



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Identificación y caracterización de nuevos inhibidores de las proteasas de SARS-CoV-2 con actividad antiviral

Jonathan Patricio Bastidas Ormaza

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Biología de la Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Julio 2026

**Identificación y caracterización de nuevos inhibidores de las proteasas
de SARS-CoV-2 con actividad antiviral**

Tribunal:

Dra. Gabriela Maggioli (presidenta)

Dra. Natalia Ruétalo

Dr. Leonardo Santos

Andrea Medeiros, Directora

Martín Fló, Co-Director

Marcelo Comini, Co-Director

**Identificación y caracterización de nuevos inhibidores de las proteasas
de SARS-CoV-2 con actividad antiviral**

Jonathan Patricio Bastidas Ormaza, Mag.

Programa de Posgrado en Biología de la Facultad de Ciencias

Universidad de la República

2026

DIRECTORES: Andrea Medeiros^{1,2}, Martín Fló^{3,4} y Marcelo Comini²

**1 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de
la República**

**2 Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de
Montevideo**

3 Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo

**4 Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad
de la República**

RESUMEN

La pandemia de la COVID-19 puso en evidencia la falta de investigación y desarrollo en el área de quimioterapia contra las enfermedades virales respiratorias agudas. Desde el inicio de la misma, las proteasas de SARS-CoV-2, MPro y PLPro, despertaron interés como dianas terapéuticas por su esencialidad para la replicación viral. Una campaña de cribado virtual y experimental llevada a cabo por nuestro grupo de investigación en conjunto con un gran número de colaboradores identificó una diversidad de compuestos químicos con capacidad de inhibir estas enzimas. Nutrido de estos antecedentes y con el objetivo de ampliar y profundizar los hallazgos, esta tesis abordó el tamizaje experimental contra la MPro de un número significativo de compuestos que no habían sido estudiados previamente (433 moléculas), la caracterización de la selectividad y modo de inhibición de la MPro de una selección de *hits*, la evaluación de la actividad biológica (citotoxicidad sobre célula huésped y actividad antiviral) de los nuevos *hits*, y la optimización de condiciones para obtener cristales de complejos MPro-inhibidor.

El cribado no sesgado confirmó la robustez de los algoritmos de predicción de *hits* implementados en la anterior campaña de tamizaje *in silico*, ya que se obtuvo una tasa de falsos negativos del 2,2%. Los 17 nuevos *hits* identificados (tasa de éxito del 4,2%) pertenecen a cinco novedosos andamios estructurales: pirazolopirimidinas, complejos organometálicos de rutenio, dehidropiranona, rotenoides y naftoquinonas. Uno de ellos, una dehidropiranona iodada, se destacó por su potente y selectiva actividad inhibitoria sobre MPro ($CI_{50} = 0,2 \mu M$). Para los *hits* de la MPro de cada serie, las pirazolopirimidinas, los complejos de rutenio y las naftoquinonas mostraron mayor selectividad contra esta proteasa que contra la PLPro, mientras que lo inverso aplica para las rotenoides.

Excepto por las naftoquinonas, el resto de los *hits* de la MPro mostró una nula o baja citotoxicidad sobre células de epitelio pulmonar y renal a concentraciones $\geq 50 \mu M$. Al menos dos *hits* demostraron tener actividad antiviral (un complejo de Ru y una naftoquinona) en el mismo orden de potencia (dos dígitos μM) que fármacos de referencia ensayados, aunque con un índice de selectividad comprometido (IS 1,2 y $>1,4$, respectivamente).

La caracterización del modo de inhibición sobre la MPro de un par de *hits* de distintas familias químicas y con probada actividad anti-SARS-CoV-2 (una

naftoquinona y un derivado del Ebsulfur) mediante ensayos bioquímicos y biofísicos reveló una inhibición covalente y reversible que involucra a residuos de cisteína.

Finalmente, si bien se logró cristalizar con éxito la forma libre de la MPro, no fue posible obtener cristales de complejos proteasa-inhibidor. Esto puede deberse a la baja afinidad y/o labilidad de los enlaces reversibles establecidos por algunos inhibidores, lo cual propicia su exclusión molecular durante la cristalogénesis.

En conclusión, esta investigación caracterizó nuevos *scaffolds* químicos con potencia inhibitoria moderada frente a las proteasas MPro y PLPro, así como en modelos de infección celular por SARS-CoV-2, dilucidando mecanismos de inhibición reversibles y perfiles de citotoxicidad que ofrecen un punto de partida estratégico para el desarrollo racional de moléculas con actividad anti-SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic highlighted the lack of research and development in the field of chemotherapy against acute respiratory viral diseases. Since its onset, the SARS-CoV-2 proteases, MPro and PLPro, have attracted interest as therapeutic targets due to their essential role in viral replication. A virtual and experimental screening campaign conducted by our research group, in collaboration with a large number of partners, identified a variety of chemical compounds capable of inhibiting these enzymes. Building upon this background and aiming to expand and deepen these findings, this thesis addressed the experimental screening against MPro of a significant number of previously unstudied compounds (433 molecules), the characterization of the selectivity and mode of MPro inhibition of a selection of hits, the evaluation of the biological activity (host cell cytotoxicity and antiviral activity) of the new hits, and the optimization of conditions to obtain crystals of MPro-inhibitor complexes.

The unbiased screening confirmed the robustness of the hit prediction algorithms implemented in the previous *silico* screening campaign, yielding a false-negative rate of 2.2%. The 17 new hits identified (hit-ratio = 4.2%) belong to five novel structural scaffolds: pyrazolopyrimidines, ruthenium organometallic complexes, dehydropyranones, rotenoids, and naphthoquinones. One of these, an iodinated dehydropyranone, stood out for its potent and selective inhibitory activity against MPro ($IC_{50} = 0.2 \mu M$). Among the MPro hits from each series, pyrazolopyrimidines, ruthenium complexes, and naphthoquinones showed selectivity against this protease rather than toward PLPro, whereas the inverse applied to the rotenoids.

Except for the naphthoquinones, the remaining MPro hits showed null or low cytotoxicity on pulmonary and renal epithelial cells at concentrations $\geq 50 \mu M$. At least two hits demonstrated antiviral activity (a Ru complex and a naphthoquinone) in the same order of potency (double-digit μM) as the reference drugs tested, albeit with a compromised selectivity index (SI 1.2 and > 1.4 , respectively).

The characterization of the MPro inhibition mode of a pair of hits from different chemical families with proven anti-SARS-CoV-2 activity (a naphthoquinone and an Ebsulfur derivative) through biochemical and biophysical assays revealed a reversible covalent inhibition involving cysteine residues.

Finally, although the free form of MPro was successfully crystallized, it was not possible to obtain crystals of protease-inhibitor complexes. This may be due to the low affinity and/or lability of the reversible bonds established by some inhibitors, which promotes their molecular exclusion during crystallogenesis.

In conclusion, this research characterized new chemical scaffolds with moderate inhibitory potency against the molecular targets and the virus, elucidating reversible inhibition mechanisms and cytotoxicity profiles that offer a strategic starting point for the rational development of molecules with anti-SARS-CoV-2 activity.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iv
GLOSARIO	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)	
1	
1.1.1. Generalidades del virus y la enfermedad	1
1.1.2. Estructura viral	3
1.1.3. Ciclo replicativo	4
1.2 Blancos terapéuticos y desarrollo de antivirales.....	7
1.2.1. Proteasas del SARS-CoV-2.....	10
1.2.2. Proteasa Principal del SARS-CoV-2 (MPro o 3CLPro).....	12
1.2.3. Proteasa similar a papaína (PLPro)	13
1.3 Estrategias de cribado para el descubrimiento de fármacos	15
1.3.1. Enfoques asistidos por computadora (CADD).....	17
1.3.2. Cribado virtual basado en estructura y basado en ligandos	19
1.3.3. Búsqueda de inhibidores de la MPro y la PLPro	20
1.4 Antecedentes del laboratorio en la búsqueda de inhibidores contra SARS-CoV-2.....	22
1.5 Hipótesis.....	26
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo general	26
2.2 Objetivos específicos	26
2.2.1. Objetivo específico I	26
2.2.2. Objetivo específico II	27
2.2.3. Objetivo específico III	27
2.2.4. Objetivo específico IV	27

3. METODOLOGÍA.....	28
3.1 Expresión y purificación de la MPro y la PLPro recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	28
3.1.1. Vectores de expresión de proteasas virales y transformación química de bacterias quimio-competentes	28
3.1.2. Expresión de la forma recombinante de la MPro.....	29
3.1.3. Purificación de la forma recombinante de MPro.....	30
3.1.4. Expresión de la forma recombinante de la PLPro	32
3.1.5. Purificación de la forma recombinante de la PLPro.....	33
3.2 Cuantificación de la forma recombinante de la MPro y la PLPro	34
3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	34
3.4 Preparación de muestras de compuestos químicos.....	35
3.5 Ensayos de actividad enzimática y cribado de inhibidores	36
3.5.1. Ensayo de actividad enzimática para la MPro.....	36
3.5.2. Determinación de los parámetros cinéticos de la MPro.....	36
3.5.3. Ensayo de cribado de inhibidores	37
3.5.4. Ensayo de actividad enzimática para la PLPro	38
3.5.5. Determinación de la CI_{50} para los <i>hits</i> de la MPro y la PLPro.....	39
3.6 Caracterización del mecanismo de inhibición de la MPro	40
3.6.1. Ensayo de reversibilidad de la inhibición de MPro	40
3.6.2. Ensayo de reversibilidad de inhibición de la MPro mediada por DTT40	
3.7 Análisis de espectrometría de masas (LC-MS)	42
3.7.1. Preparación y digestión de la muestra	42
3.7.2. Análisis cromatográfico y espectrometría de masas (LC-MS/MS)	43
3.7.3. Procesamiento de datos e identificación de péptidos.....	44
3.8 Ensayos de cristalización y difracción de Rayos X de complejos MPro-inhibidor	45
3.8.1. Ensayos de co-cristalización y optimización	45
3.8.2. Recolección de datos y resolución estructural	46

3.9	Determinación de la citotoxicidad de los <i>hits</i>	46
3.10	Ensayo de actividad anti-SARS-CoV-2 y citotoxicidad en células Vero	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1	Expresión y purificación de las proteasas recombinantes MPro y PLPro de SARS-CoV-2.....	51
4.1.1.	Proteasa Principal (MPro).....	51
4.1.2.	Proteasa similar a la papaína (PLPro)	55
4.2	Validación de los ensayos para el cribado enzimático de compuestos contra la MPro y la PLPro.....	58
4.3	Cribado experimental de quimioteca	63
4.3.1.	Identificación de inhibidores de MPro de SARS-CoV-2.....	63
4.3.2.	Análisis estructural de los <i>hits</i> provenientes del tamizaje computacional	67
4.3.3.	Análisis estructural de los <i>hits</i> excluidos del modelo <i>in silico</i>	74
4.3.4.	Evaluación de actividad inhibitoria cruzada sobre la PLPro de <i>hits</i> de la MPro	83
4.3.5.	Análisis retrospectivo y validación del cribado empírico frente a modelos <i>in silico</i>	86
4.4	Tamizaje familia-específico de derivados de naftoquinonas.....	89
4.4.1.	Evaluación de la actividad inhibitoria de las naftoquinonas frente a la proteasa PLPro	94
4.5	Caracterización del mecanismo de inhibición de los compuestos seleccionados	96
4.5.1.	Evaluación de la reversibilidad de inhibición de CEQ-6 de la MPro.....	96
4.5.2.	Evaluación de la reactividad del compuesto CEQ-6 frente a tioles en presencia de ditioneitol (DTT)	100
4.5.3.	Identificación del sitio de modificación covalente mediante mapeo peptídico (LC-MS)	103
4.5.4.	Ensayos de cristalización y aproximación estructural de los complejos MPro-inhibidor.....	109

4.6	Evaluación biológica de los <i>hits</i>	113
4.6.1.	Determinación de la citotoxicidad de los <i>hits</i> en células A549	114
4.6.2.	Evaluación de la actividad antiviral y citotoxicidad sobre células Vero.	123
5	CONCLUSIONES	132
6	PERSPECTIVAS	136
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
8	ANEXOS	I
8.1.	Vector de expresión de la MPro	I
8.2.	Vector de expresión de la PLPro	II
8.3.	Curva de calibración de SEC	III
8.4.	Curvas dosis-respuesta de rotenoides	IV
8.5.	Curvas dosis-respuesta de pirazolopiridopirimidinas	V
8.6.	Curvas dosis-respuesta de complejos organometálicos	VI
8.7.	Curvas dosis-respuesta de los <i>singletons</i>	VII
8.8.	Curvas dosis-respuesta de los <i>hits</i> de la PLPro	VIII
8.9.	Curvas dosis-respuesta de las naftoquinonas	IX
8.10.	Curvas dosis-respuesta de las naftoquinonas frente a la PLPro	X
8.11.	Mapa de cobertura de la MPro	XI
8.12.	Mapa de cobertura de la MPro en presencia de DTT	XII

GLOSARIO

2YT	doble extracto de levadura-triptona
A280	Absorbancia a 280 nm
ACN	acetonitrilo
AF	ácido fórmico
AMBIC	Bicarbonato de amonio
AMC	7-amino-4-metilcumarina
BSL-3	Nivel de Bioseguridad 3 (inglés: <i>Biosafety Level 3</i>)
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media (50%)
cm	centímetros
Dabcyl	ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico
Da	Daltons
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DO ₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EbSe	Ebselen
Edans	(ácido 5-((2 Aminoetil)amino)naftaleno-1-sulfónico)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés <i>Food and Drugs Administration</i>)
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas rápida (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
<i>g</i>	fuerza centrífuga
g	gramos
IAM	yodoacetamida
IMAC	Cromatografía de Afinidad de Metales Inmovilizados (del inglés <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido

KDCA	Agencia para el Control y Prevención de Enfermedades de Corea (del inglés <i>Korean Disease Control and Prevention Agency</i>)
kV	kilovoltio
LB	Luria-Bertani
M	concentración molar (moles por litro)
mA	miliamperios
mg/mL	miligramos por mililitro
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MOI	Multiplicidad de Infección (del inglés <i>Multiplicity Of Infection</i>)
MPro	<i>Main Protease</i> (por sus siglas en inglés)
ng	nanogramos
nL/min	nanolitros por minutos
nM	nanomolar
NSP	<i>Non-Structural Protein</i> (por sus siglas en inglés)
Pen-Strep	Penicilina-Estreptomicina
PLPro	<i>Papain-Like Protease</i> (por sus siglas en inglés)
rpm	revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia
°C	grados centígrados
WST-1	Tetrazolio 1 hidrosoluble (del inglés <i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>)
µg/L	microgramos por litro
µL	microlitros
µM	micromolar
ppm	partes por millón

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)

1.1.1. Generalidades del virus y la enfermedad

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) es el agente etiológico de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y responsable de la pandemia iniciada a finales de 2019. Su rápida propagación a escala mundial provocó una de las crisis sanitarias más importantes desde la pandemia de gripe española de 1918, causada por influenza A (H1N1)¹ y asociada a millones de muertes y a un profundo impacto sanitario, social y económico². Históricamente, los coronavirus humanos se asociaban principalmente con patologías respiratorias leves y de carácter endémico causadas por las cepas HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1³⁻⁶. Sin embargo, en las últimas dos décadas, a partir de distintos eventos de “salto inter-especies” de coronavirus zoonóticos altamente patógenos se generaron brotes epidémicos de gran severidad. Entre ellos se destacan: el síndrome respiratorio agudo severo, causado por SARS-CoV e identificado en 2003, el síndrome respiratorio de Oriente Medio, causado por MERS-CoV y detectado en 2012, y, más recientemente, la pandemia de COVID-19, causada por SARS-CoV-2. Estos antecedentes evidencian el potencial epidémico de los coronavirus zoonóticos en la actualidad.

En este contexto, el SARS-CoV-2 emergió como el tercer coronavirus humano altamente patógeno del siglo XXI. Los primeros brotes de esta infección se identificaron en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China⁷. Los análisis genómicos demostraron que este virus, de manera análoga al SARS-CoV y al MERS-CoV, posee un origen zoonótico. El genoma de SARS-CoV-2 presenta un 96% de identidad con coronavirus aislados en murciélagos, señalando a estos quirópteros como el reservorio natural más probable previo a la adaptación y transmisión hacia la especie humana⁸.

En comparación con los coronavirus zoonóticos emergentes previos, SARS-CoV y MERS-CoV, el SARS-CoV-2 exhibió una capacidad de transmisión interhumana significativamente mayor. Esta propagación acelerada llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar el brote como una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional el 30 de enero de

2020, y posteriormente a caracterizar la situación como una pandemia el 11 de marzo de 2020⁹. A nivel global, se han documentado formalmente más de 779 millones de infecciones y sobrepasado los 7 millones de fallecimientos. Sin embargo, es pertinente destacar que la disminución en la vigilancia epidemiológica exhaustiva a lo largo del tiempo implica un subregistro, por lo que la verdadera magnitud de la morbilidad y mortalidad provocada por el virus podría ser mayor¹⁰.

Aunque las manifestaciones clínicas iniciales de esta patología sugirieron una afección predominantemente respiratoria, la evidencia científica actual confirma que la COVID-19 es una enfermedad sistémica y compleja^{11,12}. Esta afectación multiorgánica se produce mediante un mecanismo dual: por un lado, la infección viral directa de células extrapulmonares que expresan los receptores de entrada viral y, por otro, las consecuencias indirectas de una respuesta inmunológica sistémica desregulada, impactando de forma sinérgica en sistemas vitales como el cardiovascular, renal, gastrointestinal y el sistema nervioso central y periférico¹¹⁻¹³.

Un factor determinante en la gravedad de la enfermedad es la desregulación severa de la respuesta inmunitaria del huésped^{11,12}. Durante la infección, el organismo puede desencadenar una hiperinflamación conocida como "tormenta de citoquinas", la cual se caracteriza por la liberación descontrolada y excesiva de mediadores proinflamatorios, particularmente la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-1 beta (IL-1 β)¹²⁻¹⁴. Esta respuesta inmunitaria exacerbada induce daño tisular profundo, propicia el desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), altera la permeabilidad vascular y puede culminar en disfunción y fallo multiorgánico letal¹¹⁻¹³.

Si bien la fase de emergencia sanitaria internacional finalizó en mayo de 2023, SARS-CoV-2 continúa circulando en la población humana y permanece bajo vigilancia epidemiológica y genómica a nivel global. Su persistencia, favorecida por la transmisión durante infecciones asintomáticas o presintomáticas, así como por la emergencia sucesiva de variantes con diferente transmisibilidad, antigenicidad o capacidad de evasión inmunológica, subraya la necesidad de mantener estrategias de vigilancia y estudio continuo. Esta necesidad resulta particularmente importante para la protección de los grupos de

alto riesgo (tales como adultos mayores, pacientes inmunocomprometidos o individuos con comorbilidades subyacentes), quienes continúan siendo vulnerables a desarrollar cuadros clínicos severos y desenlaces fatales a pesar de la inmunidad poblacional preexistente. En este contexto, comprender la biología celular de la infección y la interacción huésped-patógeno constituye un aspecto fundamental para guiar el diseño racional de intervenciones terapéuticas (antivirales eficaces y vacunas actualizadas) e implementar estrategias de control y contención a mediano y largo plazo.^{2,11–13}.

1.1.2. Estructura viral

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto perteneciente a la familia *Coronaviridae*^{15,16}. Su genoma de ARN es de cadena simple y polaridad positiva (ssRNA+) con una longitud aproximada de 30.000 nucleótidos (**Figura 1**), destacando por poseer uno de los genomas más extensos conocidos entre los virus de ARN¹⁵. La secuencia de este genoma codifica un total de 29 proteínas: 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16), 9 proteínas accesorias y 4 proteínas estructurales (S, M, E y N)¹⁷. Alrededor de dos tercios del material genético corresponden a los marcos de lectura abiertos ORF1a y ORF1ab, los cuales dirigen la traducción de dos grandes poliproteínas superpuestas: pp1a y pp1ab, respectivamente.

La síntesis de pp1ab requiere de un mecanismo de cambio de marco de lectura durante la traducción ribosomal. Para adquirir su funcionalidad, ambas poliproteínas deben ser procesadas proteolíticamente por dos proteasas virales: la proteasa similar a papaína (PLPro, correspondiente a nsp3) y la proteasa principal (MPro o 3CLPro, correspondiente a nsp5). Esta escisión libera las proteínas no estructurales maduras que se ensamblan para conformar el complejo de replicación-transcripción viral indispensable para la síntesis de ARN, además de participar en la evasión inmunogénica^{16,17}. El tercio restante del genoma codifica las cuatro proteínas estructurales y las accesorias, cuyas características y funciones moleculares son fundamentales para la viabilidad y transmisión del virión.

La arquitectura de la partícula está definida por cuatro proteínas estructurales principales: la glicoproteína Spike (S), encargada de mediar la entrada a la célula huésped; las proteínas de membrana (M) y envoltura (E), fundamentales para el

ensamblaje de la envoltura viral; y la proteína de la nucleocápside (N), responsable de empaquetar y proteger el ARN genómico^{15,16,18,19}. Aunque estas proteínas son esenciales para la viabilidad de la partícula viral, el ciclo intracelular y posterior replicación dependen críticamente de las proteínas no estructurales generadas tras el procesamiento proteolítico mediado por las enzimas virales.

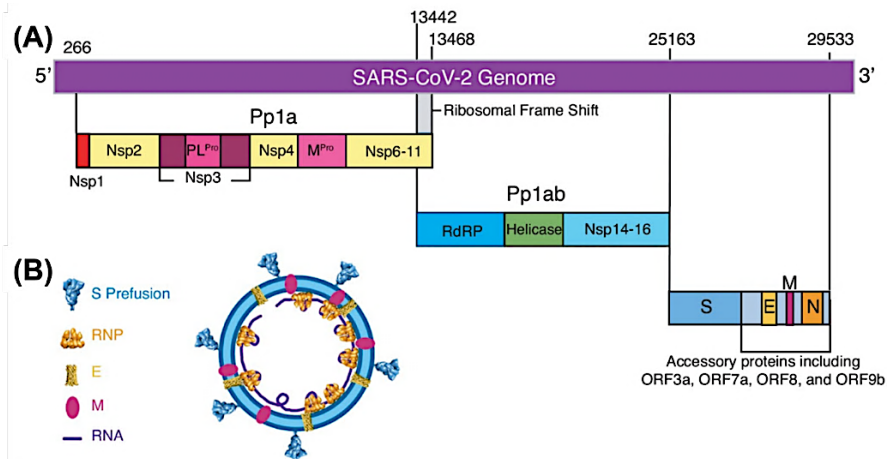


Figura 1. Organización del SARS-CoV-2. (A) Organización genómica general del SARS-CoV-2. Las proteínas no estructurales Nsp1-16 se expresan como poliproteínas pp1a y pp1ab y son escindidas por las proteasas MPro y PLPro. Los números ubicados en la parte superior del esquema indican las posiciones nucleotídicas relativas al genoma viral, resaltando los sitios de inicio y terminación de los principales genes del virus. Las proteínas estructurales S, E, M y N están codificadas por secuencias que se intercalan con otros codificantes para proteínas accesorias que incluyen el ORF3a. (B) Modelo esquemático del virión del SARS-CoV-2 con las proteínas estructurales indicadas. Figura modificada de Hardenbrook y Zhang²⁰.

1.1.3. Ciclo replicativo

El ciclo de vida del SARS-CoV-2 es un proceso que puede dividirse en cuatro fases principales: entrada, replicación, transcripción y liberación.

1.1.3.1. Fase de entrada e internalización

El ciclo de infección se inicia cuando el dominio de unión al receptor (RBD), localizado en la subunidad S1 de la proteína Spike (S) viral, se adhiere con alta especificidad y afinidad a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la superficie de la célula hospedera^{19,21} (**Figura 2**). Una característica molecular

clave de SARS-CoV-2, asociada a una mayor eficiencia de entrada celular, es la presencia de un sitio de escisión específico para la furina, endoproteasa de serina de la célula huésped, que se ubica entre las subunidades S1 y S2 de la proteína S. El procesamiento por furina ocurre durante la maduración de la partícula viral, antes de la interacción del RBD con ACE2, y conlleva a la preactivación de la proteína S^{21,22}.

Posterior a la unión con ACE2, la proteína S sufre un segundo procesamiento proteolítico mediado por proteasas del huésped. Dependiendo de la vía de entrada, este proceso es catalizado por la serin-proteasa de transmembrana 2 (TMPRSS2) en la superficie celular, o por las catepsinas lisosomales si la internalización ocurre mediante la vía endosómica^{19,23}. Esta escisión expone la subunidad S2, la cual experimenta cambios conformacionales drásticos (mediados por sus regiones de repetición de heptada HR1 y HR2) que culminan en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática o endosómica, liberando así el genoma de ARN viral directamente en el citoplasma^{21,23}.

1.1.3.2. Replicación y procesamiento proteolítico

Dado que el genoma del SARS-CoV-2 es un ARN de cadena simple y polaridad positiva (ssRNA+), una vez en el citoplasma funciona directamente como ARN mensajero (ARNm) para la maquinaria ribosómica del huésped. Esto resulta en la traducción inicial de las dos grandes poliproteínas: pp1a y pp1ab²⁴.

En esta etapa, intervienen de manera crítica dos proteasas codificadas por el propio virus: la proteasa similar a la papaína (PLPro o nsp3)²⁵ y la proteasa principal (MPro, 3CLpro o nsp5)²⁶. Estas enzimas escinden las poliproteínas para liberar 16 proteínas no estructurales (nsp) funcionales²⁴⁻²⁶. Varias de estas nsp se organizan para conformar el complejo de replicación-transcripción (RTC), un andamiaje enzimático esencial que incluye, entre otras, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp o nsp12), la helicasa (nsp13) y la exorribonucleasa (ExoN o nsp14), la cual aporta una inusual capacidad de corrección de pruebas para garantizar la estabilidad del extenso genoma viral^{24,27}. El RTC cataliza primero la síntesis de un ARN de cadena complementaria (sentido negativo), el cual sirve como molde bidireccional: tanto para la síntesis de nuevos genomas completos de sentido positivo, como para la transcripción de una serie de ARNm subgenómicos más cortos^{24,27}.

1.1.3.3. Ensamblaje, gemación y liberación

Los ARNm subgenómicos se utilizan para la traducción de las cuatro proteínas estructurales principales (S, M, E y N) y diversas proteínas accesorias. Las proteínas estructurales de envoltura (S, M y E) son dirigidas hacia el retículo endoplásmico (RE) y posteriormente al compartimento intermedio del retículo endoplásmico-aparato de Golgi (ERGIC), donde se anclan a las membranas lipídicas^{24,28} (**Figura 2**).

De forma simultánea, la proteína de la nucleocápside (N) se une de manera estrecha a las copias recién sintetizadas del ARN genómico en el citoplasma, formando un complejo ribonucleoproteico estable. Luego, se desarrolla el ensamblaje final cuando este complejo de nucleocápside interactúa con las proteínas de membrana en el ERGIC, induciendo un proceso de gemación hacia el interior de las vesículas intracelulares mediante el cual el virus adquiere su envoltura lipídica madura^{24,28}.

Finalmente, en la fase de liberación, estas vesículas cargadas de nuevos viriones migran hacia la superficie celular y se fusionan con la membrana plasmática, liberando los viriones infecciosos al espacio extracelular mediante exocitosis para propagar la infección a células vecinas^{24,28} (**Figura 2**).

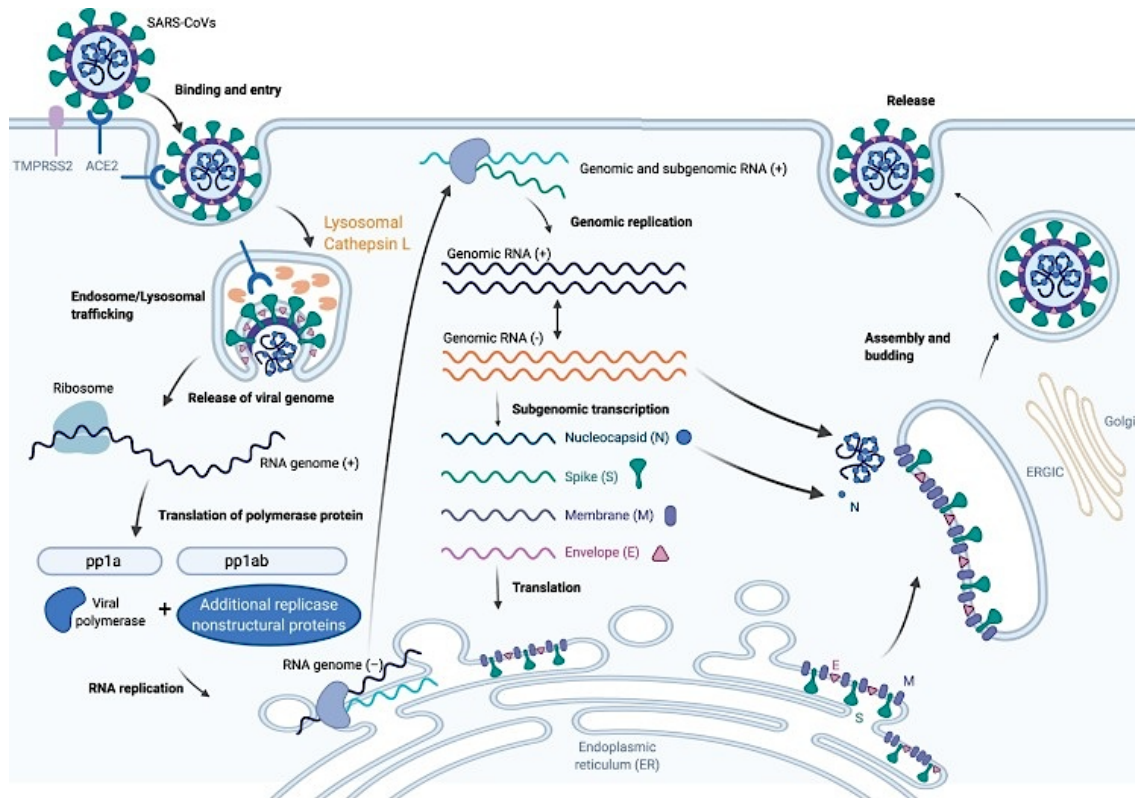


Figura 2. Ciclo de replicación celular del SARS-CoV-2. La infección inicia con la unión de la proteína Spike al receptor ACE2, seguida de la fusión de membranas mediada por TMPRSS2 en la superficie celular, o por cathepsina L en los endosomas. El ARN genómico liberado en el citosol se traduce para dar lugar a las poliproteínas pp1a/ab, que se escinden para formar el complejo de replicación. Este proceso ocurre en vesículas de doble membrana derivadas del retículo endoplasmático (RE). Posteriormente, los ARN subgenómicos se traducen en proteínas estructurales (S, M, E, N), las cuales se ensamblan junto con los nuevos genomas de ARN en el compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC). Los viriones maduros se secretan finalmente hacia el espacio extracelular. Figura tomada de Harrison y colaboradores¹⁶.

1.2 Blancos terapéuticos y desarrollo de antivirales

La respuesta inicial a la pandemia de COVID-19 se centró en el desarrollo acelerado de vacunas mediante la exploración simultánea de diversas plataformas tecnológicas. Si bien los enfoques de última generación basados en ARN mensajero (ej. BNT162b2 y mRNA-1273)^{29,30} y vectores adenovirales (ej. ChAdOx1)³¹ lograron una rápida consolidación clínica, el esfuerzo profiláctico global incluyó desde un inicio tecnologías clásicas como los virus inactivados (ej. CoronaVac) y las subunidades de proteínas recombinantes (ej. NVX-CoV2373). Estas formulaciones profilácticas utilizaron como diana molecular primaria a la

proteína Spike (S) con el objetivo de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes^{29–31}. A pesar de su éxito en la reducción de la morbilidad, la continua evolución genética del SARS-CoV-2 bajo presión selectiva evidenció las limitaciones de esta estrategia. El surgimiento de variantes de preocupación, como ómicron (linaje B.1.1.529) y sus sublinajes, que acumularon hasta 38 mutaciones únicamente en la proteína S reportadas hasta finales de 2022^{13,32,33}, dotó al virus de una significativa capacidad de escape inmunológico. Esta elevada variabilidad antigénica limitó drásticamente la eficacia a largo plazo de las vacunas y de las terapias pasivas basadas en anticuerpos monoclonales^{13,32}.

Ante este escenario, el diseño racional de antivirales de acción directa y basada en compuestos químicos se consolidó como una prioridad farmacológica indiscutible^{2,13}. La investigación sobre dianas moleculares se redirigió hacia enzimas virales intracelulares que fueran estructuralmente conservadas y cumplieran funciones indispensables en el ciclo replicativo. Un blanco terapéutico primario fue la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, nsp12), enzima responsable de la transcripción y replicación del genoma viral^{34,35}. Contra esta diana se validaron fármacos como el remdesivir (**Figura 3A**), un análogo de nucleótido que interrumpe la elongación de la cadena de ARN³⁶; sin embargo, su uso ambulatorio es logísticamente complejo debido a que requiere administración intravenosa. Otra alternativa aprobada fue el molnupiravir (**Figura 3B**), un análogo de nucleósido que induce mutagénesis letal en el genoma viral³⁷, aunque, debido a su eficacia clínica relativa, su uso suele reservarse para situaciones donde otros antivirales de mayor eficacia no están disponibles^{27,38}.

Paralelamente, la inhibición de las proteasas virales se estableció como una de las estrategias terapéuticas más robustas. El ensamblaje del complejo de replicación-transcripción (RTC) depende ineludiblemente del procesamiento de las poliproteínas precursoras, una escisión ejecutada coordinadamente por la proteasa principal (MPro) y la proteasa similar a la papaína (PLPro). La viabilidad clínica de este enfoque quedó demostrada con el desarrollo del nirmatrelvir (**Figura 3C**), un inhibidor peptidomimético dirigido al sitio activo de la MPro, el cual, es coadministrado con ritonavir (comercializado como Paxlovid). En esta formulación, el ritonavir actúa como un potenciador farmacocinético: al reducir la metabolización hepática del nirmatrelvir, incrementa la eficacia terapéutica del antiviral y permite alcanzar las concentraciones sistémicas inhibitorias

requiriendo una dosis clínica menor. El uso temprano de estos agentes permite reducir rápidamente la carga viral durante la fase primaria de la infección, previniendo la progresión del paciente hacia la fase secundaria, caracterizada por la desregulación inmunitaria y el riesgo de letalidad asociada a la “tormenta de citoquinas”^{2,12,14}.

