https://doi.org/10.1021/cr0782314>
- 143.** Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- 144.** Wells, J. A., & McClendon, C. L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 450, 1001–1009. <https://doi.org/10.1038/nature06526>

- 145.** Bogan, A. A., & Thorn, K. S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *Journal of Molecular Biology*, 280(1), 1–9. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1843>
- 146.** Westendorf, K., Žentelis, S., Wang, L., Foster, D., Vaillancourt, P., Wiggin, M., et al. (2022). LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports*, 39(7), 110885. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110812>
- 147.** Hansen, J., Baum, A., Pascal, K. E., Russo, V., Giordano, S., Wloga, E., et al. (2020). Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science*, 369(6506), 1010–1014. <https://doi.org/10.1126/science.abd0827>
- 148.** Acharya, A., Pandey, K., Thurman, M., Klug, E., Trivedi, J., Sharma, K., et al. (2021). Discovery and evaluation of entry inhibitors for SARS-CoV-2 and its emerging variants. *Journal of Virology*, 95(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.01437-21>
- 149.** Curreli, F., Ahmed, S., Victor, S. M. B., Drelich, A., Panda, S. S., Altieri, A., et al. (2022). Discovery of highly potent fusion inhibitors with potential pan-coronavirus activity that effectively inhibit major COVID-19 variants of concern (VOCs) in pseudovirus-based assays. *Viruses*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/v14010069>
- 150.** Amicone, M., Borges, V., Alves, M. J., Isidro, J., Zé-Zé, L., Duarte, S., et al. (2022). Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evolutionary Medicine & Public Health*, 10(1), 142–155. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>
- 151.** Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., et al. (2022). SARS-CoV-2 mutations and their impact on diagnostics, therapeutics, and vaccines. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.815389>
- 152.** Greaney, A. J., Starr, T. N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Binshtein, E., Loes, A. N., et al. (2021). Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition. *Cell Host & Microbe*, 29(1), 44–57.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.007>
- 153.** Yang, W. T., Huang, W. H., Liao, T. L., Hsiao, T. H., Chuang, H. N., & Liu, P. Y. (2022). SARS-CoV-2 E484K mutation narrative review: Epidemiology, immune escape, clinical implications, and future considerations. *Infection and Drug Resistance*, 15, 373–385. <https://doi.org/10.2147/IDR.S344099>
- 154.** Xie, X., Liu, Y., Liu, J., Zhang, X., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., et al. (2021). Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K, and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *Nature Medicine*, 27(4), 620–621. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01270-4>
- 155.** Liu, H., Zhang, Q., Wei, P., Chen, Z., Aviszus, K., Yang, J., et al. (2021). The basis of a more contagious 501Y.V1 variant of SARS-CoV-2. *Cell Research*, 31(7), 720–722. <https://doi.org/10.1101/2021.02.02.428884>
- 156.** Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., et al. (2021). N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2. *Scientific Reports*, 11(1), 69091. <https://doi.org/10.7554/eLife.69091>
- 157.** Gobeil, S. M. C., Janowska, K., McDowell, S., Mansouri, K., Parks, R., Stalls, V., et al. (2021). Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity. *Science*, 373(6555), eabk3072. <https://doi.org/10.1126/science.abi6226>
- 158.** Goher, S. S., Ali, F., & Amin, M. (2022). The Delta variant mutations in the receptor binding domain of SARS-CoV-2 show enhanced electrostatic interactions with the ACE2. *Medical Drug Discovery*, 13, 100146. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2021.100114>

- 159.** Di Giacomo, S., Mercatelli, D., Rakhimov, A., & Giorgi, F. M. (2021). Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. *Journal of Medical Virology*, *93*(9), 5638–5643. <https://doi.org/10.1002/jmv.27062>
- 160.** Motozono, C., Toyoda, M., Zahradnik, J., Saito, A., Nasser, H., Tan, T. S., et al. (2021). SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host & Microbe*, *29*(7), 1124–1136.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.006>
- 161.** Chakraborty, S. (2021). Evolutionary and structural analysis elucidates mutations on SARS-CoV-2 spike protein with altered human ACE2 binding affinity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *534*, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.075>
- 162.** Verma, S., Patil, V. M., & Gupta, M. K. (2022). Mutation informatics: SARS-CoV-2 receptor-binding domain of the spike protein. *Drug Discovery Today*, *27*(5), 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.06.012>
- 163.** Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B. D., et al. (2020). SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Communications*, *11*(1), 6013. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19808-4>
- 164.** Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., Lokugamage, K. G., et al. (2021). Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, *592*(7852), 116–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>
- 165.** Gobeil, S. M. C., Janowska, K., McDowell, S., Mansouri, K., Parks, R., Manne, K., et al. (2021). D614G mutation alters SARS-CoV-2 spike conformation and enhances protease cleavage at the S1/S2 junction. *Cell Reports*, *34*(2), 108630. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108630>
- 166.** Dokainish, H. M., & Sugita, Y. (2023). Structural effects of spike protein D614G mutation in SARS-CoV-2. *Biophysical Journal*, *122*(14), 2910–2920. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.11.025>
- 167.** Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T. S., Imai, K., et al. (2021). SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nature Communications*, *12*(1), 846. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21118-2>
- 168.** Jeon, S., Ko, M., Lee, J., Choi, I., Byun, S. Y., Park, S., Shum, D., & Kim, S. (2020). Identification of antiviral drug candidates against SARS-CoV-2 from FDA-approved drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(7), e00819-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00819-20>
- 169.** Abreu, C., Ortega, C., Olivero-Deibe, N., Carrión, F., Gaete-Argel, A., Valiente-Echeverría, F., et al. (2023). Customizably designed multibodies neutralize SARS-CoV-2 in a variant-insensitive manner. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1052185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1226880>
- 170.** Zhang, J. H., Chung, T. D. Y., & Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*, *4*(2), 67–73. <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- 171.** Harris, C. J., Hill, R. D., Sheppard, D. W., & Slater, M. J. (2011). The design and application of target-focused compound libraries. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *14*(3), 252–266. <https://doi.org/10.2174/138620711795767802>
- 172.** Sheng, C., Dong, G., Miao, Z., Zhang, W., & Wang, W. (2015). State-of-the-art strategies for targeting protein-protein interactions by small-molecule inhibitors. *Chemical Society Reviews*, *44*(23), 8238–8259. <https://doi.org/10.1039/c5cs00252d>
- 173.** Unni, S., Aouti, S., Thiyagarajan, S., & Padmanabhan, B. (2020). Identification of a repurposed drug as an inhibitor of Spike protein of human coronavirus SARS-CoV-2 by