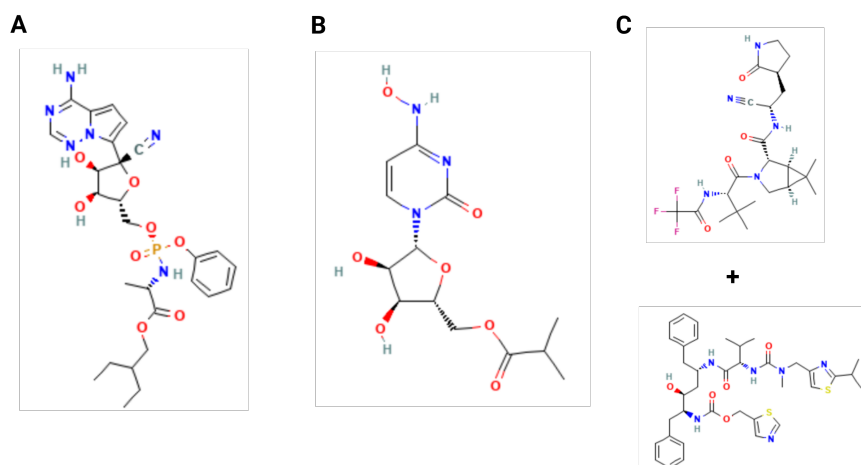


Figura 3. Estructuras químicas de algunos antivirales aprobados por la FDA frente al SARS-CoV-2. Representación de los fármacos terapéuticos descritos en el texto principal, donde **(A)** remdesivir y **(B)** molnupiravir son inhibidores de la RdRp. **(C)** Moléculas coadministradas en la formulación comercial Paxlovid: el inhibidor de la MPro nirmatrelvir (arriba) y el potenciador farmacocinético ritonavir (abajo).

No obstante, el éxito clínico de esta monoterapia ha introducido un nuevo desafío epidemiológico. A pesar de la alta conservación estructural de la MPro en comparación con la proteína S, la administración a gran escala de inhibidores ejerce una fuerte presión selectiva sobre el genoma viral³⁹.

Reportes científicos recientes han documentado la evolución y aparición de múltiples vías de resistencia frente al nirmatrelvir⁴⁰. Ciertas mutaciones en la MPro han conferido altos niveles de resistencia sin afectar la replicación viral, tanto en modelos de infección *in vitro* bajo presión selectiva, como en pacientes tratados durante ensayos clínicos⁴¹.

A nivel molecular, la pérdida de susceptibilidad clínica está mediada principalmente por sustituciones en el sitio activo, siendo la mutación E166V el determinante genético más crítico al interrumpir interacciones polares clave con el inhibidor⁴². Aunque esta mutación primaria compromete la eficiencia catalítica

de la enzima, el virus logra restaurar su aptitud replicativa mediante la coaparición de mutaciones compensatorias accesorias, como L50F o T21I⁴³. Si bien la frecuencia de aparición de estas variantes de escape es actualmente baja, su presencia demuestra que la MPro posee plasticidad evolutiva.

En consecuencia, la ampliación del arsenal terapéutico mediante el descubrimiento de nuevas clases de inhibidores dirigidos a la MPro, así como la exploración de la PLPro como diana complementaria, constituye una necesidad científica ineludible para anticipar el escape farmacológico y asegurar opciones de tratamiento resilientes a largo plazo.

1.2.1. Proteasas del SARS-CoV-2

Las proteasas virales MPro y PLPro representan los blancos terapéuticos de mayor relevancia clínica, puesto que su actividad endopeptidasa es un requisito insustituible para la viabilidad viral^{25,26}.

La MPro es responsable de la mayor parte del procesamiento, catalizando la escisión de las poliproteínas pp1a y pp1ab en 11 sitios altamente conservados (comprendidos entre nsp4 y nsp16, **Figura 4**). Su característica más destacada es su estricta especificidad de sustrato, exigiendo un residuo de glutamina en la posición P1 (consenso LQ↓S/A)^{26,44}. La ausencia de proteasas celulares humanas homólogas que compartan esta preferencia de corte es una ventaja farmacológica excepcional, ya que el diseño de inhibidores dirigidos a la MPro minimiza significativamente el riesgo de toxicidad y de efectos inespecíficos ("off-target") en el paciente⁴⁴.

Por otro lado, el dominio PLPro se encuentra en el extremo C-terminal de la nsp3 (la proteína de mayor tamaño del virus) y se encarga de realizar tres cortes en la región N-terminal de la poliproteína, reconociendo el motivo consenso LXGG↓ para liberar a las proteínas nsp1, nsp2 y a sí misma^{25,45}. Más allá de su rol replicativo, históricamente se ha propuesto que la PLPro posee una dualidad funcional al exhibir actividad deubiquitinasa (DUB) y delSGilasa²⁵, extrapolando modelos de la enzima homóloga del SARS-CoV-1. Sin embargo, evidencia bioquímica y estructural reciente ha puesto en debate la verdadera relevancia de esta función inmunomoduladora en el SARS-CoV-2⁴⁶.

A diferencia de su predecesor, la PLPro del SARS-CoV-2 presenta una arquitectura en su sitio de unión que reduce drásticamente su afinidad y

eficiencia catalítica hacia las cadenas de ubiquitina, mostrando una preferencia marcadamente mayor por la escisión de ISG15⁴⁷. Adicionalmente, diversos estudios funcionales cuestionan que esta actividad enzimática constituya el mecanismo primario de evasión de la respuesta del interferón tipo I, sugiriendo que la supresión inmunitaria es orquestada de forma redundante y más potente por otras proteínas virales accesorias, como ORF6 y ORF8⁴⁸. Por lo tanto, si bien el bloqueo de la actividad de la PLPro podría aportar un beneficio sinérgico teórico, la validación de la PLPro como un blanco farmacológico indiscutible recae principalmente en su insustituible actividad endopeptidasa para la viabilidad y replicación viral.

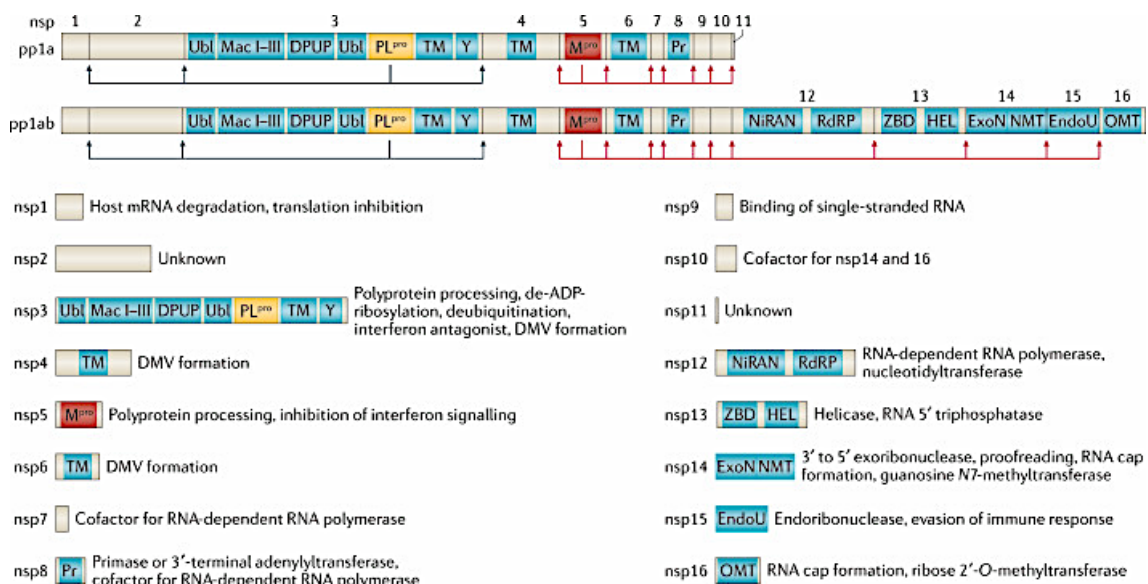


Figura 4. Procesamiento de poliproteínas y proteínas no estructurales (nsp) del SARS-CoV-2. Esquema de la escisión proteolítica de las poliproteínas virales pp1a y pp1ab, un proceso mediado por las proteasas virales PLPro (nsp3) y MPro (nsp5). Esta actividad coordinada genera 16 proteínas no estructurales individuales, las cuales contienen dominios conservados indispensables para la replicación del ARN, la formación de vesículas de doble membrana y la evasión de la respuesta inmune del huésped. Figura tomada de V'kovski y colaboradores²⁴.

A pesar de pertenecer ambas a la gran familia de las cisteína-proteasas, la MPro y la PLPro presentan una marcada divergencia evolutiva en su arquitectura tridimensional y en la topología de sus sitios activos^{26,44}.

1.2.2. Proteasa Principal del SARS-CoV-2 (MPro o 3CLPro)

La MPro es una proteasa de tipo 3C (3CLpro) cuyo plegamiento se asemeja al de la quimotripsina. Se estructura en tres dominios (I, II y III); los dos primeros conforman un barril beta que delimita la hendidura catalítica, la cual opera mediante una díada canónica compuesta por los residuos Cys145 e His41²⁶ (**Figura 5**). Un rasgo estructural determinante es que la MPro es inactiva como monómero; requiere una homodimerización estricta para adquirir competencia catalítica, siendo el dominio III y su región conectora los encargados de estabilizar la interfaz del dímero, lo que ofrece la oportunidad de diseñar moduladores alostéricos que afecten negativamente la actividad enzimática^{26,44}.

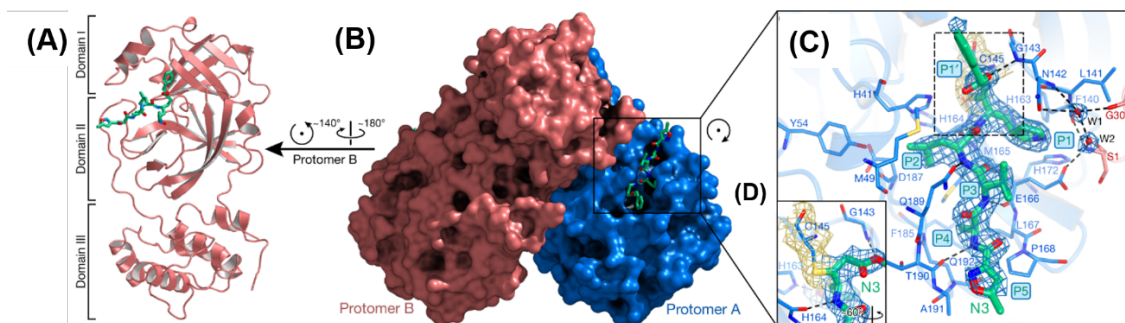


Figura 5. Estructura de la MPro de SARS-CoV-2. (A) Representación en cintas de un protómero de la MPro (PDB ID: 7BQY). (B) representación de superficie del homodímero. El protómero A se ilustra en azul y el protómero B en salmón. (C) Detalle topológico del sitio activo. Se detallan los subsitos enzimáticos de unión (P1-P5) ocupados por los correspondientes residuos del inhibidor (N3), la red de puentes de hidrógeno (líneas discontinuas), y el mapa de densidad electrónica $2F_o - F_c$. (D) Formación del enlace covalente C-S entre el inhibidor y el residuo catalítico Cys145. Figura modificada de Jin y colaboradores²⁶.

Como se destacara anteriormente, la MPro es la enzima responsable del procesamiento mayoritario de las poliproteínas precursoras pp1a y pp1ab (**Figura 6**), al escindirlas en 11 sitios específicos y altamente conservados, dando lugar a la liberación de las proteínas no estructurales desde la nsp4 hasta la nsp16^{26,49}. La característica bioquímica fundamental de la MPro es su especificidad de sustrato: exhibe un requerimiento absoluto por un residuo de glutamina (Gln) en la posición P1 del sitio de corte. El motivo de reconocimiento consenso se define típicamente como Leu-Gln↓(Ser/Ala/Gly) en las posiciones

P2-P1↓P1'⁴⁹. Dado que no se conocen proteasas humanas con dicha especificidad, el diseño racional de inhibidores dirigidos al sitio activo de la MPro presenta un bajo riesgo de reactividad cruzada, consolidando a esta enzima como un blanco terapéutico de interés.

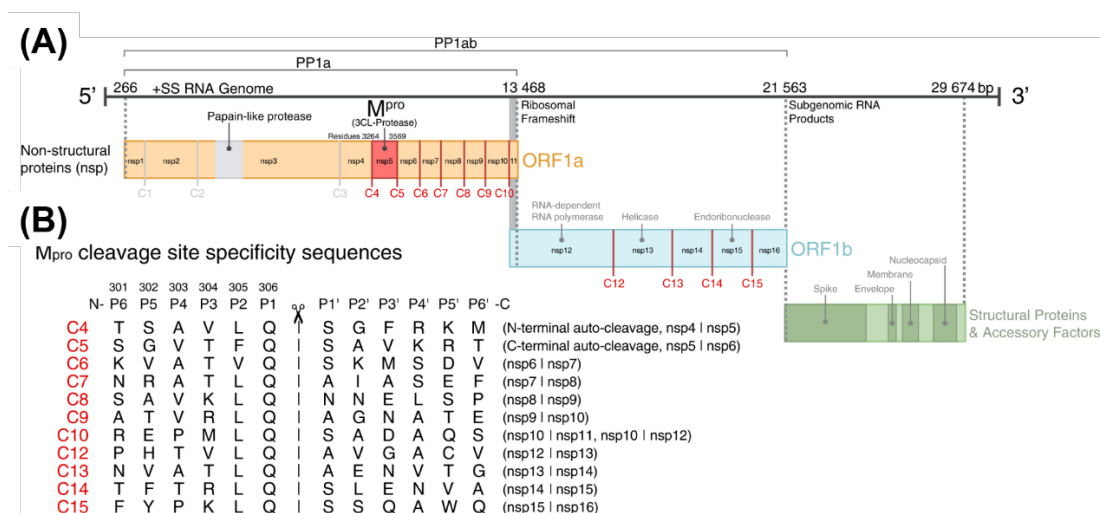


Figura 6. Sitios de corte de la MPro en el genoma de SARS-CoV-2. (A) Marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para las poliproteínas pp1a y pp1ab que, en conjunto, contienen un total de 11 sitios de escisión de MPro (en rojo). **(B)** Alineación de secuencias de los residuos de especificidad del sitio de escisión de MPro. La numeración de aminoácidos por encima de P6-P1 corresponde a la secuencia de MPro, siendo C5 la secuencia de autoescisión C-terminal de esta proteasa. Figura modificada de Lee y colaboradores⁵⁰.

1.2.3. Proteasa similar a papaína (PLPro)

La PLPro se clasifica dentro de la familia de deubiquitininas específicas de ubiquitina (USP) y adopta un plegamiento similar al de la papaína, visualmente descrito como una "mano derecha" (con subdominios de pulgar, palma y dedos)^{45,51}. Los residuos catalíticos los conforman Cys111, His272 y Asp286⁵¹ (**Figura 7**). Un elemento topológico fundamental para el anclaje de ligandos es el lazo BL2, una estructura altamente dinámica en la periferia del sitio activo que dicta la especificidad hacia sustratos e inhibidores no covalentes⁵¹. Adicionalmente, el subdominio de los dedos alberga un motivo estructural de "dedo de zinc", donde un ion Zn^{2+} es coordinado en geometría tetraédrica por cuatro cisteínas altamente conservadas (Cys189, Cys192, Cys224 y Cys226)⁴⁵.

Aunque no participa en la reacción enzimática, este dominio y la unión del metal son indispensables para el plegamiento tridimensional correcto de la PLPro^{45,51}.

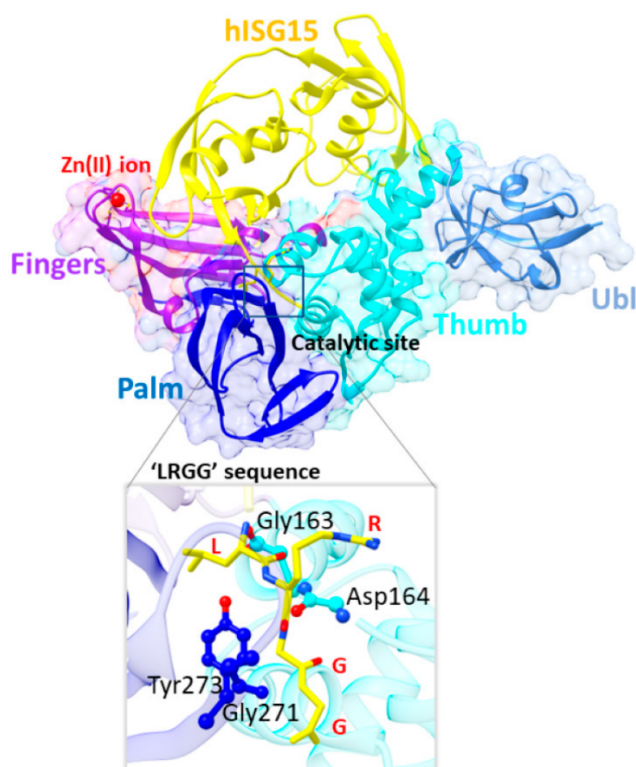


Figura 7. Estructura de la PLPro de SARS-CoV-2. La ilustración muestra a la proteasa viral (PDB ID: 7RBS) en complejo con la proteína humana ISG15. Representación tridimensional de los dominios estructurales de la enzima codificados por colores: dominio similar a la ubiquitina o Ubl (azul), pulgar (cian), dedos (violeta) y palma (azul marino). El ion de zinc estructural se indica con una esfera roja y el sustrato ISG15 en amarillo. La vista ampliada muestra los residuos del sitio catalítico que interactúan de forma directa con la secuencia del tetrapéptido “LRGG” del sustrato. Figura tomada de Varghese y colaboradores⁵².

A nivel funcional, la PLPro complementa la actividad de la MPro al encargarse del procesamiento exclusivo de la región N-terminal de las poliproteínas pp1a y pp1ab. Esta enzima cataliza la escisión endoproteolítica en tres sitios específicos, liberando las proteínas no estructurales nsp1, nsp2 y nsp3 (esta última corresponde a la propia PLPro madura)⁵³. La PLPro tiene un reconocimiento del motivo consenso tetrapeptídico LXGG↓ (Leu-X-Gly-Gly↓, donde X representa cualquier aminoácido)⁵⁴. La maquinaria catalítica realiza el corte peptídico invariablemente de forma adyacente al residuo de glicina en la

posición P1⁵⁴. Es pertinente destacar que este motivo estructural LXGG es idéntico a la secuencia carboxilo-terminal de la ubiquitina humana y de la proteína ISG15. Esta convergencia evolutiva en el reconocimiento del sustrato es precisamente lo que dota a la PLPro de su actividad de SGilasa y de ubiquitinasa accesoria. Dado que la viabilidad del SARS-CoV-2 depende de la escisión en este motivo tetrapeptídico, esta proteasa es considerada un blanco farmacológico clave.

1.3 Estrategias de cribado para el descubrimiento de fármacos

En el ámbito del descubrimiento de fármacos, el proceso de identificación de moléculas bioactivas (*hits*) se basa en dos estrategias metodológicas complementarias. La primera aproximación es el cribado fenotípico, el cual consiste en evaluar bibliotecas de compuestos directamente sobre el modelo pato-fisiológico de interés⁵⁵. En el caso de antivirales, el objetivo es determinar empíricamente si la molécula logra inhibir la replicación viral o reducir el efecto citopático. Aunque esta estrategia asegura desde el inicio que el compuesto es permeable y tiene actividad celular, la elucidación de su mecanismo de acción y la identificación de su blanco molecular debe abordarse *a posteriori*, lo que representa un desafío analítico complejo ya que en algunos casos, proteínas de la célula huésped, importantes para la replicación y maduración viral, pueden ser blanco de inhibición por el compuesto químico⁵⁵.

La segunda estrategia, denominada descubrimiento basado en la diana molecular (*Target-Based Drug Discovery, TBDD*)⁵⁶, invierte este paradigma y es el enfoque metodológico utilizado en el presente trabajo. Esta aproximación parte de la selección previa de una diana molecular indispensable para el patógeno; en este caso, las proteasas virales MPro y PLPro. Inicialmente, se criban compuestos *in vitro* con el objetivo de identificar inhibidores de la actividad proteica en cuestión, y, posteriormente, los candidatos activos se evalúan en modelos celulares para confirmar si dicha inhibición bioquímica se traduce en una actividad antiviral efectiva.

Para ejecutar esta evaluación bioquímica a gran escala, el estándar de la industria es el Cribado de Alto Rendimiento (*HTS, por High-Throughput Screening*). Esta metodología permite la evaluación automatizada y miniaturizada (en placas de 96, 384 o 1536 pocillos) de miles a millones de

compuestos, optimizando el consumo de reactivos y enzimas recombinantes⁵⁷. En la evaluación específica de la MPro y la PLPro del SARS-CoV-2, los ensayos in vitro emplean mayoritariamente sistemas de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET)^{58,59}. Estos sistemas incorporan sustratos peptídicos flanqueados por un fluoróforo en un extremo y una molécula extintora *quencher* en el opuesto. La escisión catalítica del sustrato separa ambas porciones de la molécula peptídica, anulando el efecto de *quenching* y generando una señal fluorescente directamente proporcional a la actividad enzimática, lo que permite monitorizar la cinética de inhibición en tiempo real^{60,61}.

Como alternativa ortogonal para sortear posibles interferencias ópticas de los compuestos, se ha extendido el uso de ensayos de polarización de fluorescencia (FP). En el caso específico de la PLPro, los ensayos FP resultan de gran utilidad analítica al emplear sondas fluorescentes conjugadas a moléculas más complejas como ISG15 o ubiquitina⁶². Cuando la enzima escinde la sonda, el fluoróforo libre, al ser de menor tamaño, experimenta una rotación molecular más rápida en solución, lo que se traduce en una caída cuantificable en la emisión de luz polarizada.

Independientemente del sistema de detección óptico utilizado, la calidad estadística y la viabilidad de un ensayo de cribado se evalúan paramétricamente mediante el factor Z'. Este índice cuantifica el rango dinámico entre las señales de los controles positivos y negativos en relación con su variabilidad intrínseca; valores superiores a 0,5 se consideran aceptables y mayores a 0,7 representan ensayos excelentes para campañas HTS⁶³. Para que una plataforma sea considerada analíticamente robusta, el factor Z' debe complementarse con la evaluación de otros parámetros críticos: un coeficiente de variación (CV) inferior al 10%, asegurando así la reproducibilidad intra e interplaca, y una relación señal/ruido (S/N) que suele ser superior a 10, lo que garantiza la discriminación entre los compuestos activos y las fluctuaciones basales del sistema⁶⁴. Asimismo, el ensayo debe calibrarse para operar dentro de un rango dinámico lineal frente a la concentración de enzima y sustrato, estableciendo un límite de detección (LOD) y una sensibilidad analítica que permitan cuantificar inhibidores de potencia moderada sin alcanzar la saturación del detector⁶⁴. Una vez que el ensayo cumple con estos parámetros, la fortaleza principal de estas plataformas radica en su veracidad empírica: los *hits* seleccionados demuestran una

interacción física comprobable bajo condiciones termodinámicas controladas. Sin embargo, su implementación enfrenta barreras significativas, incluyendo el elevado costo de reactivos, el requerimiento de infraestructuras robóticas sofisticadas y tasas de éxito iniciales (tasa de *hits*) que en la mayoría de las quimiotecas no superan el 1%⁶⁵.

Los *hits* primarios identificados en el cribado requieren una validación secundaria exhaustiva para descartar artefactos experimentales. Antes de proceder a ensayos biológicos o técnicas biofísicas complejas, es imperativa confirmar la potencia inhibitoria de los hits, y eventualmente, el modo de inhibición. Esta etapa evalúa la dependencia de la inhibición respecto a la concentración del inhibidor (curvas dosis-respuesta) para determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y, mediante ensayos donde también se varíe la concentración de sustrato y de proteasa, se logre elucidar el mecanismo de inhibición de la enzima^{60,61}. Posteriormente, se emplean ensayos biofísicos ortogonales, como el desplazamiento térmico diferencial (DSF) o la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), para confirmar la interacción física directa entre el ligando y la diana. Para mitigar estas barreras de validación, los laboratorios con quimiotecas físicas de volumen moderado optan por cribados directos exhaustivos; una estrategia que, aunque intensiva en tiempo y labor, garantiza la evaluación física de todos los compuestos y evita el descarte prematuro por sesgos teóricos.

1.3.1. Enfoques asistidos por computadora (CADD)

El diseño de Fármacos Asistido por Computadora (CADD, *Computer-Aided Drug Design*) ha revolucionado las etapas tempranas del descubrimiento de fármacos al permitir el rastreo virtual e *in silico* de bibliotecas químicas ultragrandes con un ahorro de tiempo y recursos sin precedentes. El CADD actúa como un potente filtro primario de enriquecimiento, reduciendo drásticamente el infinito espacio químico a un número manejable de moléculas candidatas para su evaluación experimental. Durante la emergencia del SARS-CoV-2, estas herramientas computacionales fueron el pilar que hizo posible el reposicionamiento ágil de fármacos existentes (como remdesivir, baricitinib y ritonavir) y el hallazgo *de novo* de andamios moleculares capaces de neutralizar a la MPro y la PLPro^{63,66,67}.

Dentro del ecosistema CADD, las simulaciones de dinámica molecular (DM) complementan al acoplamiento molecular al introducir la dimensión temporal y la flexibilidad conformacional del receptor en la evaluación de la estabilidad del complejo ligando-proteína, refinando la predicción de la afinidad de unión. A este arsenal se integra el aprendizaje automático e inteligencia artificial, metodologías que han emergido como herramientas transformadoras que optimizan su funcionamiento a partir del aprendizaje directo de grandes bases de datos de interacciones fármaco-diana, permitiendo predecir bioactividad y propiedades farmacocinéticas con una velocidad sin precedentes, tal como lo demostró el desarrollo acelerado de candidatos terapéuticos durante la pandemia de COVID-19⁶⁸.

Estos avanzados algoritmos evalúan la complementariedad tridimensional y electrostática entre el ligando y la diana biológica, la viabilidad termodinámica de la interacción, y estiman los parámetros ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad). El perfil ADMET es crucial, pues asegura que las moléculas candidatas posean las propiedades fisicoquímicas necesarias para garantizar su futura biodisponibilidad oral, así como biodistribución en los órganos y tejidos biológicos de interés. El marco de referencia más empleado para este filtrado es la Regla de los cinco de Lipinski, que establece que un fármaco candidato administrable por vía oral debe presentar: un peso molecular ≤ 500 Da, un coeficiente de partición octanol/agua ($\log P$) ≤ 5 , no más de cinco grupos donadores de puentes de hidrógeno (grupos OH o NH) y no más de diez grupos aceptores de puentes de hidrógeno (átomos de N u O)⁶⁹. Si bien esta regla no debe interpretarse de forma rígida (existen fármacos clínicamente exitosos que violan alguno de estos criterios), proporciona una guía de orientación ampliamente validada para el tamizaje temprano de compuestos con propiedades fisicoquímicas adversas. Pese a su inmenso valor, los modelos *in silico* son simplificaciones matemáticas de entornos biofísicos complejos. Por consiguiente, los compuestos predichos como activos en el ordenador requieren obligatoriamente de la validación empírica en el laboratorio para confirmar su verdadera bioactividad.

1.3.2. Cribado virtual basado en estructura y basado en ligandos

Dentro del ecosistema CADD, las campañas de cribado virtual se dividen fundamentalmente en dos estrategias, dictadas por la cantidad de información estructural disponible:

- **Cribado virtual Basado en la Estructura (SBVS):** Se aplica cuando se dispone del modelo tridimensional de la proteína blanco, resuelto experimentalmente mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) o criomicroscopia electrónica (Crio-ME). Su técnica protagonista es el acoplamiento molecular (*docking*), una simulación que predice la postura de anclaje óptima (pose) del ligando en el bolsillo catalítico y estima la energía de afinidad mediante complejas funciones de puntuación. Para abordar de forma más realista la plasticidad del receptor, se han desarrollado protocolos como el acoplamiento por inducción de ajuste (*Induced Fit Docking*, IFD) y el *ensemble docking*, que emplean múltiples conformaciones del blanco para capturar los movimientos del modelo de ajuste inducido, mejorando la capacidad discriminativa del cribado. Dada la amplísima disponibilidad de estructuras cristalográficas de alta resolución para la MPro y la PLPro del SARS-CoV-2, el SBVS se ha consolidado como la estrategia dominante en esta área. Cabe destacar también el *docking* covalente, de especial relevancia para la MPro, cuyo mecanismo catalítico mediado por la diada Cys145-His41 lo convierte en una diana ideal para inhibidores covalentes de tipo *warhead* electrófilo; el éxito clínico del nirmatrelvir constituye la validación más elocuente de esta aproximación^{70,71}.
- **Cribado Virtual Basado en Ligandos (LBVS):** Cuando se carece de la estructura 3D de la diana, se recurre al LBVS empleando compuestos que ya han demostrado tener actividad contra la misma. A través de la identificación de farmacóforos (las características topológicas y electrónicas indispensables para la unión) y de modelos QSAR (relación Cuantitativa Estructura-Actividad), el algoritmo deduce el “molde” químico-estructural, y luego se aplica una búsqueda en las bases de datos por moléculas que presenten un perfil similar. Los modelos QSAR de generaciones avanzadas, que incorporan

descriptores moleculares tridimensionales y técnicas de aprendizaje automático, han ampliado significativamente la capacidad predictiva del LBVS, permitiendo la identificación de compuestos activos con andamios estructurales novedosos⁷².

Finalmente, es imprescindible reconocer las limitaciones inherentes de las funciones de puntuación en el docking. La excesiva rigidez computacional con la que muchas veces se trata al receptor (omitiendo la plasticidad conformacional del modelo de ajuste inducido) y los desafíos matemáticos para calcular con precisión la energía de desolvatación, provocan una considerable incidencia de falsos positivos⁷³. Sin embargo, el fenómeno más crítico en química medicinal lo confirman los “falsos negativos”. En CADD, esto se evidencia en el rechazo algorítmico prematuro de andamios moleculares atípicos o muy flexibles que poseerían una destacada capacidad inhibitoria sobre el blanco molecular. Estas fallas metodológicas reafirman que los modelos predictivos no sustituyen, sino que orientan y complementan a los cribados bioquímicos sistemáticos, los cuales permiten identificar aquellas joyas farmacológicas que los ordenadores pudieron haber subestimado.

1.3.3. Búsqueda de inhibidores de la MPro y la PLPro

Desde el inicio de la pandemia, la validación de las proteasas virales MPro y PLPro como blancos terapéuticos desencadenó un esfuerzo global sin precedentes en el descubrimiento de fármacos. La urgencia sanitaria impulsó campañas de cribado virtual (*in silico*) que evaluaron bibliotecas compuestas por millones de ligandos, seguidas de ensayos bioquímicos que lograron identificar miles de compuestos con actividad inhibitoria inicial *in vitro*. A partir de estas plataformas, el diseño racional se bifurcó para abordar las particularidades estructurales de cada enzima.

Para la MPro, los esfuerzos iniciales priorizaron el desarrollo de peptidomiméticos covalentes dirigidos a inactivar el residuo nucleofílico Cys145. El fármaco nirmatrelvir ejemplifica este primer éxito, empleando un grupo reactivo de nitrilo para formar un aducto tioimidato reversible⁷⁰. No obstante, frente a la rápida degradación metabólica y la limitada biodisponibilidad de los derivados peptídicos, los esfuerzos estuvieron dirigidos hacia el diseño de

inhibidores no peptidomiméticos y nuevas clases estructurales. Este avance ha cristalizado en el desarrollo, y posterior autorización en diversas regiones del mundo de fármacos de nueva generación como el ensitrelvir (inhibidor no covalente)⁷⁴, simnotrelvir⁷⁵, leritrelvir⁷⁶ y el ibuzatrelvir⁷⁷ (**Figura 8**). Estas moléculas representan andamios optimizados que mejoran el perfil farmacocinético y diversifican el arsenal clínico disponible contra SARS-CoV-2.

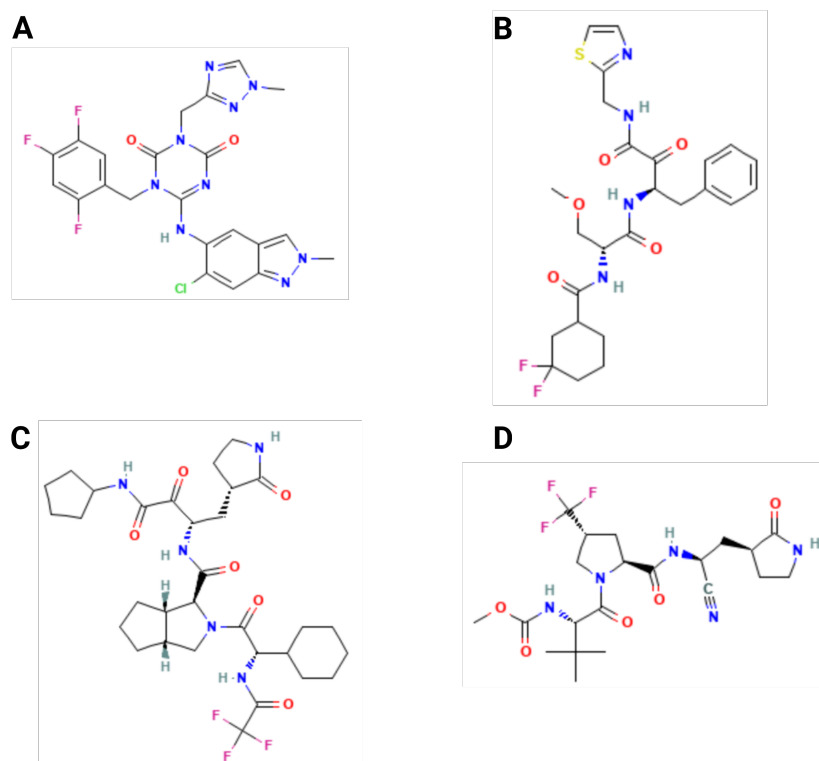


Figura 8. Estructuras químicas de inhibidores de la MPro. Representación bidimensional de los fármacos antivirales desarrollados frente al SARS-CoV-2 mencionados en el texto. **(A)** Ensitrelvir. **(B)** Simnotrelvir. **(C)** Leritrelvir. **(D)** Ibuzatrelvir.