- computational methods. *Journal of Biosciences*, 45(1). <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00102-w>
- 174.** Shi, Y., Zeida, A., Edwards, C. E., Mallory, M. L., Sastre, S., Machado, R., et al. (2021). Thiol-based chemical probes exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 via allosteric disulfide disruption in the spike glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.2120419119>
- 175.** Ruatta, S. M., Prada Gori, D. N., Fló Díaz, M., Lorenzelli, F., Perelmuter, K., Alberca, L. N., et al. (2023). Garbage in, garbage out: How reliable training data improved a virtual screening approach against SARS-CoV-2 MPro. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1193282>
- 176.** Prada Gori, D. N., Ruatta, S., Fló, M., Alberca, L. N., Bellera, C. L., Park, S., et al. (2023). Drug repurposing screening validated by experimental assays identifies two clinical drugs targeting SARS-CoV-2 main protease. *Frontiers in Drug Discovery*, 2. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2022.1082065>
- 177.** Jeon, S., Ko, M., Lee, J., Choi, I., Byun, S. Y., Park, S., Shum, D., & Kim, S. (2020). Identification of antiviral drug candidates against SARS-CoV-2 from FDA-approved drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), e00819-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00819-20>
- 178.** Aguilera, E., Varela, J., Birriel, E., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., et al. (2016). Potent and selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: Inhibition of parasite growth through multitarget activity. *ChemMedChem*, 11(13), 1328–1338. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500385>
- 179.** Álvarez, G., Perdomo, C., Coronel, C., Aguilera, E., Varela, J., Aparicio, G., et al. (2017). Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecules*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050709>
- 180.** Aguilera, E. (2020). *Desarrollo preclínico de compuestos tripanosomicidas sin efectos tóxicos ni mutagénicos: Optimización de su actividad in vivo* [Tesis de doctorado, Universidad de la República, Facultad de Química]. Universidad de la República. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/32095>
- 181.** Aguilera, E. (2013). *Síntesis y evaluación biológica de productos activos frente a Trypanosoma cruzi con capacidad de inhibición de TcTIM* [Tesis de grado, Universidad de la República, Facultad de Ciencias]. Universidad de la República. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/1509>
- 182.** Amslinger, S. (2010). The tunable functionality of α,β -unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. *ChemMedChem*, 5(3), 351–356. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900499>
- 183.** Trombetta, D., Saija, A., Bisignano, G., Arena, S., Caruso, S., Mazzanti, G., Uccella, N., & Castelli, F. (2002). Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant α,β -unsaturated aldehydes. *Letters in Applied Microbiology*, 35(4), 285–290. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01190.x>
- 184.** Chu, H. W., Sethy, B., Hsieh, P. W., & Horng, J. T. (2021). Identification of potential drug targets of broad-spectrum inhibitors with a Michael acceptor moiety using shotgun proteomics. *Viruses*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/v13091756>
- 185.** Couto, M., Mastandrea, I., Cabrera, M., Cabral, P., Teixidor, F., & Cerecetto, H. (2017). Small-molecule kinase-inhibitors-loaded boron cluster as hybrid agents for glioma-cell-targeting therapy. *Chemistry - A European Journal*, 23(39), 9233–9238. <https://doi.org/10.1002/chem.201701965>

- 186.** Couto, M. (2019). *Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos organoboranos con uso en terapia antitumoral de glioblastoma por captura neutrónica de boro (10B)* [Tesis de doctorado, Universidad de la República, Facultad de Química]. Universidad de la República. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/32238>
- 187.** Couto, M., García, M. F., Alamón, C., Cabrera, M., Cabral, P., Merlino, A., et al. (2018). Discovery of potent EGFR inhibitors through the incorporation of a 3D-aromatic-boron-rich-cluster into the 4-anilinoquinazoline scaffold: Potential drugs for glioma treatment. *Chemistry*, *24*(13), 3122–3126. <https://doi.org/10.1002/chem.201705181>
- 188.** Dheer, D., Singh, V., & Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, *71*, 30–54. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.010>
- 189.** Couto, M., Alamón, C., Nievas, S., Perona, M., Dagrosa, M. A., Teixidor, F., et al. (2020). Bimodal therapeutic agents against glioblastoma, one of the most lethal forms of cancer. *Chemistry - A European Journal*, *26*(63), 14335–14340. <https://doi.org/10.1002/chem.202002963>
- 190.** Alamón, C., Dávila, B., García, M. F., Nievas, S., Dagrosa, M. A., Thorp, S., et al. (2023). A potential boron neutron capture therapy agent selectively suppresses high-grade glioma: In vitro and in vivo exploration. *Molecular Pharmaceutics*, *20*(5), 2702–2713. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00152>
- 191.** Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S., & Houghten, R. A. (2013). Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *18*(9–10), 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.01.008>
- 192.** Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H. D., et al. (2003). SARS—Beginning to understand a new virus. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(3), 209–218. <https://doi.org/10.1038/nrmicro775>
- 193.** Steiner, S., Kratzel, A., Barut, G. T., Lang, R. M., Aguiar Moreira, E., Thomann, L., et al. (2024). SARS-CoV-2 biology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *22*, 206–225. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>
- 194.** Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- 195.** Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, *369*(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- 196.** Deganutti, G., Prischi, F., & Reynolds, C. A. (2021). Supervised molecular dynamics for exploring the druggability of the SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *35*(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s10822-020-00356-4>

ANEXOS

Referencias Tabla A1

1. Wu, Y. S., Lin, W. H., Hsu, J. T. A., & Hsieh, H. P. (2006). Antiviral drug discovery against SARS-CoV. *Current Medicinal Chemistry*, 13(15), 2003-2020. <https://doi.org/10.2174/092986706777584988>
2. Rahman Oany, A., Mia, M., Pervin, T., Junaid, M., Zahid Hosen, S. M., Ali Moni, M., & others. (2020). Design of novel viral attachment inhibitors of the spike glycoprotein (S) of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) through virtual screening and dynamics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(5), 106177. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106177>
3. Kao, R. Y., Tsui, W. H. W., Lee, T. S. W., Tanner, J. A., Watt, R. M., Huang, J. D., & others. (2004). Identification of novel small-molecule inhibitors of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus by chemical genetics. *Chemistry & Biology*, 11(9), 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.07.006> <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.07.013>
4. Ghosh, A. K., Brindisi, M., Shahabi, D., Chapman, M. E., & Mesecar, A. D. (2020). Drug development and medicinal chemistry efforts toward SARS-coronavirus and COVID-19 therapeutics. *ChemMedChem*, 15(11), 907–932. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000223>
5. Kiran, G., Karthik, L., Shree Devi, M. S., Sathiyarajeswaran, P., Kanakavalli, K., Kumar, K. M., & others. (2022). In silico computational screening of Kabasura Kudineer—official Siddha formulation and JACOM against SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 13(1), 100327. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2020.05.009>
6. Yi, L., Li, Z., Yuan, K., Qu, X., Chen, J., Wang, G., & others. (2004). Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. *Journal of Virology*, 78(20), 11334–11339. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11334-11339.2004>
7. Basu, A., Sarkar, A., & Maulik, U. (2020). Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2. *Scientific Reports*, 10(1), 14754. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74715-4>
8. Tallei, T. E., Tumilaar, S. G., Niode, N. J., Fatimawali, Kepel, B. J., Idroes, R., & others. (2020). Potential of plant bioactive compounds as SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and spike (S) glycoprotein inhibitors: A molecular docking study. *Scientifica*, 2020, 2020, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2020/6307457>
9. Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., & others. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5), 766–788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>
10. Yang, Y., Islam, S., Wang, J., Li, Y., & Chen, X. (2020). Traditional Chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): A review and perspective. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1708–1717. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45538>
11. Ho, T. Y., Wu, S. L., Chen, J. C., Li, C. C., & Hsiang, C. Y. (2007). Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Research*, 74(2), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.014>
12. Zhou, Y., Hou, Y., Shen, J., Huang, Y., Martin, W., & Cheng, F. (2020). Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery*, 6(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0153-3>
13. Bibi, N., Gul, S., Ali, J., & Kamal, M. A. (2020). Viroinformatics approach to explore the inhibitory mechanism of existing drugs repurposed to fight against COVID-19. *European Journal of Pharmacology*, 885, 173420. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173496>
14. Marak, B. N., Dowarah, J., Khiangte, L., & Singh, V. P. (2021). Step toward repurposing drug discovery for COVID-19 therapeutics through in silico approach. *Drug Development Research*, 82(3), 374–392. <https://doi.org/10.1002/ddr.21757>