Por otro lado, el diseño racional contra la PLPro ha enfrentado desafíos estéricos significativos. La morfología excesivamente estrecha de los bolsillos S1 y S2 cercanos a la triada catalítica ha obligado a redirigir el desarrollo hacia ligandos no covalentes voluminosos que logren anclarse en los subsitios S3/S4 y en la región flexible del lazo BL2⁵¹. Compuestos derivados del naftaleno, han servido como esqueletos base para la optimización racional. Esta evolución ha permitido sintetizar inhibidores con afinidad nanomolar que demuestran una potente actividad antiviral tanto *in vitro* como en modelos preclínicos *in vivo* de infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, a diferencia del éxito traslacional

observado con la MPro, el desarrollo de inhibidores de la PLPro para uso humano aún se encuentra en etapas experimentales.

Finalmente, la amenaza inminente de variantes virales con susceptibilidad reducida ha impulsado la exploración de estrategias de inhibición dual. La síntesis de esqueletos químicos capaces de interactuar simultáneamente con los dominios activos tanto de la MPro como de la PLPro representa una terapia antiviral sinérgica teórica⁷⁸. Este abordaje multifactorial minimizaría drásticamente las probabilidades de escape mutacional del virus. Si bien la búsqueda de antivirales se aceleró durante la emergencia sanitaria, el desarrollo continuo de nuevos inhibidores contra estas proteasas se mantiene en la actualidad como un pilar precautorio indispensable frente a la aparición de futuras cepas de coronavirus⁷⁸.

1.4 Antecedentes del laboratorio en la búsqueda de inhibidores contra SARS-CoV-2

Como antecedente directo a este trabajo, una fracción de una quimioteca disponible en el laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay), había sido evaluada contra la MPro mediante una campaña de cribado virtual-experimental⁶¹. Dicha campaña fue iniciada a mediados del año 2020, cuando las campañas de búsqueda de inhibidores y estudio de las proteasas de SARS-CoV-2 estaba en sus inicios. En aquel momento se habían identificado unos pocos inhibidores experimentalmente, mientras que un gran número había sido predicho como tal, mediante aproximaciones computacionales^{79,80}, con miras a ser validados. La estrategia aplicada en nuestra campaña constó de dos etapas. La primera, realizada en colaboración con el grupo del Dr. Alan Talevi (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos, LIDEB, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina), consistió en un cribado *in silico* contra la estructura de la MPro de nuestra quimioteca. En la segunda etapa, se priorizaría el cribado experimental de las moléculas que del análisis computacional fueron predichas con alta confianza como potenciales inhibidores de esta proteasa. En este contexto, se definió como *hit* a toda molécula capaz de reducir la actividad de MPro en al menos un 50%, en comparación con el control sin inhibir, al ser evaluada a una concentración fija de 25 μ M. En una primera ronda, los modelos

computacionales iniciales permitieron identificar compuestos activos con una tasa de éxito, o *hit-ratio*, de aproximadamente 1,4%⁶¹. Este valor predictivo resultó inesperadamente bajo y fue atribuido a la baja confiabilidad de los datos reportados en la literatura, los cuales, como se mencionó anteriormente, en su mayoría provenían de estudios *in silico* no respaldados por validación experimental. No obstante, en el curso de esta campaña, los algoritmos de identificación de inhibidores fueron nutridos y reentrenados con nuevos datos provenientes tanto de resultados experimentales obtenidos por nuestro laboratorio (compuestos activos e inactivos sobre la MPro) así como del creciente número de publicaciones científicas. Esto condujo a una segunda ronda de cribado *in silico* que experimentalmente dio lugar a la identificación de un gran número de *hits* con una tasa de éxito cercana a un 29%, la cual es 20 veces mayor a la obtenida anteriormente⁶¹.

Cabe destacar que varios trabajos han sido realizados previamente y en paralelo al actual proyecto de posgrado. Entre los andamios moleculares validados experimentalmente *in vitro* por el grupo y colaboradores destacan las benzisotiazolonas y sus análogos estructurales, las benzisoselenazolonas, las cuales actúan mediante la modificación covalente del sitio activo (inhiben a la MPro a concentraciones nanomolares y sub-micromolares, así como a la PLPro “*manuscrito en redacción*”). Además, la exploración sistemática de varias quimiotecas ha permitido identificar *hits* en familias químicas estructuralmente diversas (**Figura 9**), incluyendo flavonoles, chalconas, glicósidos y derivados benzotiazólicos⁶¹.

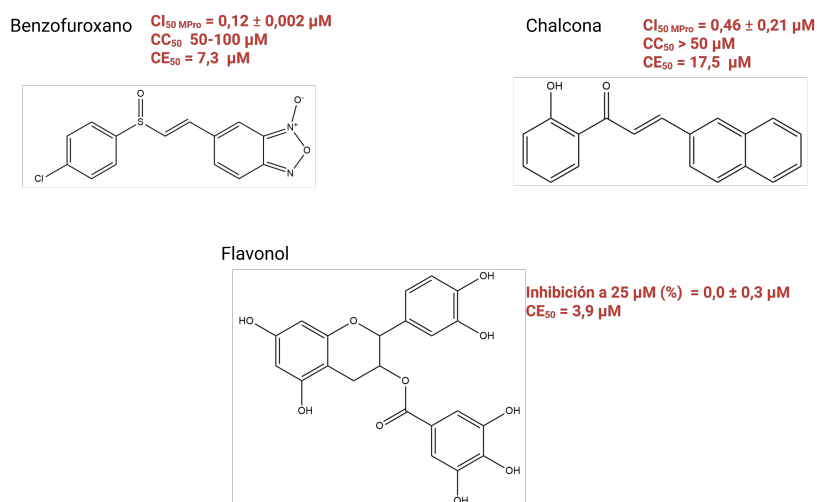


Figura 9. Estructuras de las moléculas *hits* de la MPro identificadas en estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación. A partir del cribado virtual y su validación en ensayos experimentales destacaron las moléculas pertenecientes a las familias antes mencionadas⁶¹ con alta potencia inhibitoria contra la MPro y actividad antiviral comparable a los fármacos control. Los ensayos realizados para obtener cada uno de los datos de actividad biológica de los *hits* fueron realizados en condiciones similares a las expuestas en el presente trabajo de tesis de maestría en la sección 3.

De particular interés para la química medicinal nuestro grupo y colaboradores identificaron *hits* pertenecientes a los sistemas de boro poliédrico (**Figura 10**), abarcando quimiotipos como los metalacarboranos y los dicarba-closo-dodecarboranos, así como los derivados de cloroquinona-heterocíclico⁸¹. Estos compuestos, además de ser el primer reporte como inhibidores de la MPro, muestran una potente actividad inhibitoria contra la proteasa ($CI_{50} = 1,4$ y $4,4 \mu\text{M}$, respectivamente) y una actividad anti-SARS-CoV-2 en células Vero infectadas con el virus de 14 y $22 \mu\text{M}$, respectivamente. Además, bajo las condiciones del ensayo no presentaron citotoxicidad ($CC_{50} > 50 \mu\text{M}$), evaluado en células Vero. El metalocarborano (**Figura 10A**) también mostró actividad inhibitoria frente a la PLPro ($CI_{50} \sim 22 \mu\text{M}$), sugiriendo que su actividad antiviral puede ser consecuencia de una acción multi-diana.

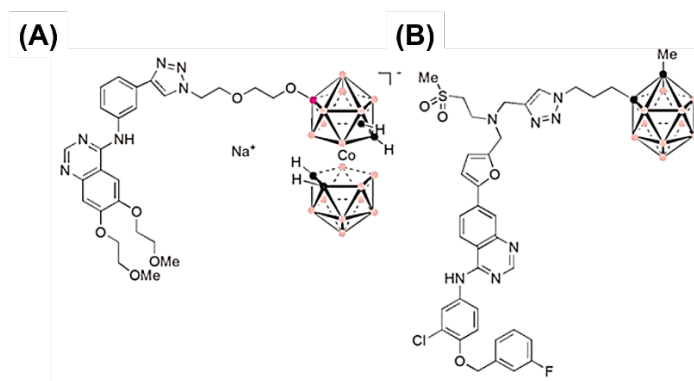


Figura 10. Estructura química de los compuestos pertenecientes a los sistemas de boro poliédrico. (A) Derivado metalocarborano, compuesto por un complejo aniónico de cobalto, el cual presenta actividad dual contra las proteasas MPro y PLPro del SARS-CoV-2. **(B)** Derivado de dicarba-closo-dodecarborano, caracterizado por un clúster de boro icosaédrico. Figura modificada de Dávila y colaboradores⁸¹.

1.5 Hipótesis

Los algoritmos de los modelos de cribado virtual (*in silico*) presentan ciertas limitaciones en la exploración del espacio químico, lo cual se manifiesta en la tasa de falsos negativos de un cribado experimental o en la imposibilidad computacional de analizar familias de compuestos estructuralmente complejas (ej. complejos organometálicos). Considerando que, de la quimioteca interna del laboratorio de 850 compuestos, estudios previos solo evaluaron experimentalmente 230 moléculas⁶¹, se postula que la fracción mayoritaria inexplorada alberga compuestos con potencial actividad frente a las proteasas virales o con actividad anti-SARS-CoV-2 que fueron excluidas o subestimadas por el modelo predictivo^{82,83}.

Por lo tanto, se plantea completar el cribado experimental (*in vitro*) exhaustivo de una quimioteca previamente sometida a cribado virtual, con el fin de estimar la tasa de falsos negativos del abordaje computacional.

Este estudio será complementado con la evaluación racional de nuevas familias, con la finalidad de identificar nuevos inhibidores de las proteasas y de la replicación de SARS-CoV-2. Asimismo, se postula que la caracterización biológica, bioquímica y estructural de algunos *hits* destacados permitirá definir y plantear opciones de optimización del perfil farmacofórico de estas moléculas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo fue identificar y caracterizar bioquímica, estructural y biológicamente nuevos compuestos inhibidores de las proteasas MPro y PLPro del SARS-CoV-2, con actividad antiviral.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Objetivo específico I

Expresar y purificar las proteasas recombinantes MPro y PLPro del SARS-CoV-2 en *Escherichia coli*, e implementar ensayos cinéticos que permitan el cribado de compuestos químicos.

2.2.2. Objetivo específico II

Identificar compuestos inhibidores (“*hits*”) de la MPro de SARS-CoV-2 mediante el cribado *in vitro* y segmentado de los siguientes grupos de compuestos: 1) quimioteca local cribada *in silico* y no experimentalmente por carecer de *hits* virtuales, 2) series químicas excluidas del modelado computacional previo (rotenoides y complejos organometálicos de rutenio), y 3) derivados de naftoquinonas. A los *hits* experimentales se les determinará la concentración inhibitoria 50 contra la MPro y su capacidad de inhibir a la PLPro. Con los resultados obtenidos y la información estructural disponible se llevará a cabo un análisis de relación estructura-actividad.

2.2.3. Objetivo específico III

Dilucidar el mecanismo de inhibición de la MPro para al menos un par de *hits* destacados aplicando ensayos bioquímicos, análisis cinéticos y de espectrometría de masas, así como aproximaciones estructurales por cristalografía de rayos X.

2.2.4. Objetivo específico IV

Determinar la citotoxicidad y actividad anti-SARS-CoV-2 de los inhibidores de la MPro más promisorios, sobre modelos celulares de relevancia traslacional.

3. METODOLOGÍA

3.1 Expresión y purificación de la MPro y la PLPro recombinantes en *Escherichia coli*

3.1.1. Vectores de expresión de proteasas virales y transformación química de bacterias quimio-competentes

Para la expresión de la forma recombinante de la MPro de SARS-CoV-2 cepa Wuhan, se empleó un vector plasmídico provisto por el laboratorio del Dr. Hilgenfeld R. (German Center for Infection Research, University of Lübeck, Germany). Este plásmido contiene la secuencia de ADN codificante para la proteasa (residuos 3264-3569 de la poliproteína del gen ORF1ab, GenBank: MN908947.3) con codones optimizados para su expresión en *E. coli* y fusionada en su extremo N-terminal a la secuencia codificante para glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum*. Además, en el extremo C-terminal de la secuencia de MPro se incorpora un sitio de corte para la enzima PreScission de la proteasa 3C de rinovirus humano, seguido de una etiqueta que codifica para seis residuos de histidina. La expresión de esta secuencia de fusión está bajo el control de expresión de un promotor de T7 ARN polimerasa⁴⁴ (vector: pGEX-6P-1-MPro; **Figura A1**). La cepa de bacteria seleccionada fue *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS*, la cual posee las siguientes características: **1)** es defectiva en dos proteasas (citoplasmática: Lon y de membrana: OmpT), **2)** expresa de manera constitutiva la ARN polimerasa del fago T7 que permite altos niveles de transcripción de genes bajo el control de secuencias promotoras de T7, y **3)** expresa una lisozima con afinidad por la ARN polimerasa de T7, que al unirse a esta bloquea la expresión del gen de interés en ausencia de agente inductor (IPTG). Esto evita la expresión prematura o espuria de la MPro en ausencia de IPTG.

Para la expresión de la forma recombinante de la PLPro de SARS-CoV-2 cepa Wuhan, se empleó un vector plasmídico provisto por el laboratorio del Dr. Dikic (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt, Germany)²⁵ (**Figura A2**). Este plásmido contiene la secuencia de ADN codificante para la proteasa, residuos 746-1060 de la poliproteína del gen ORF1ab, GenBank: YP_009725299.1) con codones optimizados para su expresión en *E. coli*, bajo el control de expresión de un promotor de T7 ARN polimerasa (vector: pET28b-PLPro). El vector contiene una secuencia que añade una etiqueta de histidinas

en el extremo C-terminal, para facilitar su purificación. En este caso, la cepa de expresión seleccionada fue *E. coli* BL21 (DE3), la cual presenta las mismas características descritas arriba, excepto que no está transformada con el plásmido *pLysS*.

Los plásmidos fueron incorporados a las bacterias mediante técnica de golpe por calor. Para ello, se emplearon bacterias quimiocompetentes que estaban disponibles en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo clásico de cloruro de calcio⁸⁴. Para ello, 50 μ L de bacterias quimiocompetentes de cada cepa se incubaron con 2 μ L de los correspondientes plásmidos de expresión (a una concentración aproximada de 100 ng/ μ L) durante 30 min en hielo. Luego de ello, a estas muestras se les aplicó un golpe térmico a 42 °C por 2 min, en termobloque, seguido de una incubación de 2 min adicionales en hielo. Posteriormente, se añadieron 450 μ L de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y la mezcla se incubó a 37 °C con agitación (650 rpm) durante una hora.

Finalmente, se sembraron 200 μ L de este cultivo sobre una placa de Petri con agar LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) para la transformación *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* + pGEX-6P-1-MPro, o con kanamicina (50 μ g/mL) para la transformación *E. coli* BL21 (DE3) + pET28b-PLPro. Luego de esparcir uniformemente la muestra sobre la superficie del agar, las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Para cada lote de producción de las proteasas virales recombinantes, se utilizaron criobancos de células previamente transformadas, en lugar de realizar transformaciones frescas. Estos fueron preparados suplementando el cultivo bacteriano con 10% v/v glicerol estéril como crioprotector, fraccionados en alícuotas de 50 μ L y almacenados a -80 °C. Para la recuperación bacteriana, las alícuotas se descongelaron en hielo y se inocularon directamente en medio de cultivo como se detalla a continuación.

3.1.2. Expresión de la forma recombinante de la MPro

Para la expresión y purificación de la forma recombinante de MPro, se siguió el protocolo descrito por Hilgenfeld y sus colaboradores⁴⁴. Se seleccionaron al azar cinco colonias aisladas de las bacterias transformadas, las cuales se inocularon en 150 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). Estos precultivos se incubaron a 37 °C con agitación (220 rpm) durante toda una

noche. Posteriormente, se tomaron 20 mL del precultivo para inocular 800 mL de medio de doble extracto de levadura-triptona (2YT) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) en matraces de 5 litros de capacidad. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de $1,0 \pm 0,2$ que refleja que se alcanzó la fase logarítmica de crecimiento. Luego, se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM, continuando la incubación en agitación (220 rpm) durante 4 horas a 37 °C.

Finalmente, las células se recolectaron mediante centrifugación a 4500 g durante 30 min a 4 °C. Las células sedimentadas se resuspendieron en 50 mL de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0). Se tomaron alícuotas del cultivo antes y después de la inducción para su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 12% p/v de poliacrilamida), como se detalla en la sección 3.3.

Las células se lisaron mediante sonicación en hielo, tras la adición de ADNasa a una concentración final de 0,45 µg/mL. La sonicación consistió en pulsos de 5 s con intervalos de 10 s a una amplitud del 30-35%, durante un tiempo total de 10 min empleando el sonicador. El lisado celular obtenido se centrifugó a 30000 g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante resultante se recuperó para proceder con la purificación de la proteína recombinante.

3.1.3. Purificación de la forma recombinante de MPro

Previo a su adición, 1,5 mL de matriz de afinidad Ni-NTA (Invitrogen) fueron lavados para remover el etanol de almacenamiento. Para ello, la resina se transfirió a un tubo cónico de 15 mL, se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada y se centrifugó a 3000 g durante 4 minutos. Tras descartar el sobrenadante, la matriz lavada se agregó directamente a los 250 mL de sobrenadante recuperado de la lisis celular. La suspensión se incubó durante 15 min en hielo con agitación manual constante (**Figura 11**). A continuación, la mezcla se vertió dentro de una columna de purificación de cristal de 2 cm de diámetro por 20 cm de largo acoplada a una bomba peristáltica para el control de flujo. Se realizaron tres lavados con 15 mL de tampón de lisis y, posteriormente, la proteína se eluyó a un flujo regulado de 2 mL/min,

recogiéndose en dos alícuotas de 10 mL con tampón de elución (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8,0).

Al eluato obtenido (20 mL) se le agregó 500 µL de la proteasa PreScission (6 mg/mL) para eliminar la etiqueta de histidinas que permitió la purificación por IMAC. Esta solución se dializó utilizando una membrana con un tamaño de poro de 3,5 kDa (SnakeSkin 3.5K MWCO) en un litro de tampón de diálisis (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, DTT 1 mM, pH 8,0) a 4 °C durante toda la noche. Tras el clivaje enzimático, la fracción dializada se sometió a una segunda purificación por afinidad (IMAC) siguiendo el mismo protocolo descrito en el párrafo anterior. En esta etapa, se recogió la fracción no retenida o percolado (contiene la MPro) y la correspondiente a los lavados. Estas muestras fueron sometidas a un intercambio de tampón hacia Tris 20 mM, DTT 1 mM, pH 8,0 utilizando una columna PD10 (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo del fabricante mediante elución por gravedad.

El siguiente paso cromatográfico consistió en un intercambio iónico utilizando una resina Mono Q 5/50 (GE Healthcare; 5 mm de diámetro por 50 mm de longitud). La columna cromatográfica se equilibró con solución tampón Tris 20 mM, DTT 1 mM, pH 8,0 y, luego de cargar la muestra de proteína, se aplicó un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl con solución tampón Tris 20 mM, NaCl 1M, DTT 1 mM, pH 8,0 durante 15 min, a un flujo de 1 mL/min. Finalmente, el eluato conteniendo la MPro recombinante se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75 16/60, GE Healthcare) empleando el tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,8, aplicando un flujo de 1 mL/min. Estos dos pasos cromatográficos se realizaron en un equipo de cromatografía líquida ÄKTA pure (Cytiva), monitoreando la absorbancia a 280 nm.

Para la estimación del estado oligomérico de la MPro, la columna de exclusión molecular fue calibrada empleando proteínas estándar de referencia: albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), quimiotripsina A (25 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa) (**Figura A3**). El volumen muerto del sistema se estableció mediante la inyección de *Blue Dextran* (2000 kDa). Se construyó una curva de calibración relacionando empíricamente el volumen de elución de cada estándar con el logaritmo decimal de su peso molecular teórico. La ecuación de

la regresión lineal resultante fue utilizada para interpolar el volumen de elución experimental de la MPro y calcular su masa molecular aparente.

Las fracciones recolectadas de cada una de las etapas de expresión y purificación se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE al 12% p/v de poliacrilamida) para confirmar la presencia de la enzima y evaluar la pureza de la MPro recombinante final (**Figura 11**).

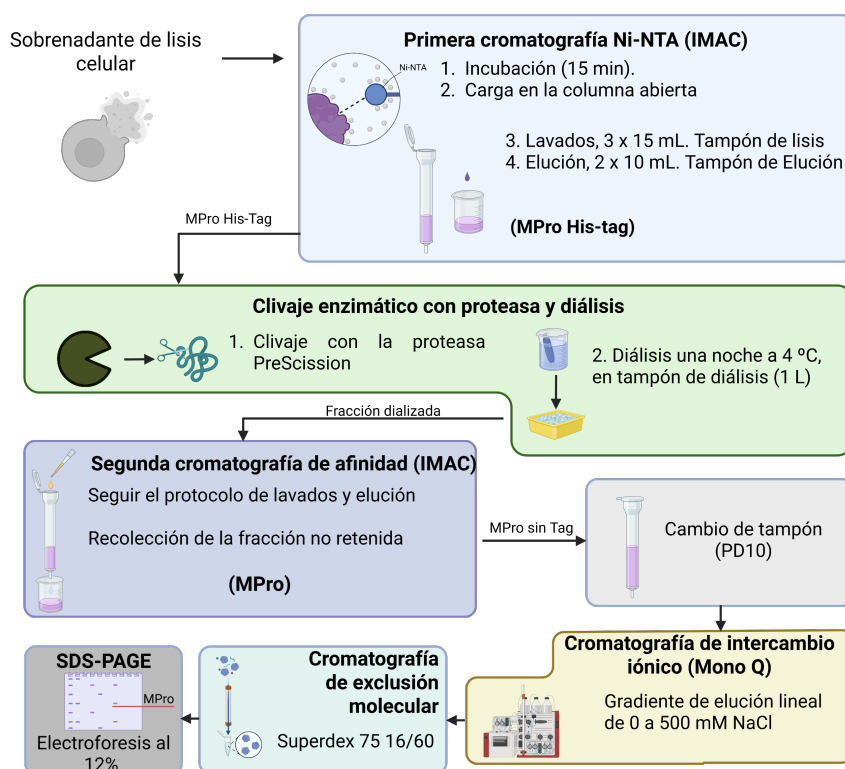


Figura 11. Representación esquemática de las etapas de purificación de la MPro de SARS-CoV-2. Realizado con Biorender (<https://BioRender.com>)

3.1.4. Expresión de la forma recombinante de la PLPro

Para la expresión y purificación de la PLPro de SARS-CoV-2 recombinante, se siguió el protocolo descrito por Dikic y sus colaboradores²⁵. Se seleccionaron al azar cinco colonias aisladas de las bacterias transformadas, las cuales se inocularon en 150 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Estos precultivos se incubaron a 37 °C con agitación (220 rpm) por toda la noche. Posteriormente, se tomaron 20 mL del precultivo para inocular 800 mL de medio 2YT suplementado con kanamicina (50 µg/mL) en matraces de 5 litros de

capacidad. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($DO_{600} = 1,0 \pm 0,2$), momento en el cual la expresión de la proteína recombinante se indujo mediante agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. En este punto del proceso, también se agregó cloruro de zinc ($ZnCl_2$) a una concentración final de 1 mM, el cual contribuye a estabilizar el dominio de “dedos de zinc” de la proteasa, permitiendo su correcto plegamiento y evitando la agregación de la proteína. Luego de ello el cultivo, se incubó bajo agitación a 220 rpm durante toda la noche a 18 °C.

Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron mediante centrifugación a 4500 g durante 30 min a 4 °C. Las células sedimentadas se resuspendieron en 50 mL de tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 10 mM, DTT 2 mM, pH 7,4). Se tomaron alícuotas del cultivo antes y después de la inducción para su análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida), como se detalla en la sección 3.3.

El proceso de lisis celular por sonicación y posterior clarificación del lisado se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas para la MPro (ver sección 3.1.2). El sobrenadante resultante se recuperó para proceder con la purificación de la PLPro recombinante.

3.1.5. Purificación de la forma recombinante de la PLPro

Por cada 250 mL de sobrenadante recuperado de la lisis celular, se agregaron 1,5 mL de matriz de afinidad Ni-NTA (Invitrogen) lavada. La suspensión se incubó durante 15 min en hielo con agitación manual constante. A continuación, la mezcla se vertió dentro de una columna de purificación de cristal de 2 cm de diámetro por 20 cm de largo acoplada a una bomba peristáltica para el control de flujo. Se realizaron tres lavados con 15 mL de tampón de lisis y, posteriormente, la proteína se eluyó en dos alícuotas de 10 mL con tampón de elución (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, imidazol 250 mM, DTT 2 mM, pH 7,4).

Para evitar la precipitación de la enzima inducida por el imidazol presente en el tampón de elución, el eluato obtenido de la purificación mediante IMAC fue sometido a un paso de diálisis. Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito para la proteasa MPro, intercambiando la solución hacia el tampón Tris 20 mM, NaCl 100 mM, DTT 2 mM, pH 7,4.

Posteriormente, la muestra dializada se sometió a una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) equilibrada con este mismo tampón. Este procedimiento se llevó a cabo empleando el mismo equipo y bajo las mismas condiciones cromatográficas (flujo, temperatura y monitoreo de absorbancia a 280 nm) descritas previamente para la purificación de la MPro. Las fracciones recolectadas se analizaron por electroforesis en el gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE al 12%) para confirmar la presencia y la pureza de la PLPro recombinante.

3.2 Cuantificación de la forma recombinante de la MPro y la PLPro

La concentración de las proteasas recombinantes purificadas se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm. Para el cálculo se aplicó la ley de Beer-Lambert (Ec. 1), utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) teórico y el peso molecular de cada enzima. Ambos parámetros fueron tomados a partir de la secuencia de aminoácidos de los productos purificados mediante la herramienta *ProtParam* del servidor *ExPASy* (<https://web.expasy.org/protparam/>). Específicamente, para el cálculo de los parámetros de la enzima MPro se introdujo su secuencia nativa intacta, mientras que la PLPro se empleó la secuencia recombinante completa, considerando la retención de la etiqueta de histidinas en la estructura final.

$$C = \frac{A_{280} \cdot PM}{\epsilon \cdot l} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

- C: concentración de la proteína en mg/mL,
- A₂₈₀: absorbancia medida a 280 nm,
- PM: peso molecular teórico de la proteasa (g/mol),
- ϵ : coeficiente de extinción molar teórico (M⁻¹ cm⁻¹),
- l: longitud del paso óptico (cm).

3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizaron geles de poliacrilamida/bisacrilamida de 1,5 mm de espesor empleando un sistema Mini PROTEAN II (Bio-Rad, EE. UU.), siguiendo los

protocolos estándar del fabricante. Para el análisis, las muestras se prepararon mezclando 40 μ L de cada alícuota proteica con 10 μ L de tampón de carga 5X (Tris-HCl 0,375 M, glicerol 60% (v/v), SDS 12% (p/v), azul de bromofenol 0,006% (p/v), DTT 0,05 M, pH 6,8). A continuación, las mezclas se calentaron a 95 °C en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante aproximadamente 7 min. La separación electroforética se llevó a cabo aplicando una corriente constante de 30 mA. Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para visualizar las bandas proteicas.

3.4 Preparación de muestras de compuestos químicos

Los compuestos a evaluar fueron facilitados por diversos grupos de síntesis química de origen nacional e internacional (mencionados a continuación), y que se encontraban disponibles en el laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas (Institut Pasteur de Montevideo).

- Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, UdelaR.
- Laboratorio de Química Inorgánica Medicinal de la Facultad de Química, UdelaR.
- Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR Litoral Norte, UdelaR.
- Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química y Farmacia de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Instituto de Química, Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Campinas.
- Design Medix y Atomwise. Empresas de Estados Unidos.
- Departamento de Química y Tecnología del Fármaco, Universidad de Roma.
- Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Valle, Colombia.

Para el cribado contra las proteasas, se prepararon soluciones frescas de los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% (v/v) a partir de los sólidos, generalmente a una concentración *stock* de 20 mM. Dichas soluciones se fraccionaron en alícuotas para evitar múltiples ciclos de congelado y descongelado, y se almacenaron a -20 °C.

3.5 Ensayos de actividad enzimática y cribado de inhibidores

3.5.1. Ensayo de actividad enzimática para la MPro

La actividad enzimática de la MPro se determinó mediante el seguimiento de la fluorescencia emitida por el producto de hidrólisis de un sustrato fluorogénico. En ese ensayo, el sustrato de la MPro es un péptido sintético (Dabcyl-KTSAVLQ↓SGFRKM-E (Edans)-NH₂; United Biosystems USA)⁶⁰ modificado en su extremo N- y C-terminal con los grupos químicos Edans (ácido 5-((2 Aminoetil)amino)naftaleno-1-sulfónico) y Dabcyl (4'-dimetilaminoazobenceno-4-carboxilato). En el sustrato intacto, la fluorescencia de Edans se encuentra apantallada por efecto del Dabcyl mediante el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Tras la escisión proteolítica catalizada por la MPro, ambos fragmentos peptídicos se separan físicamente, lo cual anula el efecto de atenuación y permite detectar la señal de fluorescencia de Edans (**Figura 12**).



Figura 12. Representación esquemática del ensayo de actividad de la MPro.

Sustrato peptídico fluorogénico con sitio de corte específico de la proteasa MPro, el cual se encuentra conjugado a un par FRET compuesto por Edans (donador) y Dabcyl (aceptor). Tras la hidrólisis del sustrato catalizada por la enzima, el par FRET se separa, lo que produce un aumento en la detección de fluorescencia de la molécula donadora.

3.5.2. Determinación de los parámetros cinéticos de la MPro

Previamente a los ensayos de inhibición, se determinaron los parámetros cinéticos de la MPro recombinante para establecer las condiciones óptimas de trabajo. Se utilizó una concentración final de enzima de 90 nM y las reacciones se iniciaron mediante la adición de concentraciones crecientes del sustrato peptídico fluorogénico en un rango de 5 a 250 μ M.

Para permitir la conversión de las unidades relativas de fluorescencia (URF) a concentración de producto formado, se construyó una curva de calibración utilizando el fluoróforo EDANS libre. Esta curva se realizó en un rango de

concentraciones de 0 a 20 μM , disolviendo el EDANS en el tampón de reacción para mimetizar las condiciones exactas del ensayo.

La progresión de las reacciones enzimáticas se monitorizó en tiempo real a 25 °C midiendo la emisión de fluorescencia en el lector de microplacas Varioskan Lux. Las velocidades iniciales se calcularon a partir de la pendiente de la región lineal de las curvas de progreso (URF en función del tiempo). Posteriormente, los datos de velocidad inicial frente a la concentración de sustrato se ajustaron a la ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism, permitiendo calcular la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima (V_{max}).

3.5.3. Ensayo de cribado de inhibidores

El ensayo de cribado *in vitro* se llevó a cabo en microplacas negras de 96 pocillos fondo plano (Thermo Scientific), con un volumen final de 200 μL por pocillo y empleando como tampón de reacción 20 mM Tris, pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA. La concentración final de enzima, compuestos, DMSO y sustrato en el ensayo fue de: 90 nM (concentración a la que la reacción se mantiene en condiciones de velocidad inicial durante aproximadamente 45 min), 25 μM , 5% (v/v) y 5 μM , respectivamente. Brevemente, luego de dispensar 80 μL /pocillo de MPro se agregaron 100 μL de los compuestos a evaluar (solución de trabajo a 20 mM en 100% v/v DMSO). Para minimizar la evaporación, la placa se cubrió con su respectiva tapa plástica y se incubó durante 60 min a 27 °C. Posteriormente, la reacción se inició agregando 20 μL del sustrato peptídico (solución de trabajo a 10 mM en tampón de reacción).

Inmediatamente después del agregado del sustrato, se monitoreó la reacción enzimática ($\lambda_{\text{ex/em}} = 340/490 \text{ nm}$) en tiempo real (lecturas continuas entre 15 a 25 s según la cantidad de pocillos a leer) y durante 60 min a 25 °C, empleando un lector de microplacas Varioskan Lux⁶⁰.

En paralelo, se incluyeron las siguientes muestras control: blanco (tampón de reacción con sustrato), control de máxima actividad enzimática (MPro con sustrato) y control de inhibición (MPro con 0,1 μM de Ebselen, EbSe). Cada condición se evaluó por triplicado en al menos dos experimentos independientes. Finalmente, el ensayo se consideró validado si este presenta una relación señal/ruido $> 7^{85}$, un factor $Z' > 0,7$ y un valor de unidades relativas de

fluorescencia (URF) > 10. Los datos fueron analizados y procesados utilizando GraphPad Prism (versión 8.0). Se consideró a un compuesto como inhibidor (*hit*) si este reduce la actividad enzimática en al menos un 50% con respecto al control de máxima actividad.

Para determinar la actividad enzimática y el porcentaje de inhibición de los compuestos, se analizó la región lineal de la curva de progreso de la reacción (URF en función del tiempo) para garantizar el cálculo bajo condiciones de cinética lineal (velocidad inicial). Esta ventana de linealidad se cumplió típicamente entre los 15-35 min de reacción. Se calculó la pendiente (velocidad de reacción) para cada pocillo mediante regresión lineal. Los datos obtenidos se normalizaron definiendo como 100% de actividad a la pendiente del control de máxima actividad enzimática y como 0% de actividad a la pendiente del control de inhibición con Ebse 0,1 µM. El porcentaje de inhibición para cada compuesto evaluado se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\%I = \left[\frac{1-(m_1-m_0)}{(m_c-m_0)} \right] * 100 \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

- %I: porcentaje de inhibición del compuesto evaluado,
- m_1 : pendiente de la fase inicial en presencia del inhibidor,
- m_c : pendiente de la fase inicial de la reacción del control de actividad máxima (sin inhibidor),
- m_0 : pendiente de la fase inicial del control de 100% de inhibición.