15. Sun, C., Zhang, J., Wei, J., Zheng, X., Zhao, X., Fang, Z., & others. (2021). Screening, simulation, and optimization design of small molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *PLoS One*, *16*(1), e0245975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245975>
16. Sohag, A. A. M., Hannan, M. A., Rahman, S., Hossain, M., Hasan, M., Khan, M. K., & others. (2020). Revisiting potential druggable targets against SARS-CoV-2 and repurposing therapeutics under preclinical study and clinical trials: A comprehensive review. *Drug Development Research*, *81*(7), 919–941. <https://doi.org/10.1002/ddr.21709>
17. Wang, X., Cao, R., Zhang, H., Liu, J., Xu, M., Hu, H., & others. (2020). The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discovery*, *6*, 28. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0169-8>
18. Shyr, Z. A., Gorshkov, K., Chen, C. Z., & Zheng, W. (2020). Drug discovery strategies for SARS-CoV-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *375*(1), 127–138. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000123>
19. Gulotta, M. R., Lombino, J., Perricone, U., De Simone, G., Mekni, N., De Rosa, M., Diana, P., & Padova, A. (2020). Targeting SARS-CoV-2 RBD interface: A supervised computational data-driven approach to identify potential modulators. *ChemMedChem*, *15*(20), 1921–1931. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000259>
20. Khodadadi, E., Maroufi, P., Khodadadi, E., Esposito, I., Ganbarov, K., Esposito, S., et al. (2020). Study of combining virtual screening and antiviral treatments of SARS-CoV-2 (COVID-19). *Microbial Pathogenesis*, *146*, 104238. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104241>
21. Rane, J. S., Pandey, P., Chatterjee, A., Khan, R., Kumar, A., Prakash, A., et al. (2021). Targeting virus-host interaction by novel pyrimidine derivative: An in silico approach towards discovery of potential drug against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(10), 3489–3501. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1794969>
22. Sehailia, M., & Chemat, S. (2020). Antimalarial-agent artemisinin and derivatives portray more potent binding to Lys353 and Lys31-binding hotspots of SARS-CoV-2 spike protein than hydroxychloroquine: Potential repurposing of arteminol for COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(11), 4182–4190. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796809>
23. Pandey, P., Rane, J. S., Chatterjee, A., Kumar, A., Khan, R., Prakash, A., et al. (2020). Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: An in silico study for drug development. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(10), 3789–3801. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796811>
24. Kalhor, H., Sadeghi, S., Abolhasani, H., Kalhor, R., & Rahimi, H. (2022). Repurposing of the approved small molecule drugs in order to inhibit SARS-CoV-2 S protein and human ACE2 interaction through virtual screening approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(3), 1299–1315. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1824816>
25. Rahman, F., Tabrez, S., Ali, R., Alqahtani, A. S., Ahmed, M. Z., & Rub, A. (2021). Molecular docking analysis of rutin reveals possible inhibition of SARS-CoV-2 vital proteins. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *11*(2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.01.006>
26. Kumari, A., Rajput, V. S., Nagpal, P., Kukrety, H., Grover, S., & Grover, A. (2022). Dual inhibition of SARS-CoV-2 spike and main protease through a repurposed drug, rutin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(11), 4987–4999. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1864476>
27. Bagheri, M., & Niavarani, A. (2022). Molecular dynamics analysis predicts ritonavir and naloxegol strongly block the SARS-CoV-2 spike protein-hACE2 binding. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(4), 1597–1606. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1846804>

28. Deshpande, R. R., Tiwari, A. P., Nyayanit, N., & Modak, M. (2020). In silico molecular docking analysis for repurposing therapeutics against multiple proteins from SARS-CoV-2. *European Journal of Pharmacology*, *886*, 173430. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173430>
29. Smith, M., & Smith, J. C. (2020). Repurposing therapeutics for COVID-19: Supercomputer-based docking to the SARS-CoV-2 viral spike protein and viral spike protein-human ACE2 interface. *ChemRxiv*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11871402.v4>
30. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., et al. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, *30*(3), 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
31. Mostafa, A., Kandeil, A., Elshaier, Y. A. M. M., Kutkat, O., Moatasim, Y., Rashad, A. A., et al. (2020). FDA-approved drugs with potent in vitro antiviral activity against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Pharmaceuticals*, *13*(12), 447. <https://doi.org/10.3390/ph13120443>
32. Yu, S., Zhu, Y., Xu, J., Yao, G., Zhang, P., Wang, M., et al. (2020). Glycyrrhizic acid exerts inhibitory activity against the spike protein of SARS-CoV-2. *Phytomedicine*, *85*, 153364. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153364>
33. Thurakkal, L., Singh, S., Roy, R., Kar, P., Sadhukhan, S., & Porel, M. (2021). An in-silico study on selected organosulfur compounds as potential drugs for SARS-CoV-2 infection via binding multiple drug targets. *Chemical Physics Letters*, *763*, 138209. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.138193>
34. Murugan, N. A., Kumar, S., Jeyakanthan, J., & Srivastava, V. (2020). Searching for target-specific and multi-targeting organics for COVID-19 in the Drugbank database with a double scoring approach. *Scientific Reports*, *10*(1), 19125. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75762-7>
35. Chen, H., & Du, Q. (2020). Potential natural compounds for preventing SARS-CoV-2 (2019-nCoV) infection. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202001.0358.v3>
36. Mouffouk, C., Mouffouk, S., Mouffouk, S., Hambaba, L., & Haba, H. (2021). Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS-CoV-2 proteases (3CLpro and PLpro), spike protein, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2). *European Journal of Pharmacology*, *891*, 173759. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173759>
37. Olaleye, O. A., Kaur, M., & Onyenaka, C. C. (2020). Ambroxol hydrochloride inhibits the interaction between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein's receptor-binding domain and recombinant ACE2. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.13.295691>
38. Bojadzic, D., Alcazar, O., Chen, J., Chuang, S. T., Condor Capcha, J. M., Shehadeh, L. A., et al. (2021). Small-molecule inhibitors of the coronavirus spike: ACE2 protein-protein interaction as blockers of viral attachment and entry for SARS-CoV-2. *ACS Infectious Diseases*, *7*(6), 1519–1534. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00070>
39. Day, C. J., Bailly, B., Guillon, P., Dirr, L., Jen, F.-E. C., Spillings, B. L., Mak, J., von Itzstein, M., Haselhorst, T., & Jennings, M. P. (2021). Multidisciplinary approaches identify compounds that bind to human ACE2 or SARS-CoV-2 spike protein as candidates to block SARS-CoV-2-ACE2 receptor interactions. *mBio*, *12*(2), e03681-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03681-20>
40. Kulkarni, S. A., Nagarajan, S. K., Ramesh, V., Palaniyandi, V., Selvam, S. P., & Madhavan, T. (2020). Computational evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Molecular Structure*, *1221*, 128823. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128823>
41. Durdagi, S., Orhan, M. D., Aksoydan, B., Calis, S., Dogan, B., Sahin, K., Shahraki, A., Birgül İyison, N., & Avsar, T. (2022). Screening of clinically approved and investigation drugs as potential inhibitors of SARS-CoV-2: A combined in silico and in vitro study. *Molecular Informatics*, *41*(2), 2100062. <https://doi.org/10.1002/minf.202100062>

42. Hanson, Q. M., Wilson, K. M., Shen, M., Itkin, Z., Eastman, R. T., Shinn, P., ... & Thomas, M. P. (2020). Targeting ACE2-RBD interaction as a platform for COVID-19 therapeutics: Development and drug-repurposing screen of an AlphaLISA proximity assay. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 3(6), 1352–1360. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00161>
43. Trezza, A., Iovinelli, D., Santucci, A., Prischi, F., Spiga, O., & Trezza, A. (2020). An integrated drug repurposing strategy for the rapid identification of potential SARS-CoV-2 viral inhibitors. *Scientific Reports*, 10, 13866. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70863-9>
44. Duzgunes, N., Sadiq, F., Lim, S. P., Veera Ravi, A., Alexpandi, R., Freire De Mesquita, J., ... & Bani, S. (2020). Quinolines-based SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp inhibitors and spike-RBD-ACE2 inhibitor for drug-repurposing against COVID-19: An in silico analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01796>
45. Wahedi, H. M., Ahmad, S., & Abbasi, S. W. (2021). Stilbene-based natural compounds as promising drug candidates against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3225–3234. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1762743>
46. Lin, C., Li, Y., Zhang, Y., Huang, M., Liu, C., Du, H., ... & Zhao, X. (2021). Ceftriaxone is a potential drug to inhibit SARS-CoV-2 infection in vitro by blocking spike protein–ACE2 interaction. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 198. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00619-y>
47. Bojadzic, D., Alcazar, O., & Buchwald, P. (2021). Methylene blue inhibits the SARS-CoV-2 spike–ACE2 protein-protein interaction—a mechanism that can contribute to its antiviral activity against COVID-19. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.600372>

Tabla A2

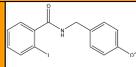
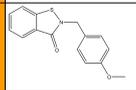
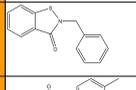
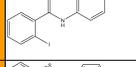
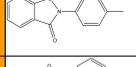
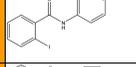
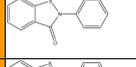
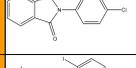
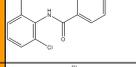
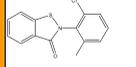
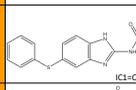
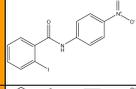
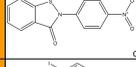
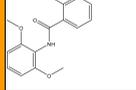
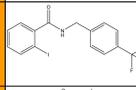
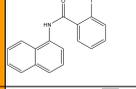
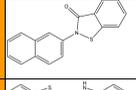
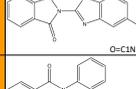
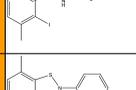
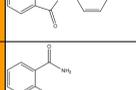
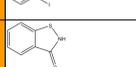
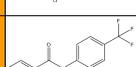
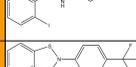
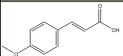
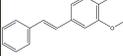
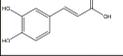
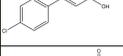
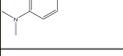
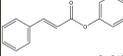
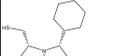
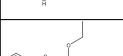
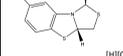
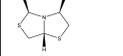
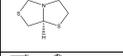
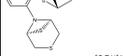
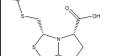
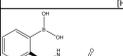
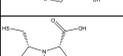
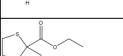
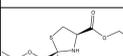
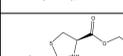
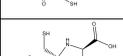
N° de compuesto	Estructura / SMILES	Actividad Inhibitoria (%) Epigentek Conc. Inicial = 100 µM	Actividad Inhibitoria (%) Adipogen Conc. Inicial = 20 µM	Actividad Inhibitoria (%) Ensayo celular HEK 293T/SD Conc. Inicial = 100 µM	CC50 (µM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
					A549	HT29	Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS		Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS	Método B IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS
Benzisotiazonas y precursores										
1	 <chem>IC1=CC=CC=C1C1NCC2=CC=C1(O)C=C2=O</chem>	84,2 ± 3,6	0 ± 0,4	34,9 ± 10,8	>100	>100	> 50 / > 50 / > 1		> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1
2	 <chem>O=C1N(C2=CC=C1(O)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	23,9 ± 3,0	8,6 ± 0,5							
3	 <chem>O=C1N(C2=CC=CC=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>		8,9 ± 1,3							
4	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	37,0 ± 12,3								
5	 <chem>O=C1N(C2=CC=C1)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	11,3 ± 1,2	0 ± 6,5							
6	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=CC=C2)C=C2=O</chem>	0 ± 14,3								
7	 <chem>O=C1N(C2=CC=CC=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>		14,7 ± 8,7							
8	 <chem>O=C1N(C2=CC=C1)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	83,9 ± 7,2	9,8 ± 6,3							
9	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	0 ± 13,1								
10	 <chem>O=C1N(C2=C1)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	32,8 ± 0,6								
11	 <chem>IC1=CC=CC=C1C1(NC2=NC3=C(C=CC1SC4=CC=CC=C4)E3)N2=O</chem>	7,5 ± 1,4								
12	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	18,2 ± 15,8								
13	 <chem>O=C1N(C2=CC=C1)N1(O)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	0,4 ± 6,5	14,5 ± 6,2							
14	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	31,0 ± 2,1								
15	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	22,5 ± 2,3								
16	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	30,2 ± 1,2								
17	 <chem>O=C1N(C2=CC=C1)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	38 ± 10,5								
18	 <chem>O=C1N(C2=NC3=C(C=CC1SC4=CC=CC=C4)E3)N2=O</chem>	2,2 ± 11,5								
19	 <chem>IC1=C(C)C=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	60,3 ± 3,0	7,7 ± 1,6	25,6 ± 5,1	>100	>100				
20	 <chem>O=C1N(C2=CC=CC=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	26,5 ± 8,7								
21	 <chem>IC1=CC=CC=C1(N)=O</chem>	0 ± 16,4								
22	 <chem>O=C1NSC2=CC=CC=C21</chem>		5,5 ± 2,0							
23	 <chem>IC1=CC=CC=C1(NC2=CC=C1)C=C2=O</chem>	27,5 ± 13,8								
24	 <chem>O=C1N(C2=CC=C1)C=C2)SC3=CC=CC=C31</chem>	63,1 ± 12,4	0 ± 0,6	26,9 ± 6,1						