3.5.4. Ensayo de actividad enzimática para la PLPro

La actividad enzimática de la PLPro se determinó empleando el sustrato peptídico sintético fluorogénico Z-RLRGG-AMC (Bachem, Suiza). Este sustrato contiene una secuencia peptídica reconocida por la enzima (RLRGG) y se haya conjugado en su extremo N- y C-terminal a un grupo protector carbobenzoxi y al fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC), respectivamente. PLPro hidroliza el enlace amida C-terminal del péptido liberando a la molécula de AMC en su configuración electrónica original que le permite emitir fluorescencia (**Figura 13**)⁵¹.

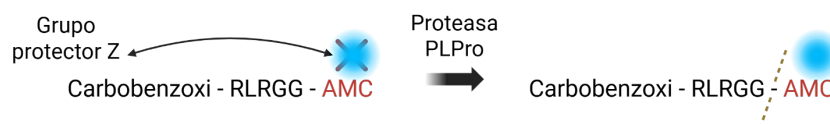


Figura 13. Representación esquemática del ensayo de actividad de la PLPro. El esquema ilustra el sustrato fluorogénico, protegido en su extremo N-terminal por un grupo carbobenzoxi (Z). La hidrólisis libera al grupo AMC en forma de amina primaria, el cual emite fluorescencia a 440 nm al ser excitado a 340 nm.

Los ensayos de cribado de compuestos se realizaron bajo condiciones idénticas a las descritas en la sección 3.5 para el ensayo de MPro, con la única salvedad que la concentración final de la PLPro fue de 200 nM.

3.5.5. Determinación de la CI_{50} para los *hits* de la MPro y la PLPro

El valor de CI_{50} se determinó para aquellos compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición de la MPro y/o la PLPro $\geq 50\%$ a una concentración de 25 μM . Para ambas enzimas, estos ensayos se realizaron bajo condiciones idénticas a las descritas en las secciones 3.5.1 y 3.5.2, con la excepción de que se evaluaron siete concentraciones decrecientes de los compuestos (rango de 250 μM a 0,1 μM), preparadas mediante diluciones seriadas al tercio.

El porcentaje de inhibición para cada concentración se determinó a partir de las velocidades iniciales de reacción, siguiendo el procedimiento analítico descrito en la sección 3.5. Finalmente, los valores de CI_{50} se calcularon mediante un análisis de regresión no lineal, ajustando los datos experimentales de porcentaje de inhibición en función del logaritmo de la concentración del inhibidor, empleando el software GraphPad Prism.

Para garantizar el mejor ajuste a los datos experimentales, se exploraron dos modelos dosis-respuesta sigmoidales: un modelo estándar de tres parámetros y un modelo logístico con pendiente variable (cuatro parámetros). Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación general (Ec. 3), seleccionando para cada compuesto el modelo que proporcionó el mayor coeficiente de regresión (R^2):

$$Y = AI + \frac{AS-AI}{1+\left(\frac{X}{CI_{50}}\right)^H} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

- Y: porcentaje de inhibición del inhibidor evaluado,
- AI: asíntota inferior de la curva, correspondiente a la concentración más alta del inhibidor (respuesta mínima),
- AS: asíntota superior de la curva, correspondiente a la concentración más baja del inhibidor (respuesta máxima),
- X: concentración del inhibidor,
- CI_{50} : concentración del inhibidor requerida para alcanzar el 50% de la inhibición máxima,
- H: coeficiente o pendiente de Hill (el cual es calculado por el software en el modelo de cuatro parámetros, o fijado en un valor de 1 en el modelo de tres parámetros),

3.6 Caracterización del mecanismo de inhibición de la MPro

3.6.1. Ensayo de reversibilidad de la inhibición de MPro

Para determinar si la inhibición de la MPro por parte de los *hits* era reversible o irreversible, la proteasa (1 μ M) se incubó durante 1 h a 25 °C en ausencia (control) y en presencia de una concentración de inhibidor capaz de reducir la actividad enzimática en aproximadamente un 50% (concentración cercana a la CI_{50}). Para remover el exceso de compuesto, una fracción de cada muestra (200 μ L) se diafiltró (filtros Amicon Ultra-0,5, con un límite de exclusión de 10 kDa) por tres ciclos utilizando tampón de reacción. Tras la diafiltración, la concentración de proteasa recuperada se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro DeNovix DS-11. En todas las muestras (tratada o no con inhibidor y diafiltrada o no) se determinó la actividad de la MPro como se describe en la sección 3.5.1. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los datos se normalizaron con respecto a las muestras control (MPro no tratada con inhibidor y diafiltrada o no, según corresponda).

3.6.2. Ensayo de reversibilidad de inhibición de la MPro mediada por DTT

Para investigar si la inhibición de la MPro por los *hits* puede ser revertida o neutralizada por la acción de un agente reductor de tioles se evaluó la

dependencia de la inhibición de esta proteasa en presencia de DTT (1 mM, concentración final). Vale la pena aclarar que el DTT no solo tiene capacidad de reducir residuos de cisteína oxidados a ácido sulfénico o disulfuro, sino también de reaccionar con compuestos electrofílicos a través de su par de tioles totalmente accesibles al solvente. Para ello, se diseñaron tres tratamientos variando el orden de adición de los componentes y los tiempos de incubación (**Figura 14**). En todos los casos, el inhibidor se ensayó a una concentración que disminuye la actividad enzimática en al menos un 50% (concentración cercana a la CI_{50}). Las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

- **Condición A (Reversión inmediata de la inhibición):** La MPro se incubaba con el *hit* durante 60 min. Posteriormente, se agregan simultáneamente el sustrato y el DTT, y se registra la producción temporal de fluorescencia. Este tratamiento permite cuantificar la capacidad del agente reductor por revertir la inhibición de la enzima tras la formación previa del complejo enzima-inhibidor. Pone en evidencia si la inactivación inicial es inmediatamente reversible ante la presencia de un entorno reductor.
- **Condición B (Prevención de la inhibición):** La MPro se co-incubaba con el *hit* y DTT durante 60 min. Luego se agrega el sustrato y se registra la producción temporal de fluorescencia. Este tratamiento evalúa si la presencia temprana del agente reductor previene la inactivación de la enzima por competencia directa del agente reductor con el inhibidor.
- **Condición C (Reversión de la inhibición):** La MPro se incubaba con el *hit* durante 60 min. Seguidamente, se agrega DTT y la incubación se extiende por 30 min, tras lo cual se agrega el sustrato y se registra la producción temporal de fluorescencia. Este tratamiento aporta información sobre la capacidad del agente reductor para reducir cisteínas oxidadas por, o enlaces covalentes formados con, los *hits* y, de esta forma, restaurar la actividad catalítica. Proporciona información sobre la estabilidad del enlace y la naturaleza química de la interacción inhibidor-enzima.

Las condiciones generales empleadas para estos ensayos (tampón, temperatura, concentraciones de enzima y sustrato, y lecturas de fluorescencia) fueron idénticas a las descritas previamente en la sección 3.5. Todos los

tratamientos se analizaron por duplicado y los resultados se normalizaron respecto a sus controles correspondientes.

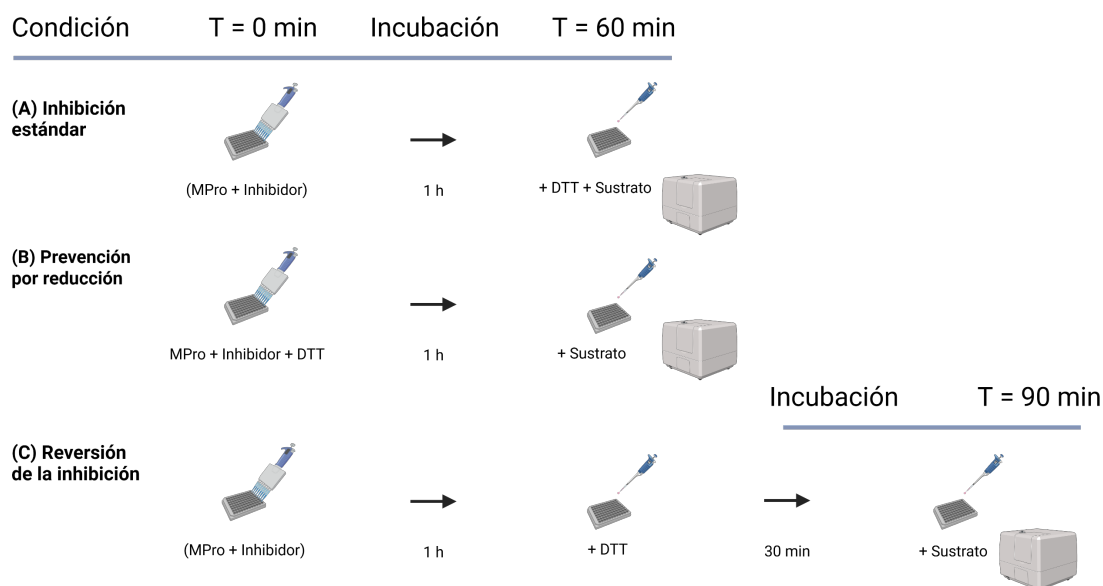


Figura 14. Esquema de los ensayos de inhibición de la MPro en presencia de DTT. Representación gráfica de la secuencia de adición de reactivos y tiempos de incubación para los tratamientos evaluados. **(A)** Ensayo de reversión inmediata de la inhibición. **(B)** Ensayo de prevención de la inhibición. **(C)** Ensayo de reversión de la inhibición.

3.7 Análisis de espectrometría de masas (LC-MS)

Esta actividad se llevó a cabo con la infraestructura disponible en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo, bajo asesoramiento y colaboración de la Dra. Rosario Durán (responsable) y el Técnico Dr. Alejandro Leyva.

3.7.1. Preparación y digestión de la muestra

Para identificar el/los residuos/s de la MPro que sufren modificaciones covalentes (oxidaciones o formación de aductos) luego de ser tratada con los *hits*, se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masa acoplado a separación por HPLC de los péptidos proteicos. La MPro se incubó con cada uno de los *hits* en una relación 1:142 (0,012:1,7 mM, MPro:*hit*) durante una hora a 25 °C y en tampón de reacción. Tras este período, las muestras se sometieron a diafiltración utilizando filtros Amicon Ultra (límite de exclusión de 10 kDa, Thermo

Fisher Scientific) mediante centrifugación a 14000 *g* durante 10 min para remover el exceso de compuesto libre. A continuación, se realizaron dos lavados con tampón bicarbonato de amonio (AMBIC) 50 mM, pH 8. Para evaluar la naturaleza química de la modificación, las muestras se dividieron en dos, y cada una de ellas fue incubada durante 30 min a 25 °C en ausencia y presencia de DTT 10 mM. Seguidamente, ambas muestras fueron tratadas con yodoacetamida (IAM) 50 mM en oscuridad durante 30 min.

Las muestras fueron lavadas nuevamente con AMBIC y posteriormente digeridas durante una noche a 37 °C utilizando quimiotripsina grado secuenciación (Sigma Aldrich) en una relación enzima:proteína de 1:100 (p/p). Los péptidos resultantes se recuperaron mediante centrifugación, lavando el filtro con 100 µL de ácido fórmico (AF) al 0,1% v/v (grado LC-MS, Thermo Scientific). Los filtrados se combinaron y se secaron al vacío utilizando un concentrador CentriVap (Labconco). Finalmente, los péptidos se resuspendieron en AF al 0,1% v/v y se desalaron utilizando puntas de extracción en fase sólida de fabricación propia (*StageTips*) empaquetadas con membrana Empore™ Octadecyl C18 (Supelco). Los *StageTips* fueron activados con metanol al 100% v/v y equilibrados con AF al 0,1% v/v. Los péptidos se eluyeron utilizando una solución de acetonitrilo (ACN) al 40% v/v con AF al 0,1% v/v, se secaron al vacío y se resuspendieron en el solvente de equilibrado para su posterior inyección en el sistema cromatográfico (**Figura 15**).

3.7.2. Análisis cromatográfico y espectrometría de masas (LC-MS/MS)

El análisis cromatográfico y de espectrometría de masas se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida nano-HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 240 (Thermo Scientific) mediante una fuente de ionización Easy-Spray. Las muestras se cargaron en una precolumna Acclaim PepMap™ 100 C18 (75 µm x 2 cm, tamaño de partícula de 3 µm, Thermo Scientific) y la separación se llevó a cabo en una columna analítica PepMap™ RSLC C18 (75 µm x 50 cm, tamaño de partícula de 2 µm, Thermo Scientific) mantenida a 40 °C. El sistema de solventes consistió en AF al 0,1% v/v en agua calidad LC-MS (Fase A) y AF al 0,1% v/v en ACN (Fase B, LiChrosolv, Merck). La separación se logró mediante un gradiente de

elución a un flujo de 200 nL/min, configurado de la siguiente manera: 1% a 35% de B durante 90 min, seguido de un incremento del 35% al 99% de B en 20 min.

El espectrómetro de masas se configuró en modo positivo con un método de adquisición de datos dependiente (DDA) de los 20 datos principales. El voltaje de ionización (*spray*) y la temperatura del capilar se fijaron en 2,0 kV y 250 °C, respectivamente. Los espectros de barrido completo se adquirieron en un rango de masa-carga (m/z) de 200 a 2000 con una resolución de 90000 a 200 m/z . La fragmentación de los iones precursores se realizó en una celda de disociación colisional de alta energía (HCD) con una resolución de 22500 a 200 m/z . El valor objetivo de control automático de ganancia (AGC) y el tiempo máximo de inyección de iones se configuraron en estándar y automático para los escaneos completos y de fragmentación. Se excluyeron para la fragmentación aquellos iones precursores sin carga asignada, con carga simple o con estados de carga superiores a 5. Se aplicó una energía de colisión normalizada (NCE) en pasos de 25, 30 y 35, con un tiempo de exclusión dinámica de 10 s.

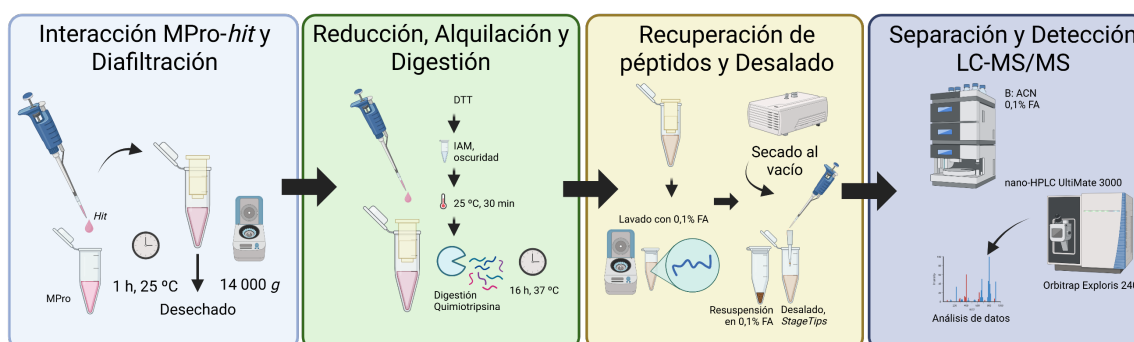


Figura 15. Flujo de trabajo para la preparación de muestras proteómicas y análisis mediante LC-MS/MS. Representación esquemática de las etapas experimentales empleadas para la identificación de modificaciones en la MPro. El esquema muestra las generalidades desde la incubación del complejo enzima-inhibidor hasta el análisis de datos.

3.7.3. Procesamiento de datos e identificación de péptidos

Para la identificación de los péptidos y el análisis cualitativo libre de marcaje, se empleó el software PatternLab for Proteomics. Los archivos de datos crudos generados por el espectrómetro de masas se contrastaron contra una base de datos objetivo-señuelo que contenía las secuencias del proteoma de la cepa de

expresión *E. coli* BL21 (DE3) y de la proteasa MPro de SARS-CoV-2 (descargadas de UniProt), así como la de los contaminantes más comunes en experimentos de proteómica.

En los parámetros de búsqueda, la tolerancia de masa para los iones precursores se estableció en 35 ppm. Como modificaciones variables se definieron: la oxidación de metioninas, la carbamidometilación de cisteínas (producto del tratamiento con IAM), los diferentes estados de oxidación de las cisteínas (ácido sulfénico, sulfínico, sulfónico y formación de disulfuros), y las modificaciones de masa generadas por la adición de los compuestos evaluados. Los resultados de la búsqueda fueron filtrados mediante el algoritmo SEPro (Search Engine Processor) de PatternLab, estableciendo un límite de Tasa de Falso Descubrimiento (FDR) $\leq 1\%$ a nivel de proteína y una tolerancia de 10 ppm para los iones precursores.

3.8 Ensayos de cristalización y difracción de Rayos X de complejos MPro-inhibidor

Esta actividad se llevó a cabo empleando la infraestructura disponible en la Unidad de Cristalografía de Proteínas (UCP) del Institut Pasteur de Montevideo, bajo el asesoramiento y colaboración del Dr. Alejandro Buschiazzi (responsable) y los Técnicos Nicole Larrieux y Joaquín Dalla Rizza. Para estos estudios estructurales, se seleccionaron *hits* representativos de diversas familias químicas que habían sido estudiadas previamente. Dichos compuestos fueron elegidos por ser inhibidores con potencia nanomolar contra la MPro, además de presentar actividad antiviral y carecer de citotoxicidad.

3.8.1. Ensayos de co-cristalización y optimización

Los ensayos de co-cristalización de la MPro con los *hits* seleccionados se realizaron en tampón de reacción (volumen total de 50 μL) incubando 148 μM de enzima con 1 mM de los compuestos durante 60 min a 25°C. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a ultrafiltración utilizando filtros Amicon Ultra-0,5 mL (MWCO 10 kDa, Millipore) e intercambiadas al tampón Tris 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, DMSO 5% v/v, pH 7,4. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 14000 *g* durante 10 min a 4 °C para eliminar el exceso de compuesto y posibles agregados que afecten la cristalización del complejo.

El cribado inicial de condiciones de cristalización (*screening*) se realizó mediante el método de difusión de vapor en gota sentada (*sitting drop*) utilizando placas CrystalQuick de 96 pocillos (Greiner Bio-One) y dispensación robótica (Honeybee963). Las gotas consistieron en 300 nL de mezcla de proteasa/inhibidor y reservorio, utilizando el kit comercial PEGs Suite (NeXtal). Las placas se incubaron a 20 °C bajo monitoreo periódico en lupa. Las condiciones que arrojaron cristales fueron optimizadas utilizando el método de difusión de vapor en gota colgante (*hanging drop*) en placas de 24 pocillos (Hampton Research). Para la optimización se empleó un robot Alchemist DT, variando la concentración de PEG entre 13% v/v y 31% v/v y el pH del tampón MES entre 6,4 y 6,7, con volúmenes de gota de hasta 4 µL (relaciones 1:2 o 2:2 de proteasa/reservorio) e incubación a 20°C.

3.8.2. Recolección de datos y resolución estructural

Los cristales obtenidos se manipularon bajo condiciones criogénicas y los datos de difracción de rayos X se colectaron en el difractómetro (Micromax007-HF, Rigaku / MAR345, Mar Research). El procesamiento cuantitativo y escalado de las imágenes de difracción se realizó utilizando el software Xia2. Posteriormente, la estructura se resolvió mediante el método de reemplazo molecular utilizando el programa Phaser, empleando como modelo de búsqueda la estructura cristalográfica de la MPro de SARS-CoV-2 depositada en el Protein Data Bank (PDB ID: 7ALH).

3.9 Determinación de la citotoxicidad de los *hits*

La citotoxicidad de los *hits* se determinó en la línea celular de epitelio pulmonar humano A549 (ATCC CCL-185) mediante el ensayo colorimétrico con el reactivo WST-1 (#11644807001, Roche). En este ensayo la actividad de enzimas mitocondriales y citoplasmáticas (ej. deshidrogenasas y reductasas), dependiente de cofactores reducidos (NADH y NADPH) generados por el metabolismo energético, catalizan la reducción de la sal de tetrazolio (color rojizo) presente en WST-1 hacia la especie formazán, la cual es soluble en agua y de color amarillo. Por lo que la cantidad de producto colorimétrico formado es directamente proporcional al número de células en la muestra que son

metabólicamente activas. Debajo se muestra un esquema de la reacción mediada por las deshidrogenasas/reductasas celulares (**Figura 16**):

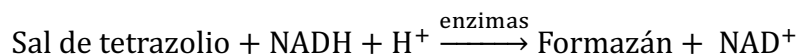


Figura 16. Fundamento bioquímico del ensayo de viabilidad celular. Representación esquemática de la reducción de la sal de tetrazolio a formazán, catalizada por deshidrogenasas y reductasas intracelulares utilizando NADH como donante de electrones.

Las células A549 se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Gibco) al 10% (v/v) y una solución antibiótico-antimicótica 1X (penicilina-estreptomicina; Gibco). Todas las incubaciones de los cultivos se realizaron a 37 °C en una atmósfera humidificada y de 5% CO₂. Para los ensayos, se utilizaron células con un máximo de diez pasajes. Para la preparación de los inóculos, la monocapa celular confluyente se desprendió enzimáticamente empleando 1 mL de solución de tripsina. La placa se incubó durante 4 min a 37 °C y 5% de CO₂, verificando el desprendimiento bajo microscopio óptico. Inmediatamente, la reacción enzimática se neutralizó añadiendo 1 mL de medio de cultivo completo. Para la cuantificación, se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular (100 µL de células en 900 µL de PBS). Tras una suave homogeneización, se cargaron 10 µL en cada lado de una cámara de Neubauer para determinar la concentración de células totales mediante microscopía óptica.

El ensayo se realizó en microplacas de cultivo transparentes de fondo plano de 96 pocillos. Por pocillo se sembraron 100 µL de una suspensión de densidad celular de 2x10⁵ células/mL y las placas se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 µL/pocillo de los *hits* diluidos en medio de cultivo DMEM (concentración 10 mM en 10% (v/v) DMSO + DMEM) de manera tal que la concentración final de compuesto esté entre 10-100 µM con 1% (v/v) DMSO (vehículo). Como controles se incluyeron pocillos de células: sin tratar (medio DMEM, 100% viabilidad), tratadas solo con vehículo (DMEM con DMSO al 1% v/v), tratadas con Tritón X-100 al 0,1% (v/v) (0% de viabilidad), y pocillos solo con medio de cultivo (blanco). Todas las condiciones

se evaluaron por triplicado. Luego de incubar las microplacas durante 24 h, el sobrenadante de los pocillos se retiró y se realizaron dos lavados con medio de cultivo DMEM fresco. Se agregó 100 µL/pocillo de una dilución 1:10 del reactivo WST-1 en medio de cultivo fresco y se procedió a incubar la microplaca durante 90 min. Al cabo de ese tiempo, se determinó la absorbancia a 450 nm y 620 nm en un lector de microplacas Multiskan FC.

Los datos se normalizaron frente a los controles descritos arriba y la citotoxicidad de cada *hit* se expresó como el porcentaje de viabilidad celular respecto al control vehículo. Para ello, a todos los valores de absorbancia absoluta se les sustrajo previamente la lectura del blanco de reacción (medio de cultivo sin células). Posteriormente, el porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente ecuación (Ec. 4):

$$\%Viabilidad = \left(\frac{A_{muestra} - A_{0\%}}{A_{100\%} - A_{0\%}} \right) * 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde:

- $A_{muestra}$: absorbancia corregida por el blanco del pocillo correspondiente al compuesto evaluado,
- $A_{100\%}$: absorbancia corregida por el blanco del control de 100% de viabilidad celular (células tratadas únicamente con el vehículo, 1% v/v DMSO),
- $A_{0\%}$: absorbancia corregida por el blanco del control de 0% de viabilidad celular (células tratadas con Triton X-100 al 0,1% v/v).

Finalmente, se estableció como criterio de citotoxicidad una viabilidad inferior al 50% a una concentración de 100 µM compuesto.

3.10 Ensayo de actividad anti-SARS-CoV-2 y citotoxicidad en células Vero

La actividad antiviral de los *hits* contra la MPro se determinó mediante un ensayo de infección celular por SARS-CoV-2 basado en fluorescencia (**Figura 17**), utilizando microplacas negras de 384 pocillos (placas µClear; Greiner Bio-One). Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Institut Pasteur de Corea siguiendo las directrices de los Institutos Nacionales de Salud de dicho

país. Los procedimientos se ejecutaron bajo estándares de Bioseguridad Nivel 3 (BSL-3), en cumplimiento con protocolos aprobados por la Agencia para el Control y la Prevención de Enfermedades de Corea (KDCA). El protocolo de ensayo es idéntico al descrito por Jeon y colaboradores⁸⁶ y se resume a continuación.

Las células Vero (ATCC CCL-81) se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Welgene) suplementado con SFB al 10% (v/v) y una solución de penicilina-estreptomicina 1X (Gibco), manteniéndose a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂. Por pocillo se sembraron 1,2x10⁴ células en medio DMEM, suplementado con SFB al 2% (v/v) y penicilina-estreptomicina 1X, y las microplacas se incubaron durante 24 h. A continuación, se añadieron los *hits* o fármacos control (difosfato de cloroquina de Sigma, remdesivir de MedChemExpress y lopinavir de Selleckchem) a diez concentraciones preparadas por diluciones seriadas al medio (rango de concentración = 50 a 0,05 µM) e inmediatamente se procedió a infectar las células con SARS-CoV-2 (cepa βCoV/KOR/KCDC03/2020)⁸⁷ a una MOI de 0,0125. Como control se incluyeron células no infectadas y no tratadas con los *hits* y fármacos. Todas las condiciones se ensayaron al menos por duplicado. Luego de incubar las microplacas durante 24 h, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) y fueron procesadas para análisis de inmunofluorescencia. Con ese fin se empleó un anticuerpo primario de conejo anti-proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2 (Sino Biological Inc.) y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (H+L) conjugado con Alexa Fluor 488, mientras que los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33,342 (Molecular Probes). Se adquirieron imágenes de microscopía de fluorescencia automatizada empleando el sistema Operetta CLS (PerkinElmer), las cuales se analizaron con el *software* Columbus™ (PerkinElmer) para cuantificar el número de células y la tasa de infección.

La actividad antiviral se normalizó con respecto al control sin infectar (células crecidas en medio de cultivo con DMSO al 0,5% v/v) y al control de infección sin tratamiento (células infectadas y crecidas en medio de cultivo con DMSO al 0,5% v/v). La citotoxicidad de los compuestos y fármacos se determinó mediante cuantificación de tinción de núcleos normalizada contra los controles. Los valores de CI₅₀ y CC₅₀ se calcularon a partir de datos ajustados a ecuaciones de regresión sigmoideal de dosis-respuesta empleando XLfit (versión 5.5) o

GraphPad Prism (versión 8.0). La calidad y robustez de cada ensayo se validó mediante el factor Z' y el coeficiente de variación porcentual (%CV).

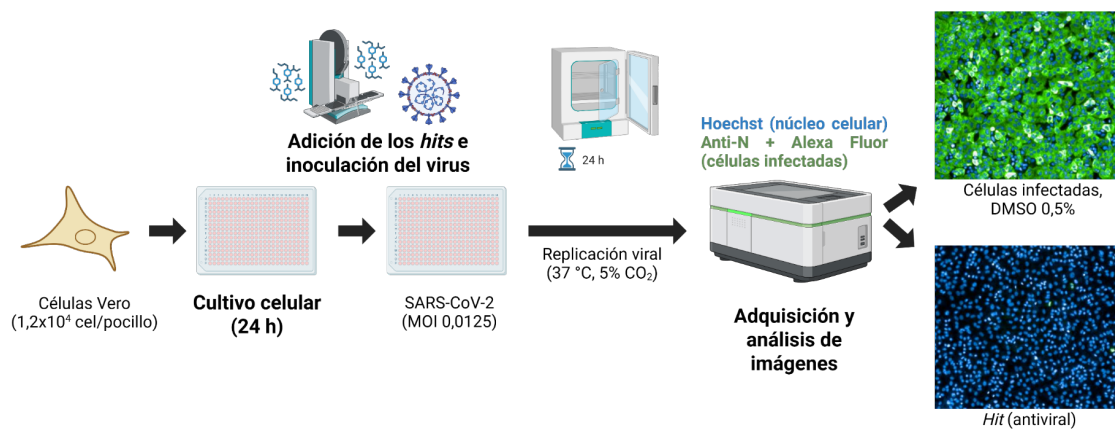


Figura 17. Flujo de trabajo del ensayo de infección por SARS-CoV-2 en células Vero. El esquema muestra las etapas principales del experimento. Las micrografías representativas (derecha) muestran la detección por inmunofluorescencia de la proteína de la nucleocápside (N, verde) y la tinción nuclear con Hoechst (azul).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo presenta el análisis de los resultados obtenidos en el marco de esta tesis de maestría. Inicialmente, se detalla la expresión y purificación de las proteasas recombinantes MPro y PLPro. Posteriormente, se presentan los resultados de cribado contra la MPro, contra-cribado de *hits* contra la PLPro y determinación de la CI_{50} para los compuestos candidatos. La discusión integra estos hallazgos con los datos de citotoxicidad en células de epitelio pulmonar humano y de actividad antiviral en el modelo celular de infección por SARS-CoV-2. Finalmente, se incorporan los resultados de caracterización de los *hits* mediante ensayos enzimáticos complementarios, espectrometría de masas y cristalografía de rayos X.

4.1 Expresión y purificación de las proteasas recombinantes MPro y PLPro de SARS-CoV-2

4.1.1. Proteasa Principal (MPro)

La forma recombinante de la MPro de SARS-CoV-2 (cepa Wuhan) se obtuvo mediante expresión heteróloga del plásmido pGEX-6P-1-MPro en bacterias *E. coli* cepa BL-21 (DE3) *pLysS*. Esta construcción permite expresar a la MPro fusionada en su extremo N-terminal a la glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST), mientras que en el extremo C-terminal se ubica una etiqueta de seis residuos de histidina (6xHis) precedida por un sitio de corte SGVTFQ↓GP que es específico para la enzima 3C de rinovirus humano, denominada PreScission. Este sitio se diferencia del sitio de corte de la MPro en que tiene una prolina en el P2' en lugar de una lisina, con esta modificación la MPro no se puede auto procesar manteniéndose el tándem de His en el C-terminal⁸⁸. Por lo tanto, el tratamiento de la muestra con esta proteasa permite separar la etiqueta 6xHis. Además, la secuencia de la MPro posee en su extremo N-terminal un sitio de auto-proteólisis AVLQ↓SG⁸⁹, por lo que una vez plegada, la proteasa se autocliva liberándose de la proteína de fusión GST.

Se alcanzaron niveles de expresión de la proteína recombinante (~10 mg de proteína por litro de cultivo bacteriano) de forma soluble, con alto nivel de pureza y activa (**Figura 18**). Para esto, luego de expresar a la proteína, se aplicaron tres técnicas cromatográficas distintas y en serie: afinidad por metales inmovilizados (IMAC), cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía de exclusión

molecular (SEC). La pureza obtenida fue superior al 95% determinada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (**Figura 18**). Los parámetros observados durante los distintos pasos de expresión y purificación, así como el rendimiento final alcanzado para este lote, resultaron consistentes con las producciones previas estandarizadas por nuestro grupo de investigación. A continuación, se describen los resultados obtenidos para este proceso de producción.

Luego del primer paso de IMAC se obtuvo la MPro con un peso molecular (PM) aproximado de 35 kDa (IMAC 1 – eluato en **Figura 18**) compatible con la forma nativa (PM teórica de la forma nativa = 34 kDa), con la presencia de la etiqueta C-terminal de 6xHis y residuos adicionales del sitio de corte de la PreScission. Al tratar la muestra del eluato de la IMAC 1 con PreScission (Dialisis-PreScission en **Figura 18**) se puede observar una reducción en el PM de la banda correspondiente a la MPro y la recuperación de la misma en el percolado de la segunda IMAC, lo cual demuestra que la remoción de la cola de histidinas fue eficiente.

La presencia de una banda minoritaria (menos del 10 %) de la MPro en el carril del eluato de la IMAC 2 presenta el mismo PM que la fracción clivada, lo que confirma que el corte enzimático fue exitoso. Su retención en esta fracción sugiere un arrastre debido a un lavado insuficiente de la columna previo a la elución (**Figura 18**). Por otro lado, como era de esperar, no se observa presencia de bandas de ~20 kDa en la muestra del percolado, pero sí en la del eluato, la cual correspondería a la PreScission etiquetada con histidinas (incluida como control en el carril PreScission de la **Figura 18**).

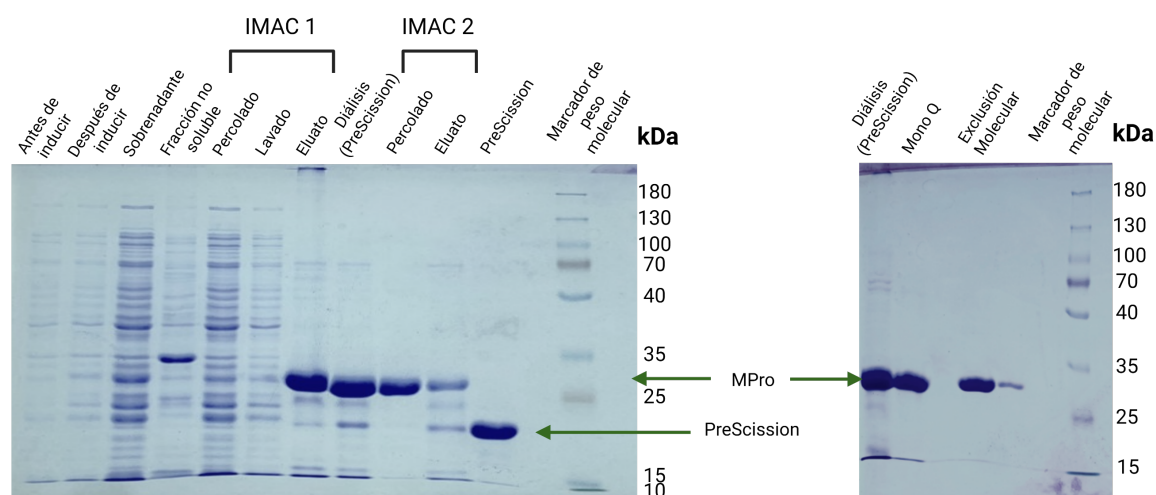


Figura 18. Expresión y purificación de la MPro recombinante en *E. coli*. Análisis por SDS-PAGE (12%). El panel izquierdo detalla las etapas de expresión y purificación por IMAC (columna Ni-NTA) de la MPro (~34 kDa), así como el clivaje mediante la proteasa PreScission (3C de rinovirus humano; ~20 kDa), que remueve la etiqueta de 6xHis. El panel derecho muestra las fracciones finales de las cromatografías de intercambio iónico (columna Mono Q) y exclusión molecular, obteniendo una pureza $\geq 95\%$. El marcador de peso molecular empleado es el PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (rango de PM = 10 a 180 kDa).