Tabla A2

N° de compuesto	Estructura / SMILES	Actividad Inhibitoria (%) Epigentek Conc. Inicial = 100 µM	Actividad Inhibitoria (%) Adipogen Conc. Inicial = 20 µM	Actividad Inhibitoria (%) Ensayo celular HEK 293/RSD Conc. Inicial = 100 µM	CC50 (µM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
					A549	HT29	Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS		Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS	Método B IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS
90	 O=C/C=C/C1=CC=CC=C1O	10,5 ± 17,1								
91	 OC1=CC(OC)C=C1/C=C/C2=CC=CC=C2/C=C/C1	44,9 ± 10,1								
92	 OC1=CC(OC)C=C1/C=C/C(O)=C=C1	18,2 ± 1,6								
93	 OC1=CC=C(C=C1)O=C=C1	18,2 ± 3,3								
94	 OC1=CC=C(C=C1)O=C=C1	26,4 ± 9,8								
95	 O=C(OC1=CC=C(C1)C(=S)C=C1)C=C(C3=CC=CC=C3)	0,3 ± 11,3								
Bis-heterociclos y precursores										
96	 [H][C@@H]1OC[C@@H]1C3CCCC3N1[C@@H]1CS1C2	64,8 ± 9,4	35,6 ± 9,4	0 ± 3,1	>100	>100	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1	> 50 / > 50 / > 1
97	 SC1[C@H]1C(OCC)=O1SC2=C(C=CC=C2)N1	56,5 ± 12,4	31,6 ± 6,7	24,9 ± 1,2	>100	>100	-	37,3 / > 50 / > 1,34	36,9 / > 50 / > 1,4	
98	 [H][C@@H]12SC3=C(C=C(C(F)(F)F)C=C3)N1[C@@H]1CS1C=O1SC2	70 ± 13,9	17,5 ± 5,4							
99	 [H][C@H]12SC1[C@@H]1C(O)=O1N1[C@@H]1CS1C2	67,6 ± 17,5	7,4 ± 3,2							
100	 C1[C@@H]1CS1SC2=C(C=CC=C2)N1	64,4 ± 6,9	17,4 ± 1,6							
101	 [H][C@@H]12SC1[C@@H]1C(OCC)=O1N1[C@@H]1CS1C2	79,4 ± 5,8	9,5 ± 9,5							
102	 [C@@H]12SC1[C@@H]1N2C3=C(N4[C@@H]1S5C1C=CC=N3)S1C1	19,5 ± 16,3	20,1 ± 4,7							
103	 [H][C@@H]12SC1[C@@H]1C(O)=O1N1[C@@H]1CS1C=O1SC2	0,3 ± 3,5	26,3 ± 2,1							
104	 O=C(O)[C@@H]1C3[C@@H]1C2=CC=CC=C2B(O)O1N1	18,9 ± 19	11,6 ± 0,0							
105	 [H][C@@H]12SC1[C@@H]1C(O)=O1N1[C@@H]1CS1C2	7,3 ± 16,7								
106	 [H][C@@H]12SC1N1C1CS1C2	23,9 ± 12,2								
107	 SC1(C(OCC)=O)SCCN1	23,3 ± 3,8								
108	 SC1[C@H]1C(OCC)=O1SC[C@@H]1C(OCC)=O1N1	16,6 ± 6,5								
109	 SC1[C@@H]1C(OCC)=O1SC[C@@H]1C(OCC)=O1N1		10,5 ± 1,0							
110	 SC1[C@@H]1C(OCC)=O1SC1C1[C@@H]1C(O)=O1N1	18,5 ± 9,8								
111	 SC1[C@@H]1C(OCC)=O1SC[C@@H]1C(O)=O1N1		12,6 ± 1,0							