Tal como se observa en el percolado de la IMAC 2, aún persisten en esta muestra algunas bandas correspondientes a proteínas contaminantes. Por lo tanto, con el fin de incrementar el nivel de pureza de la MPro, se aplicaron dos pasos cromatográficos adicionales (**Figura 19**). En primera instancia, la muestra se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en columna Mono Q (**Figura 19**). El perfil de elución reveló un pico mayoritario y bien definido correspondiente a la enzima MPro, el cual eluyó a una conductividad de 5,0 mS/cm, equivalente a una concentración de NaCl de aproximadamente 25 mM (**Figura 19A**). Debido a la elevada concentración de proteína presente en esta fracción, la señal de absorbancia a 280 nm presentó saturación (> 7000 mAU), lo cual se correlacionó con una perturbación transitoria en la señal de conductividad. Por otro lado, el incremento de la fuerza iónica durante el gradiente dio lugar a la elución de un segundo pico de menor absorbancia a 280 nm, menos abrupto y de mayor amplitud, el cual se desprendió a una conductividad de 6,7 mS/cm, correspondiente a una concentración de NaCl de aproximadamente 129 mM. Esta fracción no fue analizada por electroforesis en

gel ni por espectrometría de masas por lo que su naturaleza molecular es desconocida. No obstante, es probable que la misma se componga de proteínas de *E. coli* o variantes de la MPro, bajo la forma de homo- o hetero-complejos covalentes o no, con distinta densidad de carga. Este resultado, confirma la pertinencia de haber realizado este segundo paso cromatográfico para eliminar estas especies.

Como paso final, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna Superdex 75 16/60 (**Figura 19B**) que no solo permite realizar un “pulido” final de la muestra sino también evaluar la estructura cuaternaria de la proteína en solución. El perfil de elución obtenido muestra un único pico simétrico, con un volumen de elución de ~59 mL.

La determinación del estado oligomérico de la MPro recombinante mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) reveló un único pico con una masa molecular aparente de ~44,4 kDa. Aunque la MPro requiere obligatoriamente de la dimerización para constituir un sitio activo funcional⁴⁴, la enzima exhibe un equilibrio dinámico monómero-dímero en solución dependiente de la concentración, con una constante de disociación (K_d) reportada en el rango micromolar bajo^{90–92}. El comportamiento cromatográfico observado es atribuible a la significativa dilución que sufre la muestra durante su partición en la matriz de la columna, lo cual desplaza el equilibrio hacia la forma monomérica. La discrepancia entre la masa aparente observada (~44,4 kDa) y la masa teórica del monómero (34 kDa) concuerda con el aumento del radio hidrodinámico esperado para una subunidad disociada, la cual expone la interfaz de dimerización del dominio III y pierde la esfericidad ideal frente a los estándares de calibración⁹³.

Es importante destacar que, si bien la concentración final de la MPro empleada en los ensayos enzimáticos *in vitro* (90 nM) se encuentra por debajo de la constante de disociación reportada para el dímero, la enzima retuvo plena actividad catalítica. Este fenómeno es característico y se explica mediante un mecanismo de dimerización inducida por el sustrato. La unión del péptido fluorogénico al sitio activo estabiliza conformacionalmente la interfaz de dimerización, disminuyendo drásticamente el K_d aparente y desplazando el equilibrio hacia la forma oligomérica catalíticamente competente, permitiendo así la evaluación rigurosa de los compuestos.

Por otra parte, la ausencia de picos de absorción en el volumen muerto de la columna confirma la ausencia de especies supramoleculares de la enzima (ej. agregados o complejos multiméricos).

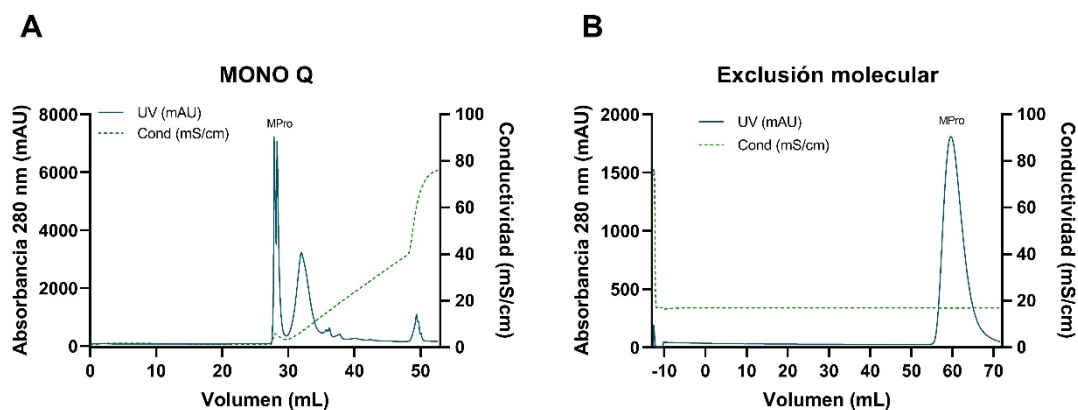


Figura 19. Perfiles cromatográficos de purificado de la MPro. (A) Cromatografía de intercambio iónico (columna Mono Q), la línea continua representa la A_{280} y la línea punteada la conductividad (mS/cm). Se destaca el pico abrupto y de mayor absorbancia que eluye a una conductividad de 5,0 mS/cm (equivalente a una fuerza iónica de ~25 mM de NaCl) y corresponde a la MPro. **(B)** Cromatografía de exclusión molecular (columna Superdex 75 16/60), de la fracción de elución de la MPro obtenida por intercambio iónico. Se observa un pico único y simétrico de elución a los 59 mL correspondiente a una masa molecular aparente de ~44,4 kDa. Este valor experimental indica que, como consecuencia de la dilución intrínseca del sistema cromatográfico, el equilibrio de la enzima se encuentra desplazado hacia su estado monomérico (masa teórica de la subunidad: 34 kDa).

Tanto el rendimiento como el nivel de pureza y actividad (ver sección 3.3 y 3.5.1) alcanzados para la forma recombinante de esta proteasa cumplen los criterios de calidad necesarios para abordar los ensayos de cribado, de modo de inhibición y de cristalización.

4.1.2. Proteasa similar a la papaína (PLPro)

La expresión de la PLPro recombinante con etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal se llevó a cabo en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* empleando el vector pET28b-PLPro. Al igual que para la MPro, la expresión de la PLPro se indujo con agregado de 0,5 mM de IPTG, pero a diferencia de la primera, el cultivo post-

inducción se realizó a menor temperatura (18 °C vs. 37 °C) y por un tiempo más prolongado (~18 horas *versus* 4 horas). La reducción de la temperatura buscó ralentizar la cinética de síntesis proteica para evitar el estrés celular excesivo y la consecuente agregación proteica, fenómeno reportado para esta proteína^{94,95}.

Por otro lado, el medio de cultivo fue suplementado con ZnCl₂, dado que la presencia de este metal es clave para la estabilidad del dominio de “dedo de zinc” de la PLPro y por lo tanto para el plegamiento correcto de la proteína^{47,96}. En el marco de esta tesis se produjo un lote de proteína recombinante con una pureza superior al 95% y un rendimiento final de ~3 mg de PLPro por litro de cultivo bacteriano, el cual es al menos 3 veces inferior al obtenido para la MPro.

Al igual que para los procedimientos empleados para la producción de la MPro, la expresión y purificación de la PLPro resultaron consistentes con las producciones previas estandarizadas por nuestro grupo de investigación. A continuación, se describen los resultados para este proceso de producción.

Como se observa en el gel de electroforesis de la **Figura 20**, se alcanzan niveles altos de expresión de la PLPro recombinante (banda de ~37 kDa *versus* PM teórico de 36,6 kDa para la PLPro-6xHis) aunque la mayoría está presente en la fracción insoluble del extracto celular y de manera muy minoritaria en la fracción soluble. Este resultado sugiere que en este sistema de expresión y condiciones, la PLPro posee una tendencia a la agregación durante su expresión, formando cuerpos de inclusión^{25,94}. Este fenómeno puede originarse por restricciones en la tasa de coordinación del ion Zn²⁺ que tienden a desestabilizar la región de “dedos de zinc” y exponen regiones hidrofóbicas de la proteína que normalmente no se hayan expuestas al solvente⁹⁷.

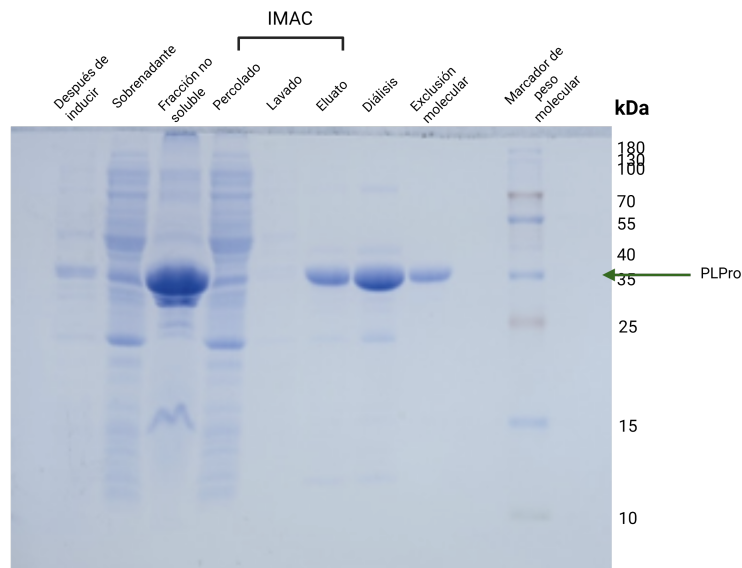


Figura 20. Expresión y purificación de PLPro recombinante en *E. coli*. Análisis por SDS-PAGE (12%) de las distintas fracciones del proceso de obtención de la proteasa. La flecha verde indica la banda correspondiente a la PLPro (~37 kDa). El marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (rango de PM de 10 a 180 kDa).

Esta fracción soluble fue aplicada a una columna de IMAC lo cual no solo permitió concentrar la muestra por un factor de 12,5x respecto al volumen del extracto cargado (carril Eluato-IMAC, **Figura 20**), sino también eliminar de esta muestra un gran número de proteínas contaminantes (carril Sobrenadante y Percolado-IMAC, **Figura 20**). La pérdida de la PLPro en el paso de lavado de esta columna de afinidad fue insignificante (Lavado-IMAC, **Figura 20**).

Luego de realizar un cambio de tampón en la fracción del eluato de la IMAC mediante diálisis, esta muestra se aplicó a una resina de exclusión molecular (Superdex 75 16/60). El perfil cromatográfico muestra un pico minoritario con un volumen de retención de ~48 mL (**Figura 21**), el cual corresponde a especies de alto PM (> 100 kDa) y, dada la homogeneidad del eluato de la IMAC, seguramente sean agregados multiméricos de la PLPro. El principal pico de elución corresponde a una especie de mayor abundancia y altamente homogénea (evidenciado por la simetría y alta absorbancia) que presenta un volumen de retención de ~66 mL. De acuerdo con la calibración del sistema cromatográfico, el radio hidrodinámico correspondiente a este volumen de retención es compatible con una masa molecular aparente de ~31,2 kDa. El

constructo recombinante PLPro-6xHis posee una masa teórica de ~36,6 kDa y una arquitectura asimétrica. Dado que la masa aparente estimada experimentalmente resulta menor a la teórica, este comportamiento cromatográfico sugiere que la proteína adopta una conformación globular compacta y no desplegada en solución, lo cual genera volúmenes de retención mayores a los esperados.

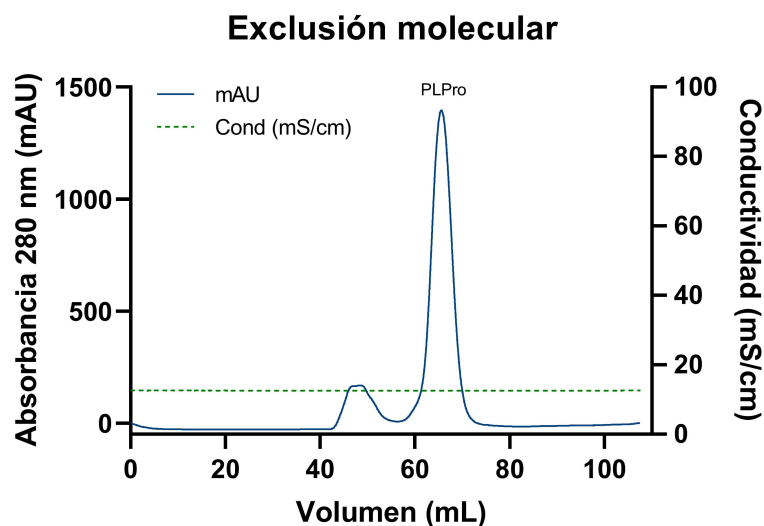


Figura 21. Perfil de elución de la PLPro recombinante en cromatografía de exclusión molecular. El cromatograma muestra la absorbancia a 280 nm (línea azul sólida) y la conductividad (línea punteada verde).

4.2 Validación de los ensayos para el cribado enzimático de compuestos contra la MPro y la PLPro

Una vez obtenidas las proteasas recombinantes, se confirmó que presentaran actividad catalítica y se validó la robustez y sensibilidad de las condiciones de cada uno de los ensayos contra estas enzimas para el cribado de compuestos.

En el caso de la MPro, en primer lugar, se determinaron los parámetros cinéticos evaluando la velocidad inicial de hidrólisis en función de la concentración de sustrato (**Figura 22**).

El ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,837$) permitió calcular un valor de K_M aparente de $31,8 \pm 12,1 \mu\text{M}$ y una velocidad máxima (V_{max}) de $0,011 \mu\text{M/s}$. Este parámetro de afinidad se encuentra en el mismo orden de magnitud que los valores reportados

en la literatura para sustrato análogos ($15 \mu\text{M}^{98-100}$), lo cual valida la viabilidad y sensibilidad del sistema analítico.

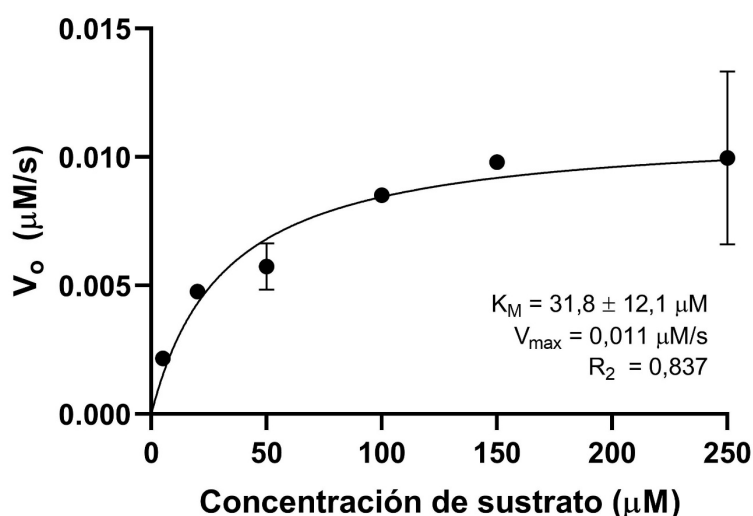


Figura 22. Determinación de los parámetros cinéticos de la proteasa MPro. Velocidad inicial (V_0) de hidrólisis catalizada por la MPro recombinante (90 nM) en función de la concentración del sustrato fluorogénico (2-250 μM). Los puntos representan el promedio de los datos experimentales y la línea muestra el ajuste no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten. Se indican los valores calculados para la constante de Michaelis-Menten (K_M), la velocidad máxima ($V_{\max}$) y el coeficiente de determinación (R^2).

La caracterización cinética de la PLPro, realizada en el laboratorio antes del inicio de este posgrado, mostró una correlación positiva y dependencia lineal (no saturable) entre la velocidad de la reacción *versus* la concentración del sustrato (Z-RLRGG-AMC) para un rango de concentraciones entre 1 y 200 μM . Esto indica que el valor de K_M es mayor que 200 μM , lo cual concuerda con reportes de la literatura (K_M con valores del orden de 50–100 μM para este mismo sustrato) ^{47,101}.

A partir de esos resultados y con la finalidad de establecer condiciones de cribado que permitan detectar inhibidores competitivos lentos (requieren tiempos más prolongados para alcanzar el equilibrio entre la enzima libre, el inhibidor y el complejo enzima–inhibidor)¹⁰² y/o de baja afinidad, se ensayó la actividad de las enzimas (90 nM para la MPro y 200 nM para la PLPro) luego de una pre-incubación de las mismas en ausencia de sustratos y presencia o no del inhibidor de referencia Ebselen (EbSe 0,1 μM o 5 μM , respectivamente) durante 60 min a

28 °C en buffer de reacción. Este compuesto es un inhibidor covalente pleiotrópico de referencia para proteasas dependientes de cisteínas^{103–105}. Al cabo de ese tiempo, se agregaron los respectivos sustratos a una concentración de 5 μ M, la cual es 6 a 40 veces inferior al valor de los K_M para la MPro (30 μ M) y de la PLPro (>200 μ M), respectivamente, y se registró la fluorescencia resultante durante una hora a 25 °C. Si bien estas condiciones de ensayo, donde $[S] \leq K_M$, aumenta la probabilidad de identificar inhibidores competitivos con afinidades débiles o moderadas, lo cual no se vería favorecido al emplear concentraciones saturantes de sustrato, las mismas son menos favorables para la detección de inhibidores acompetitivos, cuya actividad depende de la formación previa del complejo enzima-sustrato.

Como se observa en la **Figura 23A**, bajo estas condiciones, la generación de producto por la MPro mostró un incremento lineal y sostenido durante los primeros 25 min. A partir de ese tiempo, la generación de señal de fluorescencia pierde linealidad, indicando que el intervalo de 0 a 23 min corresponde a condiciones de velocidad inicial de reacción. Para esta misma ventana de tiempo, la actividad de la enzima tratada con EbSe fue despreciable (<1% respecto de la enzima no tratada).

De manera análoga, la PLPro mostró una formación lineal de producto que se extendió hasta los primeros 1400 s de reacción aproximadamente (**Figura 23B**). Por el contrario, la muestra de enzima incubada con 5 μ M EbSe careció totalmente de actividad.

Estos resultados confirman que, bajo las condiciones ensayadas, ambas enzimas retienen actividad luego de las pre-incubaciones (60 min a 28 °C), que dicha actividad muestra un comportamiento lineal en un curso temporal razonable y que son susceptibles a ser inhibidas con alta efectividad por un compuesto de referencia (EbSe). Otro dato importante es la baja dispersión de datos observadas en las tres réplicas realizadas para cada enzima (**Figura 23**), lo cual sugiere una alta reproducibilidad del ensayo.

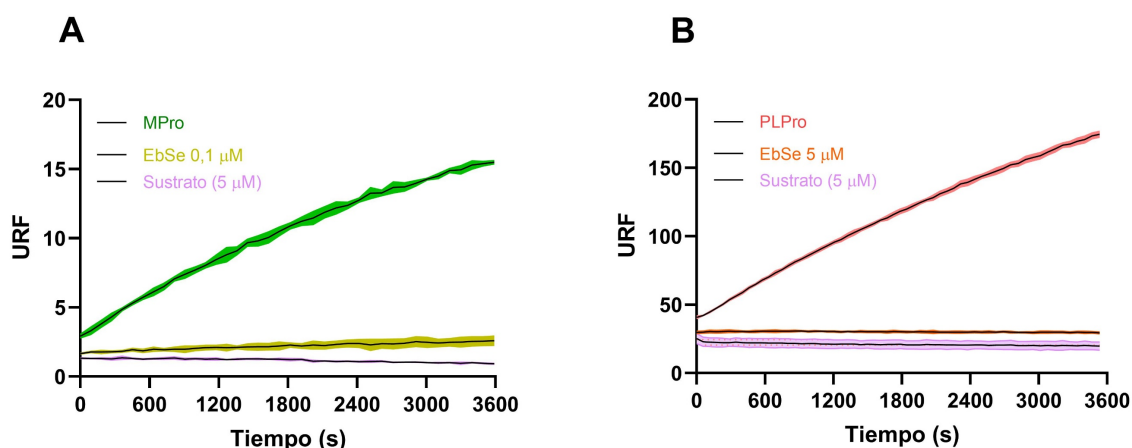


Figura 23. Ensayo cinético para el cribado de inhibidores. Curso temporal de la actividad proteolítica de **(A)** MPro (90 nM) pre-incubada o no con EbSe (0,1 μM) y **(B)** PLPro (200 nM) pre-incubada o no con EbSe (5 μM). En ambos paneles se incluye el registro temporal del blanco de reacción (sustrato 5 μM en ausencia de enzima), empleado como línea de fluorescencia basal para el cálculo del coeficiente señal/ruido. Los valores se expresan como Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). Las curvas de progresión representan el valor medio de los ensayos realizados por triplicado, donde el área sombreada alrededor de cada línea indica la desviación estándar ($\pm$ SD).

No obstante, para validar la robustez del ensayo y para distinguir compuestos activos de los que no lo son, se procedió a analizar el coeficiente señal/ruido y el factor Z' durante el curso temporal de la reacción. El primero de estos parámetros permite definir la ventana de tiempo en la cual existe una buena separación entre la señal de fluorescencia basal y la del producto de interés. Esto en parte determina el rango dinámico del ensayo para el cual las mediciones resultan confiables y no están enmascaradas por la señal basal. Para nuestros ensayos consideramos que tiempos de reacción con valores superiores a 7 son óptimos para realizar cálculos de actividad.

Al igual que el coeficiente señal/ruido, el factor Z' es un parámetro adimensional que, a diferencia del primero, no solo evalúa la ventana dinámica del ensayo, sino también la capacidad de éste para discriminar señales positivas de señales negativas. Para ello, la ecuación para calcular el factor Z' considera no solo la diferencia entre los valores promedio de esas señales sino también la dispersión o desviación estándar de los mismos⁸⁵. De acuerdo con los criterios comúnmente utilizados para ensayos de cribado, valores de Z' superiores a 0,5 indican condiciones aptas para identificar compuestos activos y no activos,

valores entre 0,7-0,9 refieren a ensayos con excelente poder de discriminación y cuando este valor iguala a 1 se considera ideal la condición de ensayo. En este trabajo, optamos por fijar un valor de factor Z' superior a 0,7 para considerar como satisfactorias las condiciones de ensayo de cribado ya que nos asegura que dentro del 70% del rango dinámico de nuestros ensayos la identificación de *hits* no estará influenciada por interferencias debidas a “ruido” del sistema de ensayo.

Como se observa en la **Figura 24**, a partir de los 7 min y 4 min de iniciada la reacción catalizada por la MPro y por la PLPro, respectivamente, se alcanzan valores de factor $Z' > 0,7$. Para la mayoría de los tiempos subsiguientes y para las reacciones catalizadas por ambas enzimas, las cifras del factor Z' están por encima de ese punto de corte. No obstante, se puede observar que en el curso temporal este parámetro alcanza valores mayores y con menor nivel de dispersión para la PLPro (**Figura 24B**) respecto de la MPro (**Figura 24A**).

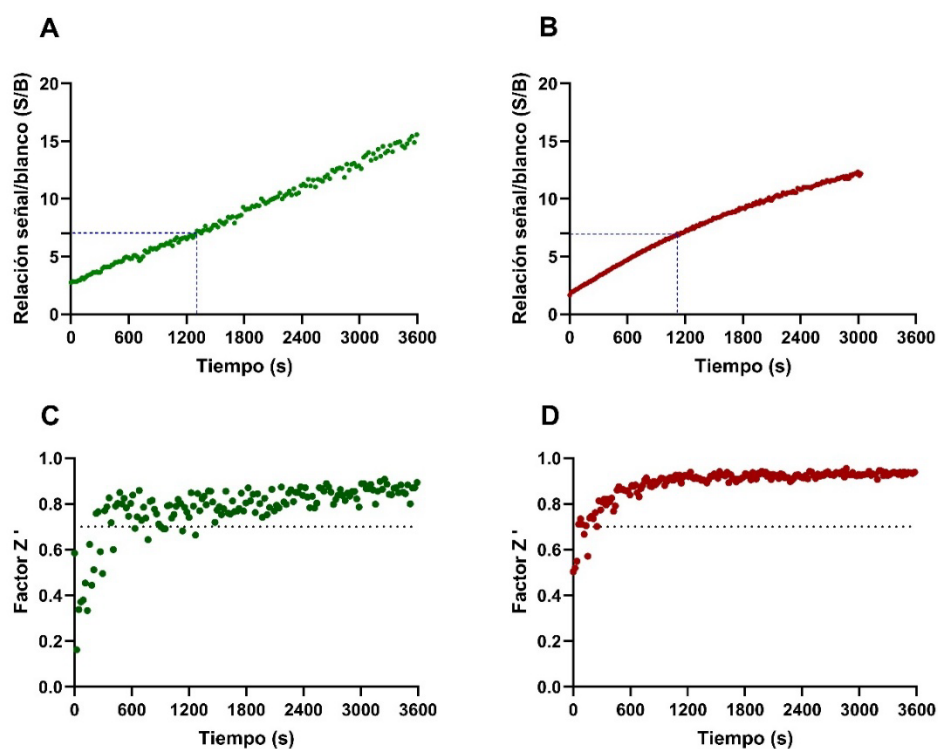


Figura 24. Análisis del coeficiente señal/ruido y factor Z' en ensayos de actividad de la MPro y la PLPro. Curso temporal de la relación señal/ruido (S/B) para (A) MPro y (B) PLPro, donde las líneas azules discontinuas marcan el tiempo óptimo en el cual se alcanza el criterio de aceptación de $S/B > 7$ (~1200 s). Análisis del factor Z' a lo largo de la reacción para (C) MPro y (D) PLPro; la línea horizontal punteada señala el umbral

crítico de aceptación en 0,7. Ebselen (EbSe) fue el control de inhibición total para ambas enzimas.

Estas pruebas brindaron información valiosa sobre las ventanas de tiempo a las cuales es conveniente realizar mediciones para obtener datos confiables durante el cribado de los compuestos. También permitieron validar la robustez de los ensayos de actividad para ambas enzimas, particularmente los excelentes valores de factor Z' obtenidos ($>0,7$), los cuales indican que la probabilidad de identificar un *hit* falso positivo es estadísticamente despreciable (ej. típicamente $< 0,13\%$ para datos que presenten una distribución Gaussiana normal).

4.3 Cribado experimental de quimioteca

Tras corroborar la robustez y sensibilidad de los ensayos enzimáticos *in vitro* para ambas proteasas, la siguiente etapa consistió en la evaluación de la colección de compuestos de una quimioteca disponible en el laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas (BRT), la cual fue ensamblada a partir del aporte de moléculas por grupos de síntesis química orgánica e inorgánica tanto del país como del exterior.

4.3.1. Identificación de inhibidores de MPro de SARS-CoV-2

Se evaluó la capacidad inhibitoria de 403 compuestos de la quimioteca local, pertenecientes a 17 familias químicas diferentes (**Tabla 1**) y a un conjunto de compuestos individuales y denominados *singletons* ya que por su número reducido no llegan a conformar familias. Estos compuestos se dividieron en dos grandes grupos de cribado para su análisis: **1)** compuestos que participaron en el cribado *in silico* previo de Ruatta y colaboradores (2023)⁶¹ ($n = 358$) y **2)** compuestos excluidos del tamizaje *in silico* ($n = 45$). La exclusión de este segundo grupo respondió a dos motivos concretos: la incorporación reciente de moléculas tras la actualización de la quimioteca (rotenoides; $n = 34$), y la limitación de los descriptores moleculares estándar y los campos de fuerza computacionales para parametrizar adecuadamente los enlaces de coordinación con metales de transición (complejos organometálicos; $n = 11$).

El ensayo de cribado contra MPro se realizó con los compuestos a una concentración fija de 25 μM . Este cribado experimental permitió identificar un total de 17 *hits* distribuidos en 17 familias químicas (**Figura 25 y Tabla 1**),

definidos por su capacidad de reducir la actividad enzimática de la MPro en más de un 50%.

La tasa de éxito de *hits* fue de 4,2%, un valor cercano al reportado en la literatura para campañas de cribado contra blanco molecular realizados sobre quimiotecas de composición azarosa (no sesgada), el cual normalmente ronda el 1-2%^{61,106}. La mayor tasa de *hits* obtenida en nuestra campaña puede deberse a diferencias en las condiciones del ensayo de cribado, que, en nuestro caso, y tal como era nuestra intención, estarían favoreciendo la detección de inhibidores lentos (ej. pre-incubación enzima-compuesto) o de baja afinidad (ej. $[S] < K_M$ y concentración alta de compuesto 25 μM).

La determinación de la CI_{50} para los *hits* reveló un rango de potencia inhibitoria amplio que comprende dos órdenes de magnitud ($CI_{50} = 0,15-25 \mu M$). La mayoría de los *hits* presentaron una potencia inhibitoria moderada (en el rango micromolar medio de dos dígitos μM), donde 15 de ellos pertenecen a cuatro familias químicas (derivados de rotenoides, de pirazopiridopirimidinas, de complejos metalo-orgánicos y de piranonas) y uno es un *singleton*. De acuerdo con el porcentaje de *hits* identificados las familias se pueden ordenar de la siguiente forma: complejos organometálicos (45%) > piranonas (12%) = rotenoides (12%) ~ pirazolopiridopirimidinas (10%) > *singletons* (1%). La diversidad estructural y química (ej. grupos reactivos, centros de coordinación) aportada por las distintas familias de *hits* sugiere que estos compuestos podrían presentar distintos modos de unión e inhibición de la proteasa.

Tabla 1. Familias químicas y resultados del cribado enzimático *in vitro* contra la MPro.

Familia química	Compuestos evaluados	<i>Hits</i>	<i>Hit-ratio</i> (%)
Rotenoides y derivados	34	4	11,8
Naftoquinonas	1	0	--
Paullones y derivados indólicos	82	0	--
Pirazolopiridopirimidinas	49	5	10,2
Pirazoloazepinas	6	0	--
Pirrolopirimidinas	1	0	--

Poliaminas alifáticas	13	0	--
Complejos organometálicos de Rutenio y Vanadio	11	5	45,5
Benzofuroxanos y derivados Benzimidazólicos	5	0	--
Sistemas aromáticos policíclicos planos (cumarinas, antracenos y fenantrenos)	6	0	--
Derivados conjugados de indolenina y pirazolopiridina	13	0	--
Aminopurinas trisustituidas	2	0	--
Diarilaminopirimidinas	7	0	--
Bis, Tris-tiazoles	3	0	--
Derivados híbridos de tiazol-piperazina	4	0	--
Derivados de purinas	2	0	--
Derivados de piranonas	8	1	12,5
Estructuras no reveladas (quimioteca ciega)	69	0	--
Singletons			
Colección de Atomwise	84	1	2,3
Singletons	3	1	
TOTAL	403	17	4,2

Nota: La actividad de la MPro recombinante se evaluó mediante un ensayo fluorométrico continuo basado en FRET. Todos los compuestos fueron evaluados a una concentración fija de 25 μ M. Se definió como hit a todo compuesto que demostró un porcentaje de inhibición igual o superior al 50% respecto al control. El hit-ratio se calcula como el porcentaje de compuestos activos sobre el total evaluado por familia.

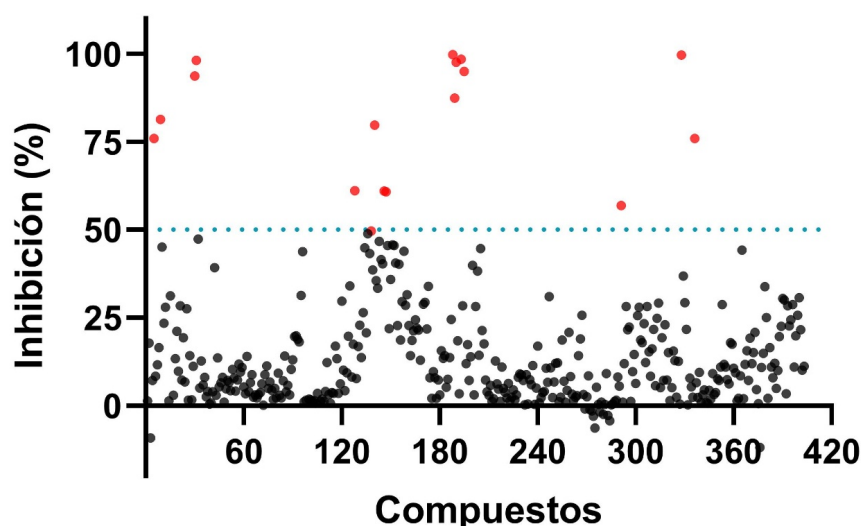


Figura 25. Resultados del cribado experimental de 403 compuestos contra la MPro de SARS-CoV-2. Gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de MPro por parte de los 403 compuestos analizados. Las evaluaciones se realizaron a una concentración fija de 25 μ M para cada molécula. La línea punteada horizontal indica el umbral de inhibición (*cut-off*) establecido para definir como *hit* a una molécula activa: 50% de inhibición de MPro. Los puntos resaltados en rojo corresponden a los 17 compuestos identificados como *hits*.

4.3.2.1 Identidad estructural de los hits de la quimioteca evaluada

Como se detalló en la sección anterior (4.3.1), el ensayo primario evaluó la capacidad inhibitoria de 403 compuestos de la quimioteca local. Este conjunto exhibe una notable diversidad estructural, abarcando 17 familias químicas definidas (**Tabla 1**) y un grupo de moléculas individuales estructuralmente únicas, denominadas *singletons*.

Operativamente, la quimioteca comprende dos grandes grupos definidos por su participación en el tamizaje virtual previo reportado por Ruatta y colaboradores (2023). El primer grupo ($n = 358$) corresponde a las moléculas evaluadas *in silico*. El segundo grupo ($n = 45$) agrupa a los compuestos excluidos de dicho modelo, ya sea por su incorporación reciente a la biblioteca (familia de rotenoides; $n = 34$) o debido a la dificultad metodológica de los campos de fuerza computacionales estándar para parametrizar de forma precisa los enlaces de coordinación con metales de transición (complejos organometálicos de rutenio; $n = 11$).