Carboranos

Tabla A2

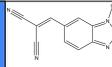
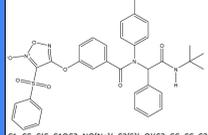
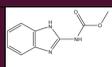
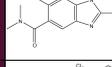
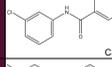
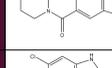
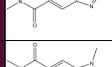
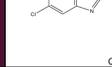
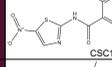
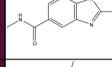
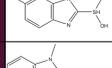
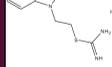
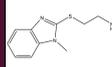
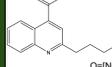
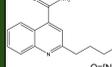
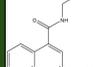
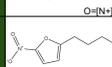
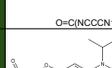
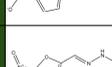
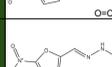
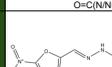
N° de compuesto	Estructura / SMILES	Actividad Inhibitoria (%) Epigentek Conc. Inicial = 100 µM	Actividad Inhibitoria (%) Adipogen Conc. Inicial = 20 µM	Actividad Inhibitoria (%) Ensayo celular HEK 293T/R5D Conc. Inicial = 100 µM	CC50 (µM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
					A549	HT29	Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS		Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS	Método B IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS
148	 [O][N]1=C2(C=C(C(=N)N)C(F)N)=C2=N1	54,3 ± 12,9								
149	 Cl=C=C(C=C1OC2=NO[NH]=C2[S](=O)(=O)(C3=Cc=CC=C3)O)[O]C(N(C(C(C(C)C)H)=O)C4=CC=CC=C4)C5=CC=C(C=C5)C)O	41,9 ± 1,8 Conc. Inicial 50 µM								
Benzimidazoles										
150	 O=C(O)C1=NC(C=CC=C2)=C2N1	31,3 ± 7,3 Conc. Inicial de 50 µM								
151	 CSC1=NC(C=O(C(N)C)O)C(C)C=C2N1	12,5 ± 9,6 Conc. Inicial de 50 µM								
152	 CSC1=NC(C=C(C)C(NC2=CC=CC(C)=C2)=O)C(C)C=C3N1	32,9 ± 10 Conc. Inicial de 50 µM								
153	 CSC1=NC(C=C(C)C(N2CC(C)C)C)C=C3N1	0 ± 5 Conc. Inicial de 50 µM								
154	 CSC1=NC(C=C(C)C(N)O)C(C)C=C2N1	0 ± 7,2 Conc. Inicial de 50 µM								
155	 CN1C2=C(C=C(C)C(O)O)=C2N=C1SCCN3C=CN=C3	0 ± 14,7 Conc. Inicial de 50 µM								
156	 CSC1=NC(C=C(C)C(NC2=CC=CC(C)=C2)N)C(C)C=C3N1	4,5 ± 2,2 Conc. Inicial de 50 µM								
157	 CSC1=NC(C=C(C)C(N)O)C(C)C=C2N1C	0 ± 11,2 Conc. Inicial de 50 µM								
158	 CS(O)C1=NC(C=CC(C)C)=C2N1C	9,9 ± 1,9 Conc. Inicial de 50 µM								
159	 S=C1N(C)C2=C(C=CC=C2)N1CCSC(N)=N.Cl	29,4 ± 7,3 Conc. Inicial de 50 µM								
160	 CN1C2=C(C=CC=C2)N=C1SCCN(C)=N	16,6 ± 4,1 Conc. Inicial de 50 µM								
Nitrofuranos										
161	 O=[N+](C1=CC=C(O)CCOC2=NC3=C(C=CC=C3C(O)=C2)[O-]	54,9 ± 1,0 Conc. Inicial de 5 µM	9,2 ± 12,5 Conc. Inicial de 1 µM							
162	 O=[N+](C1=CC=C(O)CCOC2=NC3=C(C=CC=C3C(O)=C2)[O-]	35 ± 2,2 Conc. Inicial de 5 µM								
163	 O=[N+](C1=CC=C(O)CCOC2=NC3=C(C=CC=C3C(O)=C2)[O-]	19,5 ± 8,3 Conc. Inicial de 5 µM								
164	 O=C(N)CCCN1C(O)C(C)C(C)C(C)C(N)C=C2N1	25,6 ± 10,5 Conc. Inicial de 5 µM								
165	 CC(N(C)N)=C2=C(C=C(N)O)C(S1=O)=O	0 ± 2,5 Conc. Inicial de 5 µM								
166	 O=C(N)N=C1=C(C=C(N)O)C2=CC=C(C(N)C3=C3)C=C2	0 ± 10,3 Conc. Inicial de 50 µM								
167	 O=C(N)N=C1=C(C=C(N)O)C2=CC=C(C(N)C(F)F)C3=C2	32,6 ± 13,3 Conc. Inicial de 50 µM								
168	 O=C(N)N=C1=C(C=C(N)O)C2=CC=C(C(N)C(F)F)C3=C2	0 ± 10,2 Conc. Inicial de 50 µM								
Alcaloides										