Para profundizar en el perfil farmacofórico de las moléculas activas y establecer relaciones estructura-actividad preliminares, se analizó la distribución de los 17 *hits* experimentales identificados en función de su núcleo químico. (Figura 26).

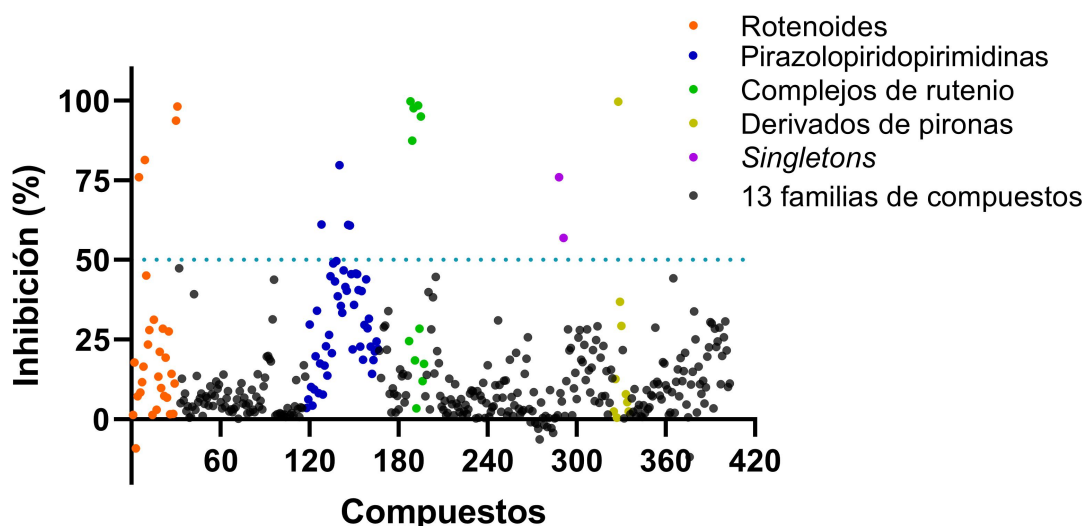


Figura 26. Agrupación estructural de los *hits* identificados en el cribado experimental contra la MPro de SARS-CoV-2. Porcentaje de inhibición enzimática evaluado a una concentración fija de 25 μ M para los 403 compuestos de la quimioteca. La línea horizontal punteada indica el umbral de actividad (*cut-off*) establecido en $\geq 50\%$ de inhibición. Los 17 compuestos activos (*hits*) se destacan coloreados según su familia química: rotenoides (naranja), pirazolopiridopirimidinas (azul), complejos de rutenio (verde), derivados de pironas (amarillo) y *singletons* o moléculas huérfanas (rojo). Los marcadores en gris representan a los compuestos que no superaron el umbral de inhibición.

4.3.2. Análisis estructural de los *hits* provenientes del tamizaje computacional

4.3.2.2 Pirazolopiridopirimidinas

La familia de las pirazolopiridopirimidinas (**Figura 27**) arrojó un total de cinco *hits* representando una tasa de éxito del 10,2% y con valores CI_{50} entre 13,4-25 μ M (**Figura A5**).

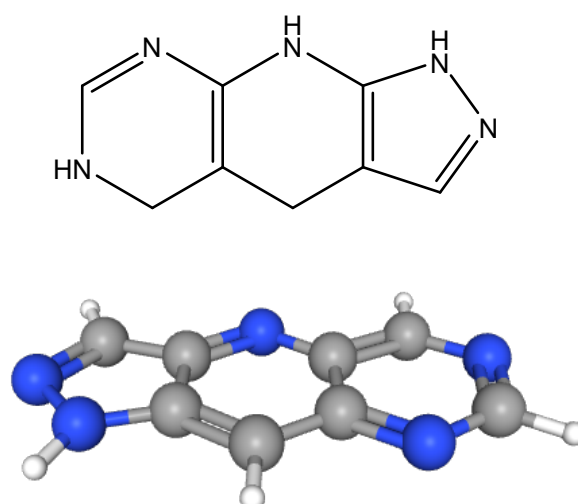
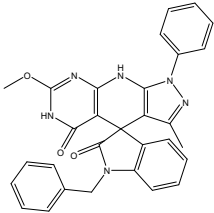
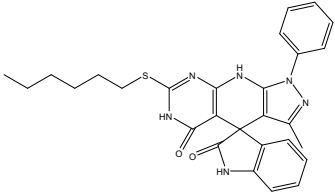
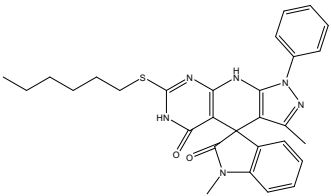
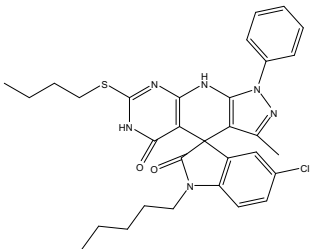
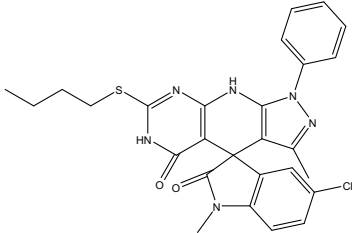


Figura 27. Andamio estructural base de la familia de las pirazolopiridopirimidinas.

Arriba, representación bidimensional del núcleo heterocíclico sin sustituir, el cual constituye el esqueleto central de esta serie química. Abajo se muestra el modelo tridimensional de bolas y varillas (átomos de carbono en gris, nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco) del *scaffold* base.

Si bien el *scaffold* central de estas moléculas, la pirazolopiridopirimidina, se caracteriza por poseer una estructura plana, la sustitución con un sistema de espiro-oxindol y con un benceno en posición N2 dota a la molécula de un marcado carácter tridimensional y volumen (**Tabla 2**). Esta arquitectura, en teoría, permite proyectar sustituyentes en múltiples espacios^{107,108}. Por otro lado, a diferencia de los Rotenoides, la abundancia de nitrógenos y oxígenos carbonílicos otorga a esta familia un elevado potencial para establecer redes de puentes de hidrógeno, lo que marca un perfil de interacción fundamentalmente distinto al de los andamios puramente lipofílicos¹⁰⁹.

Tabla 2. Estructura química y potencia inhibitoria de los *hits* de la familia de las Pirazolopiridopirimidinas frente a la MPro.

<i>Hit</i>	Estructura	R1	R2	R3	CI ₅₀ MPro (μM)
PRV B75		-O-CH ₃	Bencilo	--	17,0 ± 1,3
PRV-D64		-S-C ₆ H ₁₃	--	--	~25
PRV-D66		-S-C ₆ H ₁₃	-CH ₃	-Cl	13,4 ± 0,7
PRV-D76		-S-C ₄ H ₉	-C ₅ H ₁₁	-Cl	18,2 ± 2,5
PRV-D77		-S-C ₄ H ₉	-CH ₃	-Cl	19,7 ± 3,1

Nota: Los valores de inhibición enzimática (CI₅₀) frente a la MPro se determinaron mediante un ensayo enzimático fluorométrico por FRET. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado (n = 3). El cálculo de la CI₅₀ se realizó mediante un ajuste de regresión no lineal sigmoideal de dosis-respuesta utilizando el software GraphPad Prism.

El análisis comparativo de los *hits* versus los compuestos inactivos de esta serie permitió definir reglas farmacofóricas críticas. Un requisito casi estricto para

la actividad de la molécula es el bloqueo del nitrógeno del oxindol (R_2) con grupos que aporten volumen y lipofilidad, como los grupos bencilo (PRV B75), pentilo (PRV-D76) o metilo (PRV-D66 y PRV-D77) observados en los *hits*. Los resultados demuestran que mantener este nitrógeno libre (NH) resulta deletéreo para la afinidad, como se evidencia en el compuesto PRV-D64 ($CI_{50} \approx 25 \mu M$), el cual marca el límite superior de potencia de la serie. Esta observación es congruente con estudios cristalográficos recientes que indican que sustituciones lipofílicas en inhibidores no covalentes son importantes para estabilizar el complejo enzima-inhibidor mediante el anclaje en un bolsillo hidrofóbico específico de la proteasa¹¹⁰.

La importancia del volumen de la molécula se hace evidente al analizar el impacto de los halógenos en la posición R_3 dentro de los compuestos inactivos (**Tabla A1**). Los resultados revelan que la incorporación de un átomo de cloro no es universalmente beneficiosa; su éxito depende estrictamente de una “restricción volumétrica cruzada” con la cadena alifática en R_1 . En la serie inactiva, se observa que si la estructura ya cuenta con una cadena lipofílica larga (hexilo, 6C) ocupando la posición R_1 , la adición de un cloro en R_3 anula la actividad inhibitoria. Asumiendo que estos compuestos se unen al bolsillo catalítico de la MPro, esto indicaría una tolerancia volumétrica delimitada^{111,112}, donde la ocupación bidireccional del espacio estaría restringida por impedimento estérico. El compuesto PRV-D76 ($CI_{50} = 13,4 \pm 0,7 \mu M$) y el PRDV-77 ($CI_{50} = 19,7 \pm 3,1 \mu M$) representan la excepción a esta tendencia, logrando un balance crítico al combinar un butilo en R_1 con un cloro en R_3 más un metilo o pentilo, respectivamente, en R_2 . Probablemente en estas configuraciones con cadenas más cortas (butilo, 4C en R_1), se alivia el impedimento estérico aportado por los sustituyentes alquílicos y extendidos en R_1 , y tanto el halógeno en R_3 como los grupos alquilo en R_2 logran interacciones de mayor afinidad con la proteasa.

Asimismo, los compuestos inactivos demuestran que la naturaleza del halógeno es determinante. El cambio de cloro por flúor en diversos análogos no logro mantener ni mejorar la inhibición, confirmando que el radio de Van der Waals y la polarizabilidad del halógeno son importantes determinantes de una interacción productiva enzima-inhibidor^{113,114}. Tres diferencias importantes entre estos halógenos son el tamaño ($F = 1,47 \text{ \AA}$ *versus* $Cl = 1,75 \text{ \AA}$), la electronegatividad ($F \gg Cl$) y la lipofilia ($F < Cl$). Probablemente el efecto estérico

no sea importante, ya que compuestos no sustituidos con Cl resultaron activos (PRV B75 y PRV-D66). Por el contrario, la escasa lipofilia y elevada electronegatividad del F parecerían ser factores que van en detrimento de la actividad inhibitoria del compuesto probablemente por fenómenos de repulsión electrónica (ej. residuos cargados negativamente como Glu, Asp y Cys en estado tiolato) o polar (ej. residuos apolares). Este comportamiento, sumado a la necesidad de evitar grupos excesivamente polares o cadenas de azufre de un solo carbono en R1, evidencia que la MPro exige un balance de hidrofobicidad/polaridad muy refinada para esta familia de compuestos.

Dada las propiedades tridimensionales del *scaffold*, es altamente probable que estos compuestos logren una ocupación más efectiva de los bolsillos S1' y S2 en comparación con los rotenoides (sección 4.3.3.1). La presencia del grupo carbonilo en el oxindol ofrece un punto de anclaje polar que podría interactuar con el *backbone* de la enzima, mientras que las cadenas en R₁ podrían proyectarse hacia las cavidades hidrofóbicas del bolsillo del sitio activo. El éxito de los *hits* identificados radica, por tanto, en una calibración volumétrica precisa, aprovechando los contactos de Van der Waals sin exceder las cavidades que ofrece la enzima, un equilibrio que la mayoría de los compuestos inactivos no logró alcanzar.

4.3.2.3 Derivados de di-hidro- γ -pironas y γ -pironas

El compuesto orgánico más potente de este cribado y de la serie de pironas fue el J 355 con una CI_{50} de 0,15 μ M frente a esta proteasa (**Figura 28**). La clave de su potencia puede atribuirse a su reactividad intrínseca: el anillo piránico contiene una cetona α , β -insaturada acoplada a un átomo de yodo en el carbono α . Este andamiaje constituye un aceptor de Michael altamente electrófilo. La literatura demuestra que los sistemas α -haloenona son potentes alquilantes.

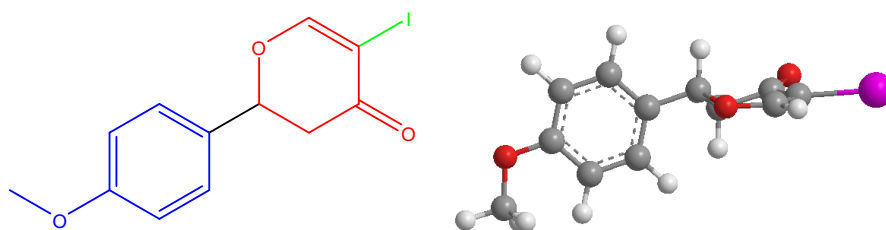


Figura 28. Estructura química del derivado de pironas J 355. Este compuesto consta de un núcleo de dihidropiranona (rojo) portador de un sistema α -yodoenona (cetona α , β -insaturada halogenada: iodo en verde) unido a un grupo anisol (o metoxifenil: azul) y resultó ser el *hit* de mayor potencia frente a la MPro.

Mecanísticamente, es probable que el J 355 actúe como un inhibidor covalente irreversible. En este compuesto, el átomo de iodo vecino al enlace α , β -insaturado exagera la reactividad de la molécula al ser un excelente grupo saliente luego del ataque de un nucleófilo al carbono insaturado y iodado del anillo piránico. Para MPro, el tiolato de la Cys145 y/o de algún otro residuo de Cys expuesto al solvente y relevante desde el punto de vista estructural o funcional podría ser blanco de modificación covalente por este compuesto^{115–118}.

Históricamente, los andamios basados en pironas han sido ampliamente evaluados en otros contextos biológicos, mostrando potentes propiedades citotóxicas, antibacterianas y antifúngicas, precisamente por su capacidad para generar aductos covalentes con tioles de bajo peso molecular (como el glutatión) o de cisteínas expuestas en múltiples dianas^{119–121}.

4.3.2.4 *Singletons y scaffolds estructurales huérfanos*

En el contexto de la química medicinal y del cribado de alto rendimiento, un *singleton* es una molécula que carece de análogos estructurales dentro de la quimioteca evaluada. En el caso de resultar activa, la ausencia de una serie de derivados de la misma impide la construcción de una relación estructura-actividad (SAR) clásica; sin embargo, el análisis de su *scaffold* puede proporcionar información sobre el posible mecanismo de inhibición y unión al blanco molecular, además de servir como punto de partida para futuras expansiones químicas.

En esta campaña, se identificaron dos *singletons* con actividad inhibitoria de la MPro cercana a la concentración umbral de *hit* (**Figura A7**). Una de ellas es el

compuesto P-2293486 (**Figura 29**) que mostró una actividad moderada con un porcentaje de inhibición de 56% a 25 μM , y, por tanto, una Cl_{50} teórica de aproximadamente 25 μM . El análisis de su estructura revela que se trata de un conjugado heterocíclico compuesto por un núcleo de isatina (indolina-2,3-diona) condensado con un derivado de tiohidantoína y sustituido con un grupo N-fenilacetamida.

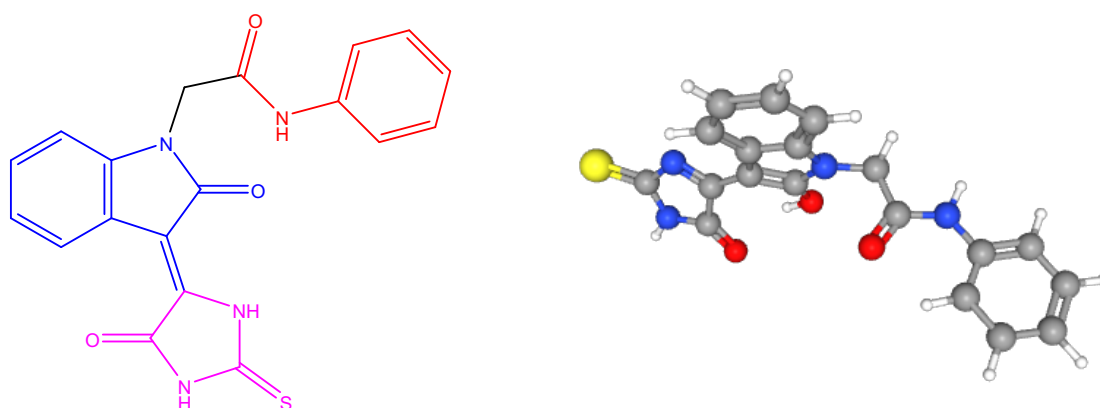


Figura 29. Estructura química del *singleton* P-2293486. La arquitectura de la molécula se basa en un núcleo central de isatina (azul) condensado con un anillo de tiohidantoína (fucsia) y sustituido periféricamente por un grupo N-fenilacetamida (rojo).

Desde la perspectiva farmacológica, este tipo de conjugados son considerados “estructuras privilegiadas” debido a su gran versatilidad. Estos *scaffolds* han sido evaluados extensamente como agentes anticancerígenos (inhibidores de quinasas)^{122,123}, tuberculostáticos y, de manera muy relevante, como antivirales de amplio espectro¹²⁴.

Su mecanismo de acción suele estar dominado por la inhibición no covalente; sus características estéricas y rigidez les permiten actuar como “tapones” de cavidades enzimáticas. Sin embargo, debido a la presencia del grupo tioamida, moléculas similares a veces son catalogadas como compuestos PAINS (*Pan-Assay Interference Compounds*) por su capacidad de formar agregados coloidales o quelar metales traza en el tampón de ensayo¹²⁵. El hecho que este compuesto no ejerció una inhibición significativa de la PLPro y que la actividad de la MPro no depende de metales o iones, sugiere que la inhibición observada sobre esta última enzima es específica.

Finalmente, el compuesto V 001 presentó una potencia similar a la de P-2293486 con una Cl_{50} de 22 μM . Lamentablemente, no disponemos de

información estructural sobre el compuesto V 001. En el momento de la recepción de la quimioteca, el diseño de este panel de compuestos estuvo sujeto a acuerdos de confidencialidad para no sesgar los resultados y proteger la propiedad intelectual del laboratorio de origen. Posteriormente, el cambio en la filiación institucional del investigador principal a cargo de dichos compuestos generó una pérdida de la trazabilidad en las bases de datos originales, lo cual, a la fecha, nos ha impedido acceder a dicha información.

4.3.3. Análisis estructural de los *hits* excluidos del modelo *in silico*

4.3.3.1 *Rotenoides y derivados*

La familia de los rotenoides y sus análogos estructurales arrojó una tasa de éxito del 11,8% (4 *hits* de 34 compuestos evaluados). Químicamente, esta clase de moléculas se caracteriza por presentar un núcleo tetracíclico o pentacíclico de cromeno-cromenona (**Figura 30**), el cual les confiere una marcada rigidez conformacional y una elevada hidrofobicidad. Desde la perspectiva de la química medicinal, estas propiedades geométricas y electrónicas sugieren que estos compuestos podrían tener dificultades para acceder y unirse de forma óptima en el bolsillo S1 de la MPro. Además, a diferencia de los inhibidores peptidomiméticos clásicos, los rotenoides carecen de grupos polares específicos para establecer redes de puentes de hidrógeno con residuos catalíticos críticos además del sitio activo, tal como, la His163 o el Glu166 (puente clave entre S1 y S2)^{26,44,126,127}. En consecuencia, la moderada inhibición observada sugiere que su mecanismo de inhibición podría estar gobernado por interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals dentro de cavidades de la MPro con mayor flexibilidad conformacional, como el bolsillo S2^{128,129}, o bien en la interfaz de dimerización de la proteína, lo cual daría lugar a una inhibición de tipo alostérica^{111,115}.

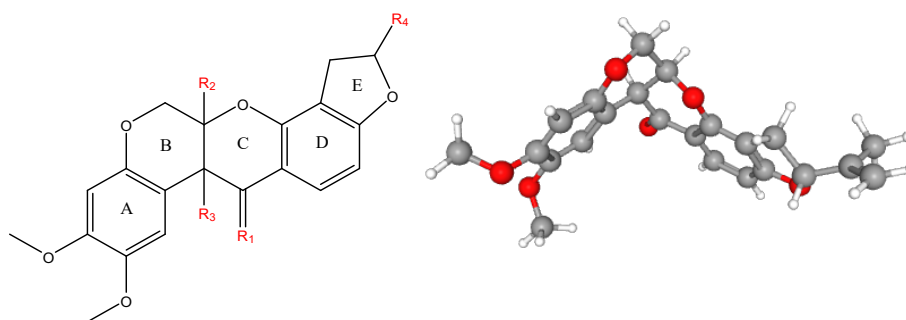
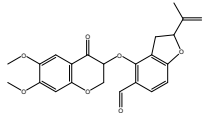
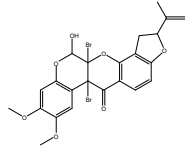
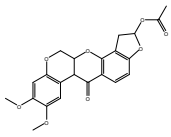
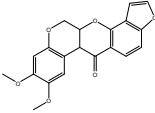


Figura 30. Andamio o chasis (*scaffold*) estructural de la familia de los Rotenoides y derivados. Izquierda, esta serie se compone de un pentaciclo donde uno de los anillos terminales (E) es un tetrahidrofurano. En rojo se indican las posiciones (R₁, R₂, R₃ y R₄) en las cuales se introdujeron distintos sustituyentes para generar derivados con variabilidad estructural. A la derecha se muestra la estructura tridimensional de Rotenona con la típica fusión en *cis* de los anillos B y C que tuerce a la molécula otorgándole una conformación no plana sino en forma de “V”.

El análisis comparativo de los cuatro compuestos activos (Rot-9, Rot-14, Rot-31 y Rot-32; **Tabla 3**) frente al resto de los derivados inactivos de esta serie permite sacar algunas conclusiones sobre ciertos determinantes de la actividad inhibitoria contra esta proteasa. En primer lugar, los valores de CI₅₀ de los *hits* estuvieron entre 11-26 μ M (**Figura A4**). Es importante destacar que, aunque el compuesto Rot-14 exhibió un valor de CI₅₀ de $26,0 \pm 4,7 \mu$ M (ligeramente por encima del límite del criterio asignado en esta tesis), se mantuvo su clasificación como hit dado que en el cribado a concentración fija de 25 μ M superó el umbral del 50% de inhibición. Esta desviación en la curva dosis-respuesta es atribuible a limitaciones en la solubilidad del compuesto en las condiciones del ensayo.

En general, los resultados para esta familia de compuestos destacan que las modificaciones en la flexibilidad del esqueleto podrían ser determinantes para la actividad.

Tabla 3. Estructura química y potencia inhibitoria de los *hits* de la familia de los Rotenoides frente a la MPro.

Hit	Estructura	R1	R2	R3	R4	Observaciones	CI ₅₀ MPro (μM)
Rot-9		--	--	--	--	Anillo abierto	16,0 ± 1,2
Rot-14		=O	-Br	-Br	-C(CH ₃)=CH ₂	--	26,0 ± 4,7
Rot-31		=O	-H	-H	-CH(CH ₃)-O-Ac	R ₄ es un acetoxietilo	12,4 ± 2,4
Rot-32		=O	-H	-H	--	Doble enlace interno (furan aromático)	12,4 ± 1,1

Nota: Los valores de inhibición enzimática (CI₅₀) frente a la MPro se determinaron mediante un ensayo enzimático fluorométrico por FRET. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado (n = 3). El cálculo de la CI₅₀ se realizó mediante un ajuste de regresión no lineal sigmoideal de dosis-respuesta utilizando el software GraphPad Prism.

Rot-32 (CI₅₀ = 11,4 ± 2,4 μM) y Rot-31 (CI₅₀ = 12,4 ± 1,1 μM) resultaron ser los compuestos más activos de esta serie. La principal diferencia entre estos compuestos radica en la deshidrogenación del anillo E (tetrahydrofurano) y su desalquilación en la posición R₄ (Rot-32) respecto a la rotenona clásica Rot-31. Estas modificaciones generan un sistema benzofuránico completamente aromático. Esta topología maximizaría la capacidad de la molécula para establecer interacciones de apilamiento π (*pi-stacking*) con residuos aromáticos de la proteasa¹³⁰, sugiriendo que el sitio de unión consistiría de una superficie hidrofóbica capaz de acomodar geometrías rígidas¹³¹. En Rot-31, la inclusión de un grupo acetoxietilo en R₄ introduce grados de libertad rotacional y nuevos aceptores de puentes de hidrógeno a través de los átomos de oxígeno del grupo éster. Como esta modificación no le confiere al compuesto una mayor capacidad inhibitoria respecto al análogo Rot-32, el cual carece de la misma, podemos

inferir que la unión de este compuesto a la enzima estaría gobernada principalmente por interacciones hidrofóbicas con el sistema aromático de estos compuestos.

Esta aseveración en parte también se sustenta en los resultados obtenidos para los derivados Rot-9 ($CI_{50} = 16,0 \pm 1,2 \mu M$) y Rot-14 ($CI_{50} = 26,0 \pm 4,7 \mu M$). El primero de estos compuestos presenta una ruptura en el sistema central (anillo C abierto), lo que destruye la rigidez intrínseca del *scaffold* clásico y conlleva a una disminución del 30-40% en la potencia inhibitoria respecto a Rot-31 y Rot-32. No obstante, la conservación de la actividad en el rango micromolar medio sugiere que la ganancia de entropía conformacional permite a Rot-9 adaptarse a la topología del sitio de unión a la proteasa, probablemente mediante un mecanismo de “ajuste inducido”^{132,133}. En el caso de Rot-14, se destacan las sustituciones con átomos de bromo en posiciones (R_2 y R_3) en los anillos centrales (B y C) que aumentan drásticamente el volumen tridimensional y la lipofilicidad del núcleo central¹³⁴. La halogenación con estos átomos electronegativos también afecta la resonancia de estos anillos aromáticos y le confiere al compuesto la posibilidad de establecer interacciones tipo “puente de halógeno” con grupos carboxilo, hidroxilo, amino, guanidino y tiol de la cadena lateral de distintos residuos proteicos. El bromo también puede ser coordinado mediante sistemas π con residuos aromáticos (ej. fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina). Otra modificación que destaca en este compuesto es la presencia de un grupo isopropenilo en el R_4 del anillo tetrahidrofurano, el cual contribuye a incrementar la lipofilicidad de la molécula, lo cual se evidenció por la destacada baja solubilidad del mismo en medios acuosos. Por lo tanto, la menor actividad inhibitoria de este compuesto podría explicarse por efectos estéricos asociados a la presencia de halógenos en su zona central que modifican su afinidad por el sitio de unión, el cual podría presentar una tolerancia estérica restringida.

Estos derivados presentan marcadas limitaciones estéricas frente a la MPro. La conservación de la cetona central en la posición R_1 es indispensable; su derivatización hacia O-acilcetoximas (Rot-2, -3, -4 y -5) introduce un volumen masivo que suprime por completo la actividad inhibitoria, lo cual podría ser consecuencia de un impedimento estérico a sitios de unión a la proteasa. Respecto a la periferia, en el anillo E (R_4), el grupo isopropenilo clásico restringe drásticamente la afinidad cuando el *scaffold* se mantiene sumamente rígido,

resultando en múltiples compuestos inactivos (Rot-0, -12, TEF-0 y MEZ-1). No obstante, la actividad en esta serie se puede promover mediante dos estrategias estructurales divergentes. Por un lado, la sustitución del isopropenilo por anillos furanos planos o ésteres polares (Rot-32 y Rot-31) rescata la actividad manteniendo el núcleo rígido intacto. Por otro lado, la retención del isopropenilo en R₄ resulta altamente tolerada si se acompaña de modificaciones que contrarresten las restricciones del andamio original, ya sea ganando flexibilidad conformacional mediante la apertura de anillos (seco-rotenoide Rot-9) o a través de la introducción de halógenos polarizables en las posiciones R₂/R₃ (Rot-14).

4.3.3.2 *Complejos organometálicos de Rutenio y Vanadio*

Otra familia de compuestos evaluada contra la MPro fue la de los complejos organometálicos basados en átomos de Rutenio (II) y al Vanadio (IV/V). La introducción de un metal de transición en el diseño de inhibidores aporta una diversidad geométrica prácticamente inalcanzable para la química orgánica clásica, que además permite la formación de enlaces de coordinación directos con residuos catalíticos de enzimas, como es el caso de la proteasa de SARS-CoV-2^{135–137}.

El análisis de esta serie arrojó un 45% de *hits* (5 de 11), además, la potencia de estos inhibidores fue de las mejores en esta campaña de cribado. El análisis de los resultados reveló un marcado contraste de actividad condicionado por la naturaleza del centro metálico. Los complejos de oxovanadio evaluados (n = 2) inhibieron de manera marginal a la MPro (11-17% de inhibición a 25 μ M). Estos compuestos incorporan ligandos polipiridínicos extendidos y rígidos del tipo dipiridofenazina (dppz). La geometría piramidal de base cuadrada u octaédrica de estos complejos de vanadio en combinación con el volumen estérico del esqueleto dppz, probablemente genera un impedimento tridimensional que imposibilita el acceso de la molécula al bolsillo S1 del sitio activo de la MPro¹³⁸.

En contraposición, la mayoría de los complejos de la serie de rutenio (5 de 7) inhibieron a la MPro con potencias destacadas (**Tabla 4; Figura A6**). De ellos, el complejo RuTN alcanzó un valor de Cl₅₀ de $0,99 \pm 0,13$ μ M, convirtiéndose en uno de los pocos en romper la barrera sub-micromolar de inhibición enzimática (**Figura 31**).

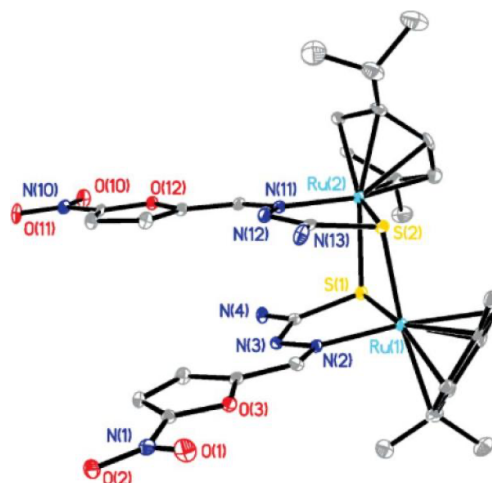


Figura 31. Estructura cristalina del complejo dinuclear RuTN¹³⁹. Representación de la estructura molecular del complejo de rutenio (II) coordinado al ligando tiosemicarbazona. Se observa la geometría de coordinación característica donde cada centro metálico (Ru1 y Ru2) interactúa de forma η^6 con un anillo p-cimeno. Los ligandos de tiosemicarbazona actúan en su forma monoaniónica, coordinándose a través del nitrógeno azometínico y utilizando el átomo de azufre como puente para estabilizar la estructura dinuclear. Por otro lado, RuFenilo es el compuesto con la sustitución de un fenilo en el nitrógeno terminal.

A este compuesto le siguieron de cerca el complejo Ru fenilo ($Cl_{50} = 1,16 \pm 0,23 \mu M$), el RuCpTM ($Cl_{50} = 5,81 \pm 0,77 \mu M$), el complejo catiónico Ru9 ($Cl_{50} = 9,95 \pm 1,10 \mu M$) y el derivado RuCpCTZ ($Cl_{50} = 12,48 \pm 2,84 \mu M$).

Tabla 4. Características estructurales y actividad contra MPro de los *hits* organometálicos de rutenio.

<i>Hit</i>	Esfera de coordinación	Ligando Principal	Cl ₅₀ MPro (μM)
Ru TN	Dinuclear <i>p</i> -cimeno	Nitrofuril tiosemicarbazona (NH ₂ , amina libre)	0,99 ± 0,13
Ru Fenilo	Dinuclear <i>p</i> -cimeno	Tiosemicarbazona con sustitución N-fenilo	1,2 ± 0,2
RuCpTM	Mononuclear, ciclopentadienilo (Cp) y PPh ₃	Nitrofuril tiosemicarbazona con N-metilación (-NHCH ₃)	5,8 ± 0,8
Ru9	Ru-Fe, Fosfinas	Bipiridina (bipy)	9,9 ± 1,1
RuCpCTZ	Mononuclear, ciclopentadienilo (Cp) y PPh ₃	Clotrimazol (CTZ) coordinado	12,5 ± 2,9

Nota: Los valores de inhibición enzimática (Cl₅₀) frente a la MPro se determinaron mediante un ensayo enzimático fluorométrico por FRET. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado (n = 3). El cálculo de la Cl₅₀ se realizó mediante un ajuste de regresión no lineal sigmoidal de dosis-respuesta utilizando el software GraphPad Prism.

La comparación directa de los complejos organometálicos frente a sus respectivos ligandos orgánicos libres demuestra de manera inequívoca que la presencia del átomo de rutenio es el factor catalizador de la actividad inhibitoria. Por ejemplo, el ligando Fenilo, una tiosemicarbazona libre derivada de nitrofurano, presentó una inhibición moderada de la enzima (24% a 25 μM). No obstante, cuando este *scaffold* orgánico se coordina al centro de rutenio (II) en el complejo Ru Fenilo, la potencia inhibitoria incrementa de manera significativa hasta alcanzar una Cl₅₀ de 1,2 μM. Este fenómeno se replica al analizar el antimicótico clásico clotrimazol (CTZ), el cual en su estado libre puramente orgánico y a 25 μM muestra ser prácticamente inactivo frente a la MPro (3% de

inhibición). Sin embargo, al ser incorporado como ligando coordinado en el *scaffold* de rutenio-ciclopentadienilo en RuCpCTZ, el compuesto se transforma en un *hit* con potencia de dos dígitos μM (CI_{50} 12,5 μM).

Esta evidencia experimental demuestra que los ligandos orgánicos por si solos carecen de los requerimientos farmacofóricos o de la energía de unión necesarios para interactuar e inhibir a la enzima, indicando que la organización geométrica tridimensional que impone el rutenio, adoptando disposiciones de “taburete de piano”, junto con la modificación de las propiedades electrónicas de los ligandos al coordinarse, resulta indispensable para permitir un encaje espacial productivo dentro de las cavidades del sitio activo^{140,141}.

A pesar del rol protagónico del metal, los resultados demuestran que la simple presencia del rutenio no basta para asegurar la inactivación de la proteasa, ya que la naturaleza química y la sustitución fina de las “patas” del complejo organometálico actúan como un interruptor molecular crítico. Este comportamiento se evidencia al comparar los complejos análogos RuCpTN y RuCpTM (**Figura 32**).

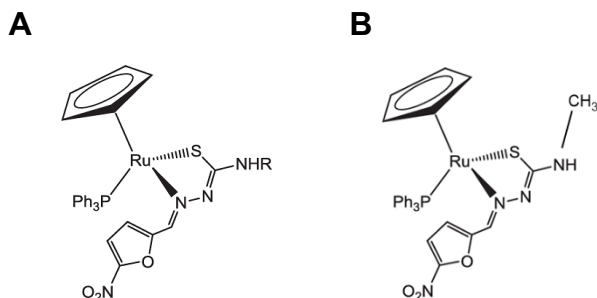


Figura 32. Comparación estructural entre los análogos organometálicos RuCpTN y RuCpTM. Estructuras químicas de los complejos basados en el núcleo catiónico de $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)]^+$ coordinado a un ligando bidentado derivado de tiosemicarbazona fusionado a un núcleo de nitrofurano. **(A)** Derivado RuCpTN con reducida actividad inhibitoria (28% a 25 μM) y caracterizado por poseer un grupo terminal de amina primaria ($-\text{NH}_2$; donde $\text{R} = \text{H}$). **(B)** Derivado RuCpTM activo ($\text{CI}_{50} = 5,8 \mu\text{M}$) con grupo terminal de amina mono-metilada ($-\text{NHCH}_3$).

Ambos compuestos comparten exactamente el mismo núcleo catiónico de $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)]^+$ y coordinan un ligando bidentado de tipo 5-nitro-2-furaldehído tiosemicarbazona¹⁴². La única diferencia estructural radica en el nitrógeno

terminal (N4) de la cadena de la tiosemicarbazona, donde en RuCpTN el grupo amina terminal se encuentra completamente libre (-NH_2), mientras que en RuCpTM dicho nitrógeno se encuentra mono-metilado (-NHCH_3). A nivel experimental, este sutil cambio molecular genera un impacto drástico, debido a que RuCpTN demostró una baja actividad contra MPro (28% de inhibición a 25 μM), mientras que la variante metilada de este compuesto tuvo una actividad inhibitoria destacada dentro de esta serie (RuCpTM $\text{CI}_{50} = 5,8 \mu\text{M}$). Desde la perspectiva de la química medicinal, esta metilación terminal incrementa localmente la lipofilicidad de la cadena y altera la densidad electrónica del grupo circundante, un ajuste fisicoquímico que resulta determinante para establecer interacciones hidrofóbicas complementarias o contactos de Van der Waals óptimos dentro de alguno de los sub-bolsillos de la proteasa, presumiblemente S2 o S1', demostrando la alta sensibilidad de la topología de la MPro hacia las modificaciones discretas en la periferia del metal^{142,143}.

El salto en la potencia inhibitoria provocado por los complejos de rutenio activos, capaces de alcanzar el rango bajo y sub-micromolar, marca una clara diferencia respecto a los inhibidores con mecanismo de acción presumiblemente no covalente analizados y descritos en las secciones anteriores. Para los Rotenoides, con su mejor exponente presentando una CI_{50} de 11,4 μM , la inhibición de la MPro probablemente esté regida por interacciones hidrofóbicas periféricas y ajustes estéricos reversibles en los compuestos. En el caso de las pirazolopiridopirimidinas, representadas por el PRV-D66 ($\text{CI}_{50} = 13,4 \mu\text{M}$), la interacción inhibidor-enzima probablemente explote la conformación tridimensional conferida por su grupo espiro-carbono para optimizar contactos polares y no polares con el sitio de unión a la MPro. Sin embargo, ninguna de estas interacciones pareciera ser de alta afinidad, ya que los CI_{50} se encuentran en el orden de los dos dígitos μM . En el caso de los complejos organometálicos, es probable que su mayor potencia inhibitoria se deba a dos fenómenos que ocurren de manera simultánea, por un lado, la ocupación del sitio activo de la enzima por el complejo, lo cual aporta un componente estérico que bloquea el ingreso del sustrato, y por otro lado el posible involucramiento de los residuos de la dupla catalítica (Cys145 e His41) en la coordinación del metal del compuesto mediante su grupo tiolato e imidazol, respectivamente. En sistemas biológicos, estos residuos se destacan justamente por ser capaces de coordinar la unión de

distintos tipos de metales (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) a diversas enzimas y proteínas (ej. dominio de “dedos de zinc” en proteínas de unión a ADN, proteínas con centros ferrosulfurados, hemoglobina, anhidrasa carbónica, etc¹⁴⁴). Por un lado, el átomo de azufre de la Cys actúa como un nucleófilo que a través de su nube de electrones polarizables puede establecer enlaces de coordinación fuertes, con carácter covalente, con metales, especialmente de transición (o ávidos por electrones).

En el caso de la His, el nitrógeno no protonado del anillo imidazólico de la cadena lateral se comporta como una base débil que ofrece un par de electrones no enlazantes y disponibles para coordinar centros metálicos¹²⁷. En contraposición, el centro de rutenio (II) en estos complejos organometálicos se comporta como un electrófilo, debido a la carga neta del fragmento metálico y a la presencia de orbitales “d” accesibles, capaces de aceptar selectivamente a densidades electrónicas adyacentes^{127,136}.

Por lo tanto, la formación de un enlace coordinativo o dativo de alta energía de unión en sus variantes N:-Ru-S, Ru-S o N:-Ru, impediría el involucramiento de estos residuos en la catálisis, y además, como se menciona anteriormente, el resto de los ligandos involucrados, si continuaran formando parte del complejo, bloquearían físicamente el acceso al sitio activo del sustrato peptídico¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

4.3.4. Evaluación de actividad inhibitoria cruzada sobre la PLPro de *hits* de la MPro

Con el objetivo de explorar la posibilidad de una inhibición cruzada sobre la PLPro por parte de los 17 *hits* identificados frente a MPro, estos compuestos fueron cribados contra la primera de estas proteasas, bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente (sección 3.5.2). De este grupo, únicamente 7 compuestos (41%) mostraron capacidad de inhibir a la PLPro con valores de CI_{50} que oscilaron entre 6 μM y 25 μM (**Figura A8, Tabla 5**). Los compuestos que bajo estas condiciones no inhibieron la actividad de la PLPro más de un 50% no se les determinó su CI_{50} (indicados como NE en la **Tabla 5**).

Tabla 5. Contra-cribado de los *hits* de la MPro frente a la PLPro y determinación del índice de selectividad. Se detallan los valores de Cl_{50} y/o porcentaje de inhibición a 25 μ M de los compuestos de interés contra las correspondientes proteasas de SARS-CoV-2. El índice de selectividad (IS) se expresa como el cociente entre $Cl_{50}PLPro/Cl_{50}MPro$. En rojo se resaltan los *hits* de ambas proteasas. Con fondo gris se marca el par de *singletons*.

Compuesto	MPro	PLPro		Índice de Selectividad (I.S.)
	Cl_{50} (μ M)	% Inhibición a 25 μ M	Cl_{50} (μ M)	
Rot-9	16,0 $\pm$ 1,2	85,2 $\pm$ 4,4	6,0 $\pm$ 1,0	0,4
Rot-14	26,0 $\pm$ 4,7	55,2 $\pm$ 0,5	~25*	0,9
Rot-31	12,4 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 0,3	NE	NA
Rot-32	11,4 $\pm$ 2,4	71,8 $\pm$ 3,2	9,2 $\pm$ 2,5	0,8
PRV B75	16,9 $\pm$ 1,3	22,6 $\pm$ 0,5	NE	NA
PRV - D64	~25	4,3 $\pm$ 0,5	NE	NA
PRV - D66	13,4 $\pm$ 0,7	37,0 $\pm$ 1,0	NE	NA
PRV - D76	18,2 $\pm$ 2,5	28,7 $\pm$ 0,9	NE	NA
PRV - D77	19,7 $\pm$ 3,1	1,8 $\pm$ 0,6	NE	NA
J 355	0,15 $\pm$ 0,02	2,1 $\pm$ 0,7	NE	NA
Ru-TN	0,99 $\pm$ 0,13	84,4 $\pm$ 0,6	6,5 $\pm$ 0,2	6,6
Ru-fenilo	1,2 $\pm$ 0,2	97,7 $\pm$ 6,4	7,0 $\pm$ 0,3	6,0
RuCpTM	5,8 $\pm$ 0,8	42,3 $\pm$ 0,4	NE	NA
RU9	9,9 $\pm$ 1,1	54,4 $\pm$ 0,8	~25*	2,5
RuCpCTZ	12,5 $\pm$ 2,8	20,3 $\pm$ 0,4	NE	NA
P-2293486	~25	17,2 $\pm$ 0,5	NE	NA
V 001	22,5 $\pm$ 3,3	72,6 $\pm$ 0,7	NE	NE

*no se pudo determinar experimentalmente el Cl_{50} debido a problemas de solubilidad del compuesto o disponibilidad del mismo. Dado que la inhibición a 25 μ M fue cercana al 50 %, se estima un valor de Cl_{50} de ~25 μ M. NE: No Evaluado, NA; No aplica. Los datos se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado ($n = 3$). El cálculo de la Cl_{50} se realizó mediante un ajuste de regresión no lineal sigmoideal de dosis-respuesta utilizando el software GraphPad Prism.

En términos generales, se observó que el 41 % de los *hits* identificados frente a la MPro también inhibieron a la PLPro. Una serie completa, las pirazolopiridopirimidinas, mostraron una marcada selectividad contra MPro ya que ninguno de estos *hits* logró inhibir de manera destacada a la PLPro. También resultó interesante observar que el *hit* más potente contra la MPro (CI_{50} 0,15 μ M), la dehidropirona halogenada J 355, careció por completo de actividad contra la PLPro, lo cual sugiere un mecanismo de inhibición e interacción marcadamente selectivo contra la primera de ellas. Por otra parte, de los 2 *singletons*, solo uno de ellos mostró cierta selectividad contra la MPro. De los siete *hits* comunes, resultó llamativo que la serie de rotenonas presentó mayor especificidad por inhibir a la PLPro ($IS < 1$), mientras que la serie de compuestos organometálicos tuvo mayor selectividad hacia la inhibición de la MPro ($IS > 1$). Si bien no fue posible determinar la CI_{50} contra la PLPro para el *singleton* V 001, dado que a 25 μ M inhibió la actividad de esta enzima en un $72,7 \pm 0,7$ %, es decir no hubo inhibición total, asumimos que su CI_{50} contra esta enzima sería ligeramente inferior a 25 μ M y por lo tanto en el mismo orden del valor de CI_{50} determinado experimentalmente para MPro ($CI_{50} = 22,5 \pm 3,3$ μ M).

Con respecto a la primera serie de inhibidores duales, se destacó Rot-9, cuya potencia inhibitoria contra la PLPro fue 2,6 veces superior que la observada frente a MPro. En el caso de Rot-14 y Rot-32, esa diferencia de selectividad a favor de la PLPro fue marginal (0,9 y 0,8). De la segunda serie se destacaron los compuestos Ru-TN y Ru-fenilo, con una CI_{50} contra la MPro al menos 6 veces más bajas que las necesarias para alcanzar un grado de inhibición similar contra la PLPro. El tercer *hit* dual de esta serie, el Ru9, presentó una potencia inhibitoria contra la MPro unas 2,5 veces superior que contra la PLPro.

En conjunto, estos resultados indican que varios, pero no la mayoría, de los *hits* identificados frente a MPro presentó una moderada actividad cruzada contra PLPro bajo las condiciones evaluadas. Es probable que este tipo de compuestos con actividad sobre ambas enzimas presenten mecanismos de inhibición o unión similares para estas proteasas.

La identificación de compuestos con reactividad cruzada frente a la MPro y la PLPro representa un desafío analítico debido a las profundas diferencias topológicas de sus dianas. La MPro posee una hendidura catalítica profunda, relativamente rígida y con subsitios (S1, S2, S4)²⁶ bien definidos que restringen

el anclaje estérico. Esta enzima exhibe una especificidad de sustrato excepcionalmente alta (requiriendo un corte pos-glutamina), sin homólogos conocidos en proteasas humanas, lo que facilita el diseño de moléculas potentes con bajo riesgo de interacciones inespecíficas (*off-target*)¹⁴⁸.

En marcado contraste, la topología de la PLPro es considerablemente más amplia, llana y expuesta al solvente^{45,51}. Esta arquitectura facilita su doble función biológica. El acceso a su tríada catalítica está regulado por la dinámica del bucle BL2; para que un inhibidor logre estabilizarse en este sitio, debe inducir el cierre del bucle, imponiendo una masiva penalización entrópica^{25,45,149}. Por consiguiente, los *scaffolds* rígidos que logran un ajuste tridimensional óptimo en las cavidades de la MPro suelen carecer de la flexibilidad conformacional o el área de superficie necesarios para unirse con alta afinidad a la PLPro. Adicionalmente, la similitud del sitio activo de la PLPro con las enzimas deubiquitinasa humanas añade una barrera de toxicidad significativa en las etapas de optimización.

4.3.5. Análisis retrospectivo y validación del cribado empírico frente a modelos *in silico*

El presente trabajo culminó el cribado experimental contra MPro de la quimioteca ensamblada en el laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas (LBRT) del Institut Pasteur de Montevideo, lo cual permite realizar una comparación con los resultados del cribado virtual reportados para esta misma colección de compuestos, y contrastar los mismos con los datos experimentales obtenidos para los *hits* propuestos por ese estudio *in silico*.

El trabajo de Ruatta y colaboradores (2023) introdujo el principio de “*Garbage in, garbage out*”, demostrando que la fiabilidad de los modelos predictivos depende estrechamente de la calidad de los datos experimentales utilizados para su entrenamiento y de la validación experimental de las predicciones computacionales. En primer lugar, este estudio realizó un cribado *in silico* de la quimioteca del LBRT (compuesta por 850 moléculas) empleando, como datos de entrenamiento de los algoritmos de búsqueda, la información de inhibidores de MPro de SARS-CoV-2 y SARS disponible a Octubre de 2020.

Estos estudios arrojaron unos 146 *hits* virtuales, los cuales, junto a 100 análogos, fueron cribados a una concentración de 10 μ M (primera ronda) y 25

μM (segunda ronda) contra la MPro de SARS-CoV-2. Ninguna de estas 146 moléculas, lo cual representa un 17% de la quimioteca, resultó ser *hit* de la MPro (definido como inhibición $\geq 50\%$ en ensayos *in vitro*). Estos datos negativos, los nuevos resultados experimentales reportados en la literatura y los obtenidos en nuestro laboratorio durante una campaña de cribado de base empírica contra MPro (Marzo 2021), fueron empleados para optimizar los algoritmos de búsqueda computacionales.

Esta segunda ronda de cribado *in silico* dio lugar a 43 moléculas candidatas, de las cuales se ensayaron experimentalmente 28, logrando la identificación de 8 *hits* de MPro confirmados experimentalmente ($\text{CI}_{50} = 0,12\text{-}20 \mu\text{M}$, tasa de *hit* del 29%). Con el fin de comprobar la validez de esta herramienta y de aplicar una estrategia de reposicionamiento, los estudios de cribado *in silico* y experimental se extendieron a quimiotecas de fármacos, Prada y colaboradores (2023)⁶⁰. En esta campaña se identificaron 87 fármacos candidatos a inhibir la MPro, y de 8 ensayados, 2 de ellos (tasa de *hit* del 25%) fueron confirmados como *hits* experimentales con CI_{50} de 1,1 y 4,7 μM para atpenina y tinostamustina, respectivamente.

Por lo tanto, luego de la ronda de optimización de los modelos computacionales de búsqueda de inhibidores de la MPro, la tasa de *hit* aumentó de 0 a 25%, corroborando de alguna forma la relevancia de entrenar y validar los algoritmos de búsqueda con datos experimentales (positivos y negativos) consistentes.

No obstante, la tasa de predicción teórica de verdaderos positivos por parte del modelo computacional era del 44%. Al substrair a este valor predictivo el obtenido experimentalmente (25%) a partir de la exploración de una fracción reducida de compuestos (230 moléculas; Ruatta y colaboradores, (2023)⁶¹, indicaría que un 17% de potenciales *hits* no logró ser identificado. Por otro lado, como para cualquier otro ensayo, los algoritmos de búsqueda también son proclives a no detectar compuestos verdaderamente activos (también denominados como “falsos negativos”).

La magnitud de esta variable es desconocida para el modelo computacional empleado en los estudios citados anteriormente (Prada 2023⁶⁰ y Ruatta 2023⁶¹), ya que este solo predice la tasa de verdaderos *hits*, donde se espera que, de 5 compuestos cribados, 2 sean activos y los restantes 3 pueden ser tanto

verdaderos negativos y/o falsos negativos. Por lo tanto, asumiendo que el valor de falsos negativos puede estar entre 20-60%, esto indica que, de las 620 moléculas no estudiadas, cerca de 124 a 372 compuestos podrían ser “falsos negativos” y por lo tanto activos contra la MPro. El resolver esta incógnita, así como el revalidar la robustez del modelo de búsqueda computacional fueron los principales motivos que impulsaron el cribado experimental de una fracción mayoritaria (403 de 620 moléculas, 65%) de la quimioteca que no había sido anteriormente analizada contra este blanco molecular.

Tal como se presentó en esta tesis, de los 403 compuestos evaluados se obtuvo una tasa de *hit* del 4% (17 *hits*). Vale la pena destacar que de este total de compuestos, las rotenonas (n=34) y los compuestos organometálicos (n=11 con ligandos incluidos) fueron omitidos en la campaña de tamizaje *in silico* porque no estaban disponibles a la fecha de realización de dichos estudios o bien por la dificultad de los descriptores moleculares estándar y los campos de fuerza de *docking* (como AutoDock4-GPU) para parametrizar adecuadamente enlaces de coordinación con metales de transición¹⁵⁰, respectivamente.

Si estas familias de compuestos se sustraen del total, entonces la tasa de *hits* contra MPro pasa a ser del 2,2% (8 *hits* de 358 compuestos). Por lo tanto, este valor puede considerarse como el correspondiente a la tasa de “falsos negativos” del algoritmo de búsqueda, y correspondería a compuestos/estructuras químicas no identificadas previamente como posibles ligandos de la MPro. Cinco de ellos son pirazolopiridopirimidinas, una dehidropirona y dos son *singletons*.

El hecho que un porcentaje no menospreciable (25%) de los falsos negativos sean *singletons* no es sorprendente ya que los algoritmos fueron entrenados predominantemente con series o familias de compuestos análogos y con un número no representativo de *singletons* (<1%). Lo llamativo es que los tamizajes computacionales previos⁶¹, no hayan logrado identificar ningún *hit* de la familia de las pirazolopiridopirimidinas o de las dehidropironas. Sin embargo, la moderada potencia mostrada por los *hits* de la primera serie, Cl_{50} de dos dígitos μM y cercana al valor de corte de 25 μM , podría explicar esta baja tasa de predicción de los algoritmos de búsqueda. Para el caso de las dehidropironas, vale la pena recordar que, de los 12 análogos ensayados, 11 carecieron por completo de actividad inhibitoria contra MPro y solo uno tuvo una potencia inhibitoria que supera en al menos dos órdenes de magnitud la que podrían tener

algunos de sus análogos si se ensayaran a concentraciones superiores a 25 μ M. Esto pone en evidencia el comportamiento *outlier* dentro de esta familia del compuesto J 355 y, por lo tanto, la consecuente baja probabilidad de ser identificado como candidato a *hit* por el modelo computacional.

Este conjunto de resultados confirma de alguna forma la robustez de los modelos de búsqueda *in silico* generados en instancias previas por nuestro grupos de investigación y la baja probabilidad de “perder” compuestos activos cuando se aplique un tamizado computacional a familias de compuestos. El número de *singletons* ensayados es insignificante (2 de 403 compuestos o 0,49% del total de la quimioteca evaluada) como para sacar conclusiones al respecto. No obstante, se puede especular que la baja capacidad predictiva de los algoritmos de búsqueda para detectar *singletons hits* no parecería ser una deficiencia intrínseca de los mismos sino más bien reflejaría limitaciones asociadas al estrecho espacio químico de este tipo de moléculas con el cual se entrenaron estos programas.

En conclusión, el cribado experimental exhaustivo de los compuestos no priorizados *in silico*, no solo permitió completar la evaluación de la quimioteca local, sino que también reveló compuestos y familias químicas activas que no habían sido priorizados previamente, ampliando el repertorio de estructuras candidatas para el desarrollo de inhibidores de la MPro.

A su vez, estos resultados aportan nuevos datos experimentales que podrían ser incorporados en futuras etapas de entrenamiento y ajuste de los modelos predictivos, con el objetivo de minimizar aún más la tasa de falsos negativos, mejorar su capacidad de predicción y optimizar la priorización de compuestos activos en nuevas campañas de cribado.

En este sentido, los resultados obtenidos remarcan la relevancia de integrar de manera iterativa las estrategias computacionales con la validación experimental, tanto para identificar nuevos inhibidores como para fortalecer y refinar los modelos de predicción.

4.4 Tamizaje familia-específico de derivados de naftoquinonas

Tras completar los estudios anteriores dirigidos a validar el poder predictivo de los algoritmos computacionales empleados para la identificación de inhibidores de MPro, se decidió estudiar una nueva serie de compuestos que

poseen el andamio estructural de la naftoquinona (**Figura 33**). Esta quimioteca estaba conformada por 30 moléculas y fue provista por el Dr. Cristian Salas y colaboradores, afiliados a la Pontificia Universidad Católica de Chile.

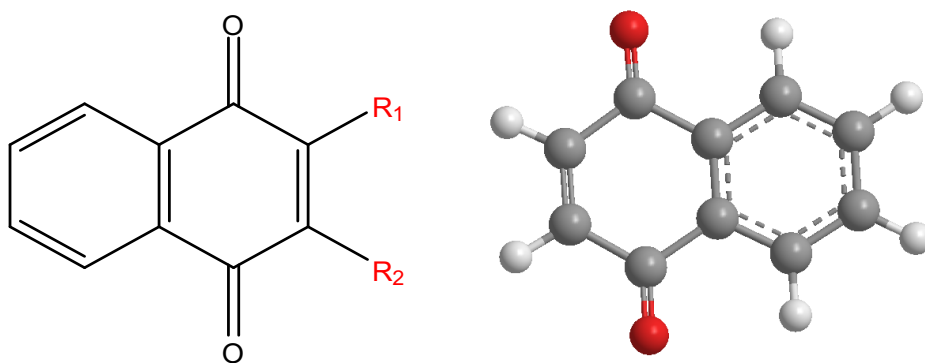


Figura 33. Núcleo estructural base de la serie de derivados de naftoquinona. Andamio de 1,4-naftoquinona donde las etiquetas R₁ y R₂ señalan las posiciones donde se incorporaron diversos grupos funcionales.

La evaluación de esta familia de compuestos frente a la MPro reveló resultados alentadores con un *hit-ratio* del 40% (12 *hits* de 30 evaluados) y Cl₅₀ en el rango de 3 a 25 µM (**Figura A9**). Las modificaciones estructurales implementadas sobre el núcleo de 1,4-naftoquinona, específicamente en las posiciones R₁ y R₂ (previamente detalladas en la **Figura 33**), y sus respectivos parámetros de inhibición se resumen en la **Tabla 6**.

Los compuestos más potentes de toda la serie fueron el CEQ-29 y CEQ-30 con valores de Cl₅₀ (3,6 µM y 3,1 µM, respectivamente) que en promedio son 4,1 veces más bajos que los del resto de *hits* (rango de 7,5 a 25 µM). El análisis detallado de la relación estructura-actividad sobre los *hits* de esta familia de compuestos revela que el núcleo de 1,4 naftoquinona opera como un andamio, cuya eficacia inhibitoria sobre la MPro depende críticamente de la modulación estérico-electrónica en sus posiciones R₁ y R₂¹⁵¹. Específicamente, la presencia de un átomo electrón-atractor en R₁ resulta indispensable para maximizar la actividad contra la MPro ya que 12 de los 20 derivados halogenados (Cl o Br) resultaron *hits* (60%), mientras que ninguno de los 10 análogos no halogenados calificó como tal (0%).

Tabla 6. Actividad inhibitoria de la familia de las naftoquinonas frente a la MPro. Se detallan los sustituyentes en las posiciones R₁ y R₂ del *scaffold* base, el porcentaje de inhibición a la concentración de 25 µM y los valores de CI₅₀ para los compuestos clasificados como *hits* (inhibición ≥50% a 25 µM).

Compuesto	R ₁	R ₂	Inhibición MPro a 25 µM (%)	CI ₅₀ (µM)
CEQ-1	-H	4-fenilpiperazin-1-ilo	11,2 ± 0,8	
CEQ-2	-H	4-(2,4-dimetilfenil)piperazin-1-ilo	13,0 ± 2,2	
CEQ-3	-H	4-(4-fluorofenil)piperazin-1-ilo	18,6 ± 1,1	
CEQ-4	-H	4-(piridin-2-il)piperazin-1-ilo	36,2 ± 0,7	
CEQ-5	-Cl	4-fenilpiperazin-1-ilo	19,5 ± 0,9	
CEQ-6	-Cl	4-(2,4-dimetilfenil)piperazin-1-ilo	72,4 ± 2,1	16,4 ± 0,2
CEQ-7	-Cl	4-(4-fluorofenil)piperazin-1-ilo	44,6 ± 1,8	
CEQ-8	-Cl	4-(piridin-2-il)piperazin-1-ilo	85,2 ± 2,2	11,8 ± 0,4
CEQ-9	-Br	4-fenilpiperazin-1-ilo	58,7 ± 1,9	~25
CEQ-10	-Br	4-(2,4-dimetilfenil)piperazin-1-ilo	35,2 ± 0,8	
CEQ-11	-Br	4-(4-fluorofenil)piperazin-1-ilo	99,8 ± 12,6	7,5 ± 0,3
CEQ-12	-Br	4-(piridin-2-il)piperazin-1-ilo	89,9 ± 5,2	11,8 ± 1,0
CEQ-13	-H	4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino	18,6 ± 0,8	
CEQ-14	-H	(4-tiomorfolinofenil)amino	2,4 ± 1,3	
CEQ-15	-H	(4-morfolinofenil)amino	16,4 ± 0,9	
CEQ-16	-H	(4-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)fenil)amino	28,1 ± 1,3	
CEQ-17	-Cl	4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino	82,3 ± 1,8	10,1 ± 0,7
CEQ-18	-Cl	(4-tiomorfolinofenil)amino	98,5 ± 3,4	8,6 ± 0,4
CEQ-19	-Cl	(4-morfolinofenil)amino	18,2 ± 1,3	
CEQ-20	-Cl	4-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)fenil)amino	72,0 ± 3,6	19,3 ± 0,5
CEQ-21	-Br	4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino	94,9 ± 2,8	15,8 ± 0,5
CEQ-22	-Br	(4-tiomorfolinofenil)amino	36,4 ± 0,9	
CEQ-23	-Br	(4-morfolinofenil)amino	27,7 ± 1,1	
CEQ-24	-Br	4-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)fenil)amino	96,4 ± 1,9	12,1 ± 0,5
CEQ-25	-H	(2-morfolinoetil)amino	29,4 ± 0,8	
CEQ-26	-Cl	(2-morfolinoetil)amino	32,6 ± 0,7	
CEQ-27	-Br	(2-morfolinoetil)amino	29,9 ± 0,8	
CEQ-28	-H	4-ciclopentilpiperazin-1-ilo	22,6 ± 0,8	
CEQ-29	-Cl	4-ciclopentilpiperazin-1-ilo	100,0 ± 8,3	3,6 ± 0,2

CEQ-30	-Br	4-ciclopentilpiperazin-1-ilo	99,9 ± 6,3	3,1 ± 0,1
--------	-----	------------------------------	------------	-----------

*Nota: Las filas sin sombreado corresponden a los análogos estructurales no halogenados ($R_1 = -H$). El sombreado de las filas agrupa a los derivados halogenados ($R_1 = -Cl, -Br$) según la naturaleza química del sustituyente R_2 : **Verde**: Subserie de arilpiperazinas y derivados anilínicos lipofílicos. **Naranja**: Subserie de heteroarilpiperazinas y cicloalquilos. **Azul**: Derivados de morfolinofenilo. **Violeta**: Derivados alifáticos de morfolinoetilo.*

Para varios de los análogos activos conteniendo el mismo tipo de sustituyente en R_2 , la actividad inhibitoria no estuvo influenciada de manera marcada por la naturaleza del átomo halógeno. Este es el caso de los derivados CEQ-8 (Cl) y CEQ-12 (Br) ambos con $Cl_{50} = 12 \mu M$, CEQ-17 (Cl, $Cl_{50} = 10 \mu M$) y CEQ-21 (Br, $Cl_{50} = 16 \mu M$), CEQ-20 (Cl, $Cl_{50} = 19 \mu M$) y CEQ-24 (Br, $Cl_{50} = 12 \mu M$), y del CEQ-29 (Cl) y CEQ-30 (Br) ambos con $Cl_{50} \sim 3 \mu M$. Para estos pares de compuestos, el grupo R_2 es: 4-(piridin-2-il)piperazin-1-ilo, 4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino, 4-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)fenil)amino y 4-ciclopentilpiperazin-1-ilo, respectivamente.

Llamativamente, en todos estos compuestos está presente una estructura de piperazina. Por el contrario, para los siguientes pares de compuestos sí se notó una disparidad en la potencia inhibitoria que fue halógeno-dependiente: CEQ-5 (Cl, 20% inhibición a $25 \mu M$) < CEQ-9 (Br, 50% inhibición a $25 \mu M$), CEQ-6 (Cl, $Cl_{50} = 16 \mu M$) > CEQ-10 (Br, 35% inhibición a $25 \mu M$), CEQ-7 (Cl, 45% inhibición a $25 \mu M$) < CEQ-11 (Br, $Cl_{50} = 7 \mu M$), y CEQ-18 (Cl, $Cl_{50} = 9 \mu M$) > CEQ-22 (Br, 28% inhibición a $25 \mu M$). Para estas duplas de compuestos los sustituyentes en R_2 son: 4-fenilpiperazin-1-ilo, 4-(2,4-dimetilfenil)piperazin-1-ilo, 4-(4-fluorofenil)piperazin-1-ilo y (4-tiomorfolinofenil)amino, respectivamente. Relativo a la influencia del grupo ocupando la posición R_2 en la actividad anti-MPro, llama la atención que en tres clases de compuestos cuya actividad inhibitoria depende del tipo de halogenación del núcleo naftoquinona, el andamio primario unido a la quinona es fenil-piperazinilo (CEQ-5, CEQ-9, CEQ-6, CEQ-10, CEQ-7 y CEQ-11). En cambio, para aquellas naftoquinonas donde el tipo de halógeno no determinó la actividad inhibitoria, este andamio se hallaba modificado por una piperazina unida a una piridina (CEQ-8/CEQ12) o a un pentanilo (CEQ-29/CEQ-30), o bien estaba modificado por un grupo piperazinil-fenilo no sustituido (CEQ-

17/CEQ-21 y CEQ-20/CEQ24) y con orientación invertida a las series descritas anteriormente. Esto sugiere que tanto el volumen como la plasticidad conformacional aportada por los grupos ocupando la posición R₂ pueden influenciar en la actividad del núcleo naftoquinona halogenado.

La incorporación de aminas alicíclicas voluminosas, particularmente el anillo de ciclopentilpiperazina presente en el CEQ-29 y CEQ-30 (ver estructuras 2D en la **Tabla A1**), podría proporcionar una mayor libertad rotacional a esta porción de la molécula respecto a los sistemas aromáticos rígidos. Esto le permitiría al compuesto explorar diferentes conformaciones de unión en el sitio de unión a la proteasa.

La reactividad química inherente a las quinonas exige explorar dos vías mecanísticas probables y no excluyentes para fundamentar la inhibición observada en los ensayos enzimáticos. En primera instancia, el *scaffold* de 1,4-naftoquinona posee una estructura de cetona α , β -insaturada, la cual constituye un aceptor de Michael altamente electrófilo. La inclusión de halógenos en la posición R₁ exacerba esta deficiencia electrónica en el anillo quinónico, facilitando y estabilizando el estado de transición electrofílico¹⁵¹. Desde una perspectiva tridimensional, se postula que, una vez que el sustituyente en R₂ ancla la molécula en las cavidades S1 y S2 de la MPro, el nucleófilo tiolato de la cisteína catalítica (Cys145) efectúa un ataque nucleofílico directo sobre el carbono insaturado del inhibidor²⁶. Este proceso culmina en la formación de un aducto covalente a través de un enlace tioéter irreversible o pseudo-irreversible, justificando así las potencias micromolares bajas.

De manera paralela, existe una vía de inactivación enzimática basada en la capacidad de las quinonas para actuar como cicladores redox. Las naftoquinonas son sustratos susceptibles a reducciones monoelectrónicas biológicas que generan intermediarios inestables de radical semiquinona^{152,153}. En este contexto, el oxígeno disuelto presente en el tampón de reacción puede actuar como aceptor de estos radicales, lo que desencadenaría una producción localizada de especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido, el cual puede dismutar espontáneamente a peróxido de hidrógeno. Este último podría oxidar grupos tiol, entre ellos aquellos que se encuentren en estado tiolato y presenten un entorno favorable para el acceso de este oxidante. Las cisteínas diana podrían sufrir oxidación a ácido sulfénico o sulfínico, lo cual, en el caso de

la cisteína catalítica, aboliría por completo la actividad proteolítica de la proteasa¹⁵³. Si fuera esta la razón de la actividad inhibitoria de estas moléculas entonces será indispensable en futuras etapas incorporar ensayos que permitan determinar esta capacidad redox de la molécula.

4.4.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de las naftoquinonas frente a la proteasa PLPro

El contra-cribado de las naftoquinonas frente a la PLPro confirmó la dificultad intrínseca de inhibir esta proteasa, un comportamiento similar al observado durante el cribado de la quimioteca local del laboratorio. Mientras que el cribado no sesgado arrojó que el 41% de los *hits* evaluados frente a la MPro también inhibían a la PLPro, la serie de las naftoquinonas exhibió un *hit-ratio* del 50% frente a esta última (**Tabla 7**). Estos compuestos mostraron potencias similares, con valores de CI_{50} comprendidos entre 3 y 25 μM (**Figura A10**). En conjunto, estos resultados mantienen la tendencia general de una menor susceptibilidad en la inhibición de la PLPro en comparación con la MPro.