Tabla A2

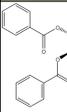
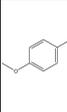
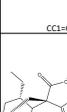
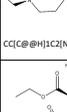
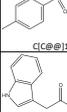
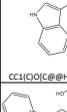
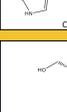
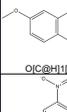
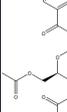
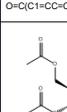
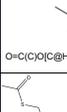
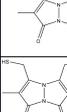
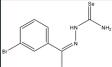
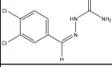
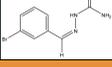
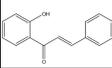
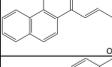
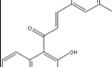
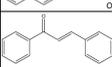
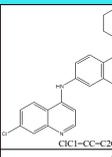
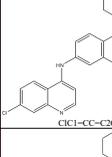
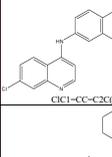
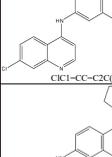
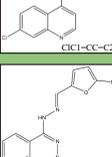
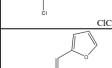
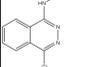
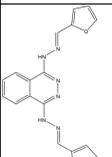
N° de compuesto	Estructura / SMILES	Actividad Inhibitoria (%) Epigentek Conc. Inicial = 100 µM	Actividad Inhibitoria (%) Adipogen Conc. Inicial = 20 µM	Actividad Inhibitoria (%) Ensayo celular HEK 293T/SD Conc. Inicial = 100 µM	CC50 (µM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
					A549	HT29	Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS		Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS	Método B IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS
169	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC(C2=CC=CC=C2)O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1O[C@H]1O</chem>		24,7 ± 1,6							
170	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		0 ± 9,6							
171	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>	53,8 ± 16	50,0 ± 5,8	41,2 ± 2,1	27,2	< 100				
172	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		16,3 ± 1,6							
173	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		34,2 ± 4,7							
174	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		13,7 ± 1,0							
Glucósidos y precursores										
175	 <chem>O=C(H)1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		9,1 ± 5,5							
176	 <chem>O=C(H)1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		17 ± 12,6							
177	 <chem>O=C(H)1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		21,1 ± 5,3							
178	 <chem>O=C1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		0 ± 9,0							
179	 <chem>O=C1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		75,7 ± 1			38,8				
180	 <chem>O=C1C=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2O[C@@H](OC1C=CC=CC=C1O)[C@H]1C=C(C=C1)OC1O</chem>		16 ± 2,4			>100				

Tabla A2

N° de compuesto	Estructura / SMILES	Actividad Inhibitoria (%) Epigentek Conc. Inicial = 100 µM	Actividad Inhibitoria (%) Adipogen Conc. Inicial = 20 µM	Actividad Inhibitoria (%) Ensayo celular HEK 293/RSD Conc. Inicial = 100 µM	CC50 (µM)		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 1		ENSAYO ANTIVIRAL Experimento 2	
					A549	HT29	Método A		Método A IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS	Método B IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS
							IC50 SARS-CoV-2 (µM) / CC50 (µM) / IS			
226	 <chem>[Se]=C(N/N=C(C)C1=CC=CC(Br)=C1)N</chem>	0 ± 5,5	12,6 ± 1,0							
227	 <chem>[Se]=C(N/N=C(H)C1=CC=C(Cl)C(Cl)=C1)N</chem>	0 ± 6,6								
228	 <chem>[Se]=C(N/N=C(H)C1=CC=CC(Br)=C1)N</chem>	17 ± 4,5								
Chalconas										
229	 <chem>O=C(C=C(C)C1=CC=CC(O)=C1)C2=CC=CC=C2O</chem>	25,2 ± 11,5								
230	 <chem>O=C1=C(C=C(C)C1=CC=CC(O)=C1)C2=CC=CC=C2</chem>		17,4 ± 0,5							
231	 <chem>O=C(C1=CC=CC=C1)C2=CC=CC=C2</chem>		4,7 ± 2,6							
232	 <chem>C=C(C)C=C(C)C1=CC=CC(O)=C1</chem>	0 ± 5,8 Conc. inicial 50 µM	51,0 ± 2,3 Conc. inicial 10 µM	0 ± 2,2 Conc. inicial 50 µM	>100	>100			33,3 / 30,2 / 1	> 50 / > 50 / > 1
Quinolinas										
233	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>			14,8 ± 1,6 Conc. inicial de 5 µM						
234	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>	88,4 ± 9,8	18,3 ± 5,4							
235	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>	17,1 ± 5,6 Conc. inicial de 25 µM	17,0 ± 3,0 Conc. inicial de 5 µM							
236	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>	31,9 ± 11,8 Conc. inicial de 6,25 µM	0 ± 8,3 Conc. inicial de 1,25 µM							
237	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>	47,6 ± 3,5	3,1 ± 4,7							
Benzodiazinas (Quinazolinas y Ftalazinas)										
238	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>		24,2 ± 5,9							
239	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>		7,0 ± 3,0							
240	 <chem>C1=CC=C2C(N=CC2=CC=C1)C3=CC=CC=C3</chem>		7,7 ± 5,2							