Tabla 7. Perfil de inhibición y selectividad de los *hits* de naftoquinona frente a la MPro y la PLPro de SARS-CoV-2. Se detallan los valores de CI_{50} para ambas proteasas y el respectivo Índice de Selectividad (IS) calculado como el cociente entre $CI_{50}PLPro/CI_{50}MPro$ ó en su defecto 25 $\mu M/CI_{50}MPro$.

Compuesto	CI_{50} MPro (μM)	Inhibición PLPro a 25 μM (%)	CI_{50} PLPro (μM)	Índice de Selectividad (IS)
CEQ-6	16,4 $\pm$ 0,2	32,2 $\pm$ 0,5	NOI	>1,5
CEQ-8	11,8 $\pm$ 0,4	31,8 $\pm$ 0,4	NOI	>2,1
CEQ-9	~25	25,4 $\pm$ 1,3	NOI	NA
CEQ-11	7,5 $\pm$ 0,3	39,8 $\pm$ 0,4	NOI	>3,3
CEQ-12	11,8 $\pm$ 1,0	33,2 $\pm$ 0,4	NOI	>2,1
CEQ-17	10,1 $\pm$ 0,7	58,9 $\pm$ 1,4	~25	2,5
CEQ-18	8,6 $\pm$ 0,4	29,5 $\pm$ 0,7	NOI	>2,9
CEQ-20	19,3 $\pm$ 0,5	50,1 $\pm$ 0,6	~25	1,3
CEQ-21	15,8 $\pm$ 0,5	73,7 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 0,9	0,8
CEQ-24	12,1 $\pm$ 0,5	64,5 $\pm$ 0,6	15,9 $\pm$ 0,8	1,3
CEQ-29	3,6 $\pm$ 0,2	64,3 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 0,5	1,1
CEQ-30	3,1 $\pm$ 0,1	67,9 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 0,9	1,9

NOI: No inhibición, NA; No aplica

Destacan de manera excepcional, los compuestos CEQ-29 y CEQ-30, los cuales mantuvieron un perfil de inhibición bueno al alcanzar valores de CI_{50} de 4 y 6 μM , respectivamente. Estos resultados los posicionan como los inhibidores más potentes identificados contra esta diana en el presente estudio. Por otro lado, se identificaron inhibidores de potencia moderada con valores de CI_{50} cercanos a 25 μM (ej., CEQ-17 o CEQ-20).

El análisis estructural sugiere que la arquitectura de la PLPro es altamente restrictiva respecto a la topología del sustituyente en la posición R_2 . El compuesto CEQ-18, que demostró ser uno de los *hits* más potentes de esta serie frente a la MPro ($CI_{50} = 8,57 \mu M$), indujo apenas un 29% de inhibición de la PLPro a 25 μM . Esta pérdida de actividad indica que el anillo de tiomorfolina no logra establecer las interacciones necesarias en el sitio de unión a esta enzima. Por el contrario, la incorporación de un sistema alicíclico más voluminoso y flexible, como el anillo de ciclopentilpiperazina presente en los análogos CEQ-29 y CEQ-30, parece proporcionar la complementariedad estérica y la energía de anclaje hidrofóbico requeridas para compensar la penalización entrópica al sitio de unión, como podría ser el bucle BL2 del sitio activo¹⁵⁴.

La divergencia en las potencias obtenidas permite clasificar funcionalmente a las naftoquinonas evaluadas calculando su índice de selectividad (**Tabla 7**). En concordancia con el análisis de la quimioteca local, se observa la coexistencia de dos perfiles farmacofóricos de interés dentro de la misma familia química. Por un lado, se identificaron derivados que actúan como inhibidores selectivos para la MPro ($IS > 2$) al carecer de actividad frente a la PLPro, este comportamiento resulta útil para el diseño de fármacos específicos con bajo riesgo de interacciones inespecíficas. Por otro lado, esta familia de compuestos presenta moléculas de acción dual, perfil en el cual destaca el derivado de mayor potencia (CEQ-29), con IS de 1,14. El bloqueo simultáneo de ambas proteasas evidencia que la presencia de un halógeno en R_1 es esencial para mantener la actividad biológica, dado que su análogo sin dicha sustitución resultó inactivo frente a la PLPro.

La modificación en R_2 aporta una extensa área de superficie hidrofóbica acoplada a una alta flexibilidad conformacional. El análisis de las moléculas inactivas frente a esta proteasa revela que la introducción de sustituyentes aromáticos y rígidos en R_2 resulta desfavorable. Estos grupos generan

impedimentos estéricos que restringen la adaptación estructural de la molécula al sitio activo de la enzima.

4.5 Caracterización del mecanismo de inhibición de los compuestos seleccionados

Para profundizar en el modo de acción de las moléculas activas, se procedió a la caracterización mecanística y estructural de un grupo selecto de inhibidores.

En primer lugar, de la serie de naftoquinonas (Sección 4.4), se seleccionó al derivado CEQ-6. Si bien no exhibió la mayor potencia inhibitoria de la serie evaluada, presentó el perfil de bioactividad más prometedor (los resultados se muestran en las secciones siguientes), destacándose por una citotoxicidad moderada, en contraposición a los demás análogos, y por ser el único derivado con actividad antiviral intrínseca confirmada. Adicionalmente, CEQ-6 demostró una inhibición selectiva de la MPro. En consecuencia, este *hit* fue sometido en exclusiva a los ensayos de reversibilidad por diafiltración y al desafío frente a agentes reductores (DTT), seguidos de un mapeo peptídico por espectrometría de masas (LC-MS) para identificar su sitio de unión y modificación de residuos de la proteasa viral.

En segundo lugar, para los estudios de validación estructural a nivel atómico y mapeo peptídico, resultó imperativo contar con *hits* de alta eficacia. Dado que los *hits* provenientes del cribado de la quimioteca local (Sección 4.3) presentaron en su mayoría potencias limitadas que dificultan la estabilización del complejo enzima-inhibidor, se decidió no avanzar con ellos hacia esta etapa analítica.

En su lugar, se incluyó un *hit* destacado que había sido identificado en una campaña de cribado primario previa a este trabajo. Este compuesto fue seleccionado por su excelente potencia inhibitoria de la MPro ($CI_{50} = 0,034 \mu M$), ausencia de citotoxicidad y una probada eficacia antiviral. Su inclusión permitió validar la formación de aductos covalentes mediante LC-MS y, finalmente, proceder a ensayos que permitiesen resolver la estructura tridimensional del complejo mediante cristalografía de rayos X.

4.5.1. Evaluación de la reversibilidad de inhibición de CEQ-6 de la MPro

Para dilucidar si la interacción entre CEQ-6 y la MPro es de carácter reversible o irreversible, se llevó a cabo un ensayo de recuperación de la

actividad enzimática mediante diafiltración⁶⁰. El fundamento de este ensayo radica en determinar la actividad enzimática pre- y pos-diafiltración del exceso de inhibidor libre en el tampón de reacción. Si la unión enzima-inhibidor es reversible, la remoción del compuesto no unido desplazará el equilibrio hacia la disociación del complejo, permitiendo la restauración progresiva de la actividad catalítica de la proteasa. Por el contrario, si el inhibidor se une de manera covalente o forma un complejo de disociación lenta, la enzima permanecerá inactiva tras el proceso de lavado y diafiltración.

Como se observa en la **Figura 34**, la MPro incubada con CEQ-6 (20 μ M) experimentó una reducción drástica de su actividad catalítica en comparación con el control no tratado. Tras el paso de diafiltración, no se evidenció ninguna recuperación de la actividad enzimática. Por el contrario, el nivel de inhibición se mantuvo casi constante (de 69% a 76%), lo cual es un comportamiento típicamente asociado a inhibidores no reversibles dependientes del tiempo.

El monitoreo cinético y el análisis estadístico de los valores de fluorescencia a punto final ($t = 1000$ s) confirman que no existen diferencias significativas en el estado de inhibición de la proteasa antes y después de la remoción del compuesto libre. Estos resultados apuntan a que CEQ-6 actuaría como un inhibidor irreversible de la MPro.

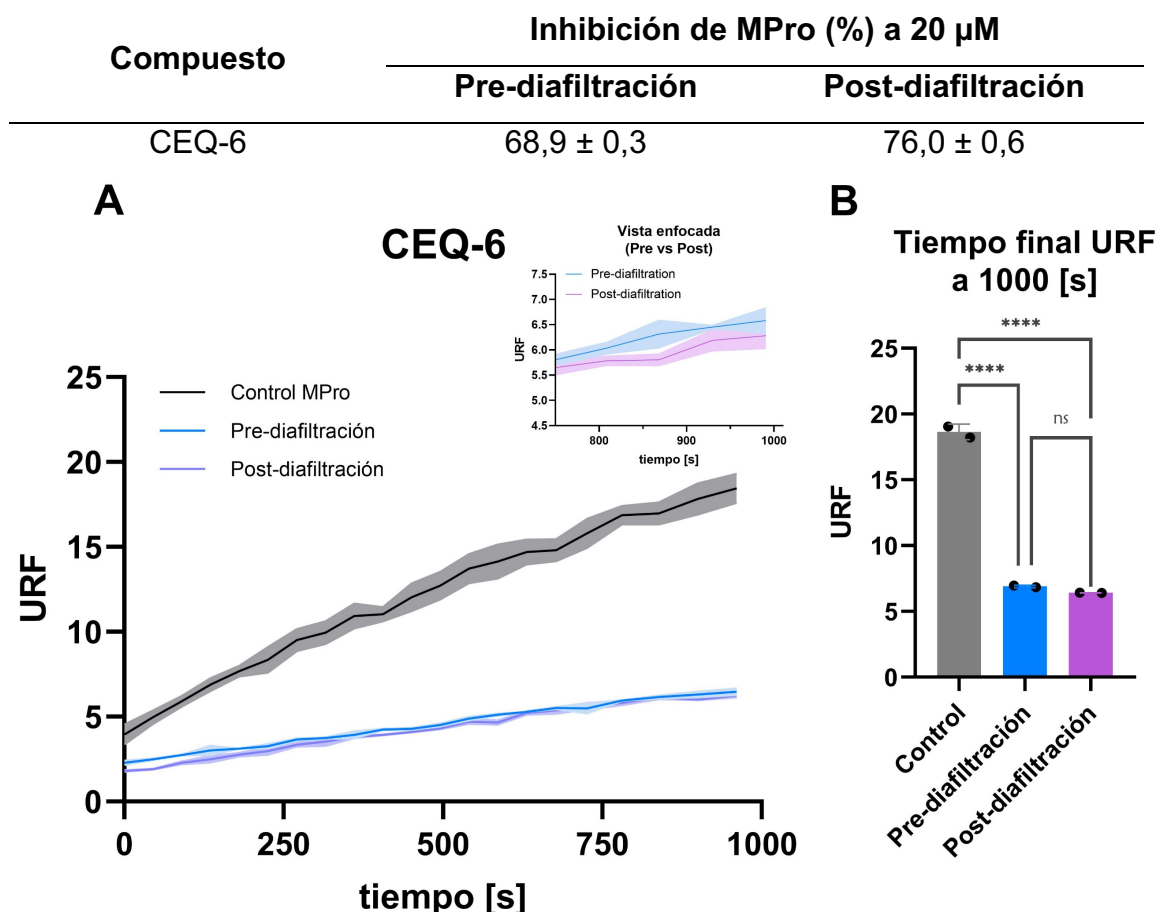


Figura 34. Evaluación de la reversibilidad de la inhibición de la MPro de SARS-CoV-2 por el compuesto CEQ-6. **(A)** Monitoreo cinético continuo de la actividad enzimática de la MPro, expresada en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) durante 1000 s. La curva negra representa el control de MPro sin inhibidor. Las curvas azul y violeta denotan la actividad de la MPro en presencia de CEQ-6 antes (Pre-diafiltración) y después (Post-diafiltración) de la remoción del compuesto no unido, respectivamente. Las líneas continuas representan el promedio de las réplicas y las bandas sombreadas indican la desviación estándar. El recuadro interior proporciona una vista ampliada del intervalo final, evidenciando la ausencia de recuperación enzimática. **(B)** Valores de URF a punto final a $t = 1000$ s. La altura de las barras representa el promedio de las réplicas (**** indica una diferencia estadísticamente significativa $p < 0,0001$ frente al control, **ns** indica diferencia no significativa $p > 0,05$).

El comportamiento observado en el ensayo de diafiltración encuentra sustento en el análisis estructural de la molécula (**Figura 35**). El compuesto CEQ-6 presenta un núcleo estructural de 1,4-naftoquinona sustituido en posición 2 por un átomo de cloro y en posición 3 por un derivado de piperazina. El sistema carbonílico α , β -insaturado característico de las quinonas constituye un centro

electrofílico capaz de actuar como un aceptor de Michael¹⁵¹. Adicionalmente, la presencia de un átomo de cloro adyacente al sistema conjugado funciona como un excelente grupo saliente, lo que abre la posibilidad de una reacción de sustitución con residuos nucleofílicos de la MPro, siendo candidatos el tiol de la Cys145 catalítica o de otras presentes en la superficie de la proteasa que se encuentren en estado tiolato y sean funcional o estructuralmente importantes.

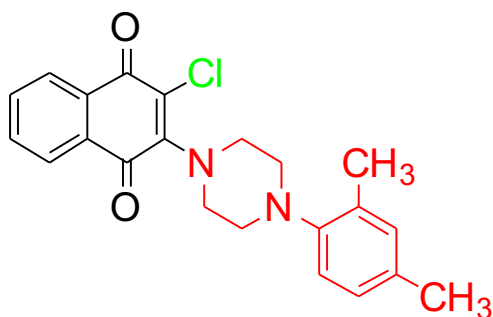


Figura 35. Estructura química del derivado CEQ-6. Se observa el núcleo base de 1,4 naftoquinona, que actúa como potencial aceptor de Michael, sustituido en la posición 2 por un átomo de cloro (verde) y en la posición 3 por un anillo de 1-(2,4-dimetilfenil)piperazina (rojo).

A pesar de esta potencial reactividad química y de la ausencia de recuperación enzimática observada, CEQ-6 exhibe una potencia inhibitoria moderada ($Cl_{50} = 16,4 \mu M$). Esta discrepancia plantea un escenario dual: el compuesto podría estar actuando como un inhibidor covalente de muy baja afinidad inicial, o bien, formando un complejo no covalente de disociación lenta (inhibición de tipo *slow-binding* o parcialmente reversible).

Típicamente, los inhibidores covalentes verdaderos diseñados contra la MPro alcanzan potencias en el rango nanomolar. Un ejemplo es el Nirmatrelvir, el inhibidor de MPro aprobado por la *Food and Drugs Administration* (FDA), el cual forma un enlace covalente reversible con la Cys145 a través de su grupo nitrilo¹⁵⁵. Sin embargo, su alta eficacia radica en un *scaffold* peptidomimético altamente optimizado que garantiza un anclaje no covalente previo de alta afinidad en los sub-bolsillos S1, S2 y S4 de la proteasa.

En contraste, fármacos como el Ensitrelvir logran una potente inhibición de Mpro exclusivamente mediante interacciones no covalentes con una complementariedad estérica perfecta¹⁵⁶. La baja potencia relativa de CEQ-6

sugiere que, aunque su núcleo quinónico posea el “warhead” electrófilo necesario para anclarse a la enzima, la molécula carece de la topología para un reconocimiento no covalente inicial eficiente. Esto induce a pensar que la molécula no está interactuando con la Cys145 del sitio activo. En ese sentido una hipótesis alternativa y mecanísticamente más robusta es que el CEQ-6 podría estar actuando como un inhibidor covalente alostérico.

La MPro de SARS-CoV-2 posee múltiples residuos de cisteína estructuralmente relevantes más allá de la presente en el sitio activo (ej. Cys300 en la interfaz de dimerización, o Cys156 y Cys85 actúan como escudo redox^{157–159}). Dado que la proteasa es activa únicamente como homodímero, la alquilación covalente de una cisteína en la interfaz, o en un bolsillo distal, podría inducir cambios conformacionales desfavorables para la catálisis sin bloquear directamente el sitio activo principal.

Esta alteración indirecta de la dinámica enzimática explicaría por qué se requiere una mayor concentración de compuesto (rango micromolar) para reducir la actividad enzimática, a pesar de tratarse de una modificación irreversible.

Dado que en esta etapa de estudio no se procedió al análisis de los parámetros cinéticos clásicos de inhibición dependiente del tiempo (K_i y k_{inact}), consideramos importante buscar confirmación ortogonal sobre la naturaleza de esta interacción.

Para dilucidar si CEQ-6 establece un enlace covalente con la proteasa, y dicha interacción está mediada específicamente por reactividad frente a grupos tiol, se plantearon ensayos de competencia en presencia de agente reductores, así como la caracterización del complejo proteína-inhibidor mediante espectrometría de masas.

4.5.2. Evaluación de la reactividad del compuesto CEQ-6 frente a tioles en presencia de ditioneitol (DTT)

Para confirmar experimentalmente si la inactivación inducida por el CEQ-6 está mediada por una interacción específica con grupos tiol, se diseñó un ensayo de desafío utilizando el agente reductor ditioneitol (DTT). El diseño experimental resumido (**Figura 36A**) contempló tres tratamientos: la condición **(A)** de inhibición estándar como referencia basal; la condición **(B)** de prevención por

reducción, que evaluó la co-incubación simultánea de la enzima, el inhibidor y el DTT; y la condición **(C)** de reversión de la inhibición, diseñada para determinar si una incubación prolongada con DTT lograba desplazar al inhibidor del complejo preformado.

El análisis reveló diferencias marcadas en la actividad de la MPro dependiendo de los tratamientos aplicados (**Figura 36B y C**). En la condición **(A)**, el nivel de inhibición se mantuvo sin cambios respecto al control. La co-incubación desde el tiempo cero (condición **B**) logró una prevención parcial de la inactivación. Sin embargo, el hallazgo fundamental se observó en el tratamiento **(C)**, donde la incubación de 30 min con DTT logró rescatar de manera casi total la actividad de la proteasa.

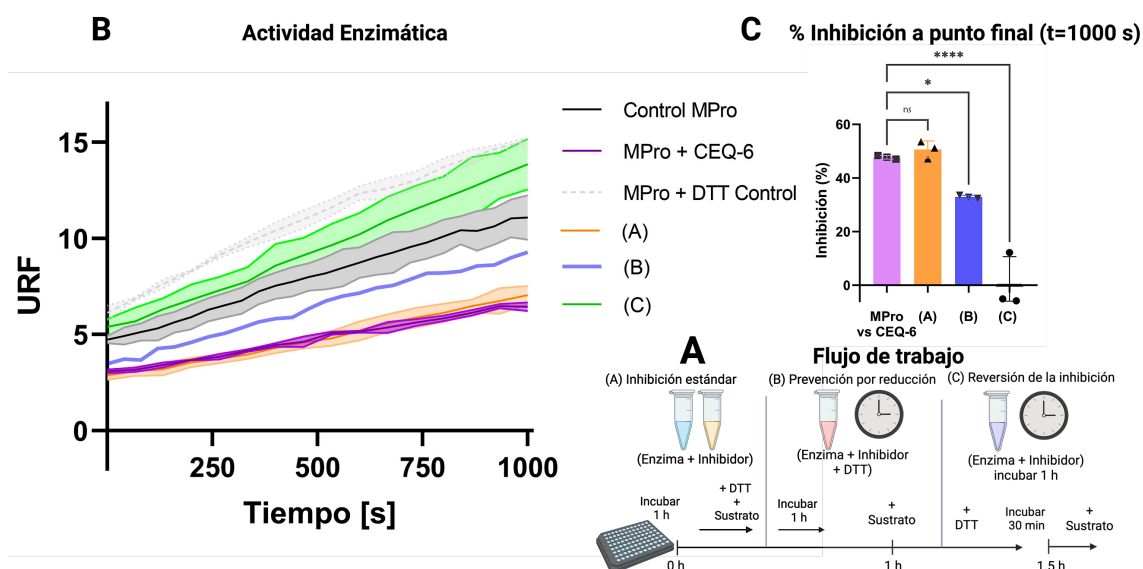


Figura 36. Evaluación de la dependencia de tioles en la inhibición de la MPro por el derivado CEQ-6. **(A)** Representación esquemática del diseño experimental. **(B)** Monitoreo cinético continuo de la actividad de MPro, expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF), durante 1000 s. Se representan las trayectorias para los controles y las condiciones A, B y C. Las líneas continuas indican el promedio de las réplicas ($n = 3$), mientras que las bandas sombreadas corresponden a la desviación estándar (SD). **(C)** Cuantificación del porcentaje de inhibición a punto final ($t = 1000$ s). Los valores se encuentran normalizados respecto al control de la MPro en presencia de DTT. Las barras representan el promedio $\pm$ SD. La significancia estadística se determinó mediante un análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Dunnett frente al grupo de inhibición estándar (* $p < 0,0001$; ns, no significativo $p > 0,05$).

La marcada divergencia en la respuesta frente a los tres tratamientos obedece a las particularidades cinéticas que rigen la ruptura del aducto covalente. En el tratamiento **(A)**, la adición simultánea del agente reductor y el sustrato fluorogénico al complejo enzima-inhibidor preformado no logró revertir la inhibición. Esto evidencia que el desplazamiento del inhibidor ya sea por una reacción de Michael reversa o por la reducción química de la naftoquinona, no es un proceso instantáneo. Al iniciar el monitoreo de la actividad enzimática de inmediato, el DTT carece del tiempo de contacto necesario para desensamblar el aducto, en principio, covalente, por ello la proteasa se mantiene en estado inactivo durante la ventana de medición.

Por su parte, el tratamiento **(B)** reveló una prevención parcial de la inhibición (con una inhibición remanente aproximada del 35%). Este escenario refleja una competencia cinética directa: los residuos nucleofílicos de la proteasa y las moléculas de DTT libres en el medio compiten simultáneamente por reaccionar con el centro electrófilo del CEQ-6. El hecho de que la protección de la enzima no haya sido absoluta, a pesar de la alta concentración del agente reductor (1 mM), sugiere que el inhibidor mantiene una afinidad y reactividad competitivas por la diana proteica, logrando alquilar e inactivar a una fracción de las enzimas antes de ser “secuestrado” o químicamente neutralizado por el DTT en solución.

En marcado contraste, la recuperación total de la actividad catalítica observada en la condición **(C)** resalta la naturaleza tiempo-dependiente de la reversibilidad de este enlace. Al proporcionar una ventana de incubación de 30 min entre el complejo preformado enzima-inhibidor y el DTT, de forma previa a la adición del sustrato, se otorgan las condiciones cinéticas óptimas para que el exceso del agente reductor de bajo peso molecular desplace el equilibrio MPro-CEQ-6 hacia la disociación. Este lapso permite que este DTT reduzca de manera eficaz el enlace covalente MPro-CEQ-6, liberando la totalidad de la enzima en su conformación catalíticamente activa, confirmando así la naturaleza tiol-dependiente de la inhibición.

En consecuencia, los datos cinéticos y el desafío con agente reductor respaldan que se estaría formando un enlace covalente reversible entre el CEQ-6 y un residuo de cisteína de la MPro. No obstante, para discernir si dicha modificación ocurre en la Cys145 del sitio activo o en un residuo alostérico,

resulta imprescindible la caracterización estructural directa del complejo, la cual se abordó mediante espectrometría de masas (LC-MS).

4.5.3. Identificación del sitio de modificación covalente mediante mapeo peptídico (LC-MS)

Para identificar los residuos específicos de la MPro involucrados en la formación de aductos covalentes, se llevó a cabo un mapeo peptídico de la enzima tratada con los *hits* mediante digestión con quimiotripsina acoplada a cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

4.5.3.1 *Análisis del derivado de naftoquinona (CEQ-6)*

Para evaluar la unión del compuesto CEQ-6 a la MPro, se realizó la digestión con quimiotripsina de la MPro tratada con este *hit*. El análisis del digerido obtenido arrojó un excelente mapa de cobertura de secuencia del 94,4% para la MPro (**Figura A11**). Sin embargo, la inspección detallada de los iones fragmento reveló únicamente la presencia de las modificaciones estándar esperadas por el protocolo de preparación de la muestra, correspondientes a residuos de cisteína carbamidometilados (+57,02 Da) y metioninas oxidadas (+15,99 Da). No se detectó ningún desplazamiento de masa que evidenciara la presencia del posible aducto covalente de CEQ-6 en los péptidos analizados.

Lejos de contradecir los resultados enzimáticos previos, esta aparente discrepancia proporciona información sobre la naturaleza de la interacción. Los ensayos de diafiltración y desafío con DTT evidenciaron previamente que el CEQ-6 forma un complejo dependiente de tioles, pero el análisis por LC-MS indica que dicho enlace no sobrevive a las condiciones del mapeo peptídico. Este fenómeno es característico de los inhibidores covalentes reversibles con reactividad moderada. Para que el aducto se mantenga estable, requiere del microambiente fisicoquímico y de las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, empaquetamiento hidrofóbico). Durante la preparación de la muestra para LC-MS, la proteína es sometida a agentes desnaturizantes, cambios drásticos de pH y digestión proteolítica. Al perderse la arquitectura tridimensional de la proteasa, se elimina la energía de estabilización del sitio de unión, forzando un desplazamiento rápido del equilibrio químico hacia la disociación del complejo enzima-inhibidor. En consecuencia, el inhibidor se estaría desprendiendo antes

de la ionización, dejando a las cisteínas libres para ser alquiladas por la yodoacetamida (generando la marca de +57,02 Da detectada).

Estos datos estructurales respaldan el perfil de inhibición del CEQ-6 como un inhibidor covalente reversible y lábil. La estabilidad del aducto depende críticamente de la integridad conformacional de la MPro en solución; la pérdida de la estructura tridimensional desplaza el equilibrio hacia la disociación, permitiendo que la yodoacetamida alquile los residuos de cisteína recién liberados.

De manera complementaria, la incapacidad de detectar el aducto covalente C-S se ve exacerbada por las propias condiciones analíticas del ensayo. El enlace tioéter formado por este compuesto posee una energía relativamente débil (aproximadamente 87 kcal/mol, asimilable a la del enlace S-H). En el caso de que una fracción minoritaria del complejo enzima-inhibidor hubiese sobrevivido a la preparación de la muestra, la alta energía aplicada durante la ionización y la fragmentación inducida por colisión en el LC-MS/MS promueven la ruptura del enlace. Esta transferencia de energía interna al aducto induce una reacción de reto-Michael, dando lugar a la escisión del enlace C-S con la consecuente regeneración del doble enlace C=C en la estructura de la naftoquinona y el tiol libre en la cisteína. En consecuencia, la sinergia entre la labilidad del complejo enzima-inhibidor en solución desnaturalizante y la vulnerabilidad del enlace tioéter frente a la energía de ionización imposibilitó la identificación del residuo modificado.

4.5.3.2 Análisis por espectrometría de masas de un hit de MPro de alta afinidad análogo de ebsulfur

Con el fin de evaluar si podíamos confirmar la unión a la MPro de compuestos con mayor potencia inhibitoria ($CI_{50} = 34$ nM) se trabajó con el compuesto AM79.

Esta molécula se identificó en una campaña previa de búsqueda de inhibidores de esta proteasa con actividad contra el SARSCoV-2 y el mecanismo de inhibición fue objeto de estudio en el proyecto CSIC I+D "Inhibidores de la MPro de SARS-CoV-2 identificados en una campaña nacional de cribado: modo de inhibición y unión a su diana molecular". El compuesto AM79 (**Figura 37**, (R_1 - $R_3 = H$, $R_4 =$ meta-trifluorometilfenilo), pertenece a la familia de los compuestos organoazufrados (benzisotiazolonas), caracterizados estructuralmente por

poseer un núcleo farmacofórico de benzisotiazol-3(2H)-ona. El ebsulfur (2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona) y su seleno-análogo, el ebselen (2-fenil-1,2-benzoselenazol-3(2H)-ona) han sido ampliamente estudiados por su capacidad para actuar como miméticos de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), lo que les confiere marcadas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras y antiparasitarias^{160–164}.

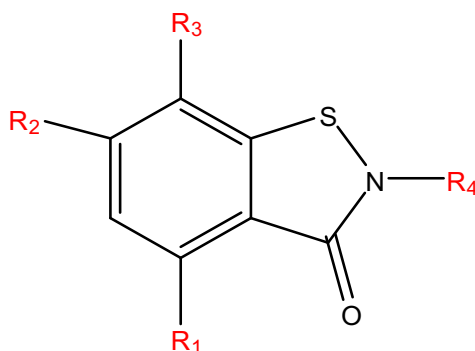


Figura 37. Estructura general de las benzisotiazolonas. Se representa el núcleo base organoazufrado y los posibles sitios de sustitución (R_1 , R_2 , R_3 y R_4). El enlace S-H constituye el centro electrófilo responsable de la reactividad de esta familia de compuestos. La ruptura de este enlace por ataque nucleofílico del tiolato de una cisteína da lugar a la formación de un puente disulfuro compuesto-proteína.

Desde el punto de vista mecanístico, la actividad biológica de estos derivados radica en la alta reactividad de su enlace azufre-nitrógeno frente a residuos nucleofílicos. Esta clase de compuestos presentan una aversez específica por reaccionar de forma covalente con grupos tiol libres, formando enlaces disulfuro con los residuos de cisteína expuestos al solvente en diversas proteínas y enzimas¹⁶⁵. En el ámbito antiviral, esta alta reactividad química ha posicionado a los derivados de ebsulfur como inhibidores pleiotrópicos eficaces contra múltiples proteasas virales ricas en cisteínas, destacando recientemente por su potente actividad inhibitoria frente a las dianas del SARS-CoV-2^{160,165,166}.

Los datos obtenidos evidencian que el compuesto AM79 es un potente inhibidor de la MPro ($CI_{50} = 0,034 \mu M$) y presenta actividad frente a la PLPro ($CI_{50} = 2,3 \mu M$). Estudios de caracterización previos demostraron que actúa como un inhibidor de unión covalente parcialmente reversible frente al desafío con el agente reductor DTT. Con el objetivo de mapear los sitios de unión específicos de este compuesto en la MPro, se procedió a analizar los espectros de

fragmentación MS/MS del complejo enzima-inhibidor. La inspección detallada de los datos de LC-MS/MS reveló la presencia de un incremento de masa (Δm) de +295,0279 Da acoplado a varias secuencias peptídicas de la proteasa, confirmando experimentalmente que el compuesto AM79 se une a la MPro por la ruptura del anillo benzisotiazolona y la consecuente alquilación del residuo mediante un enlace disulfuro. Sorprendentemente, los datos espectrométricos no evidenciaron la presencia de este aducto en la Cys145 del sitio activo, aunque esta falta de detección analítica no descarta definitivamente que el residuo haya sido modificado. Por el contrario, el análisis permitió identificar la modificación simultánea en tres residuos de cisteína distintos: Cys85, Cys265 y Cys300 (Figura 38).

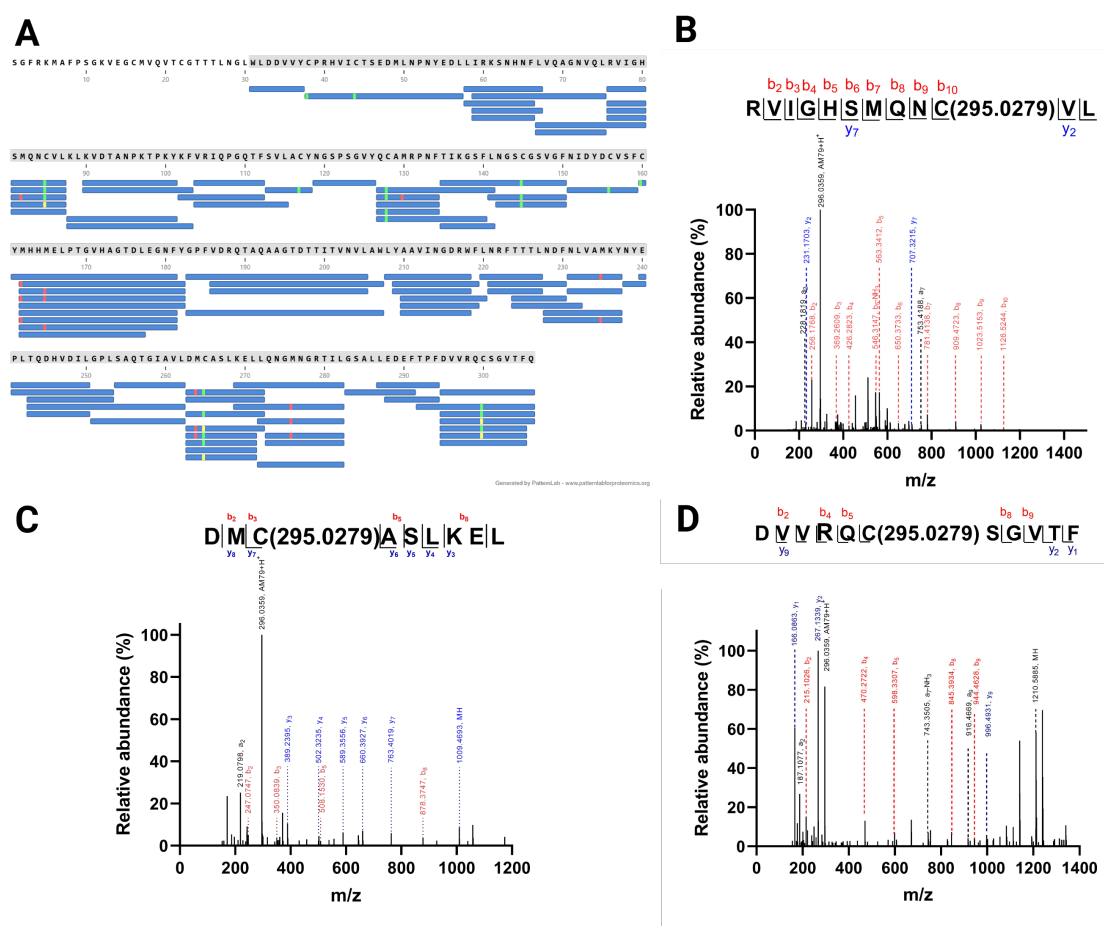


Figura 38. Mapeo peptídico e identificación por espectrometría de masas de los sitios de modificación covalente de la MPro por el compuesto AM79. (A) Mapa de cobertura de secuencia de la proteasa obtenido tras la digestión con quimiotripsina alcanzando un 90,2% de cobertura de la secuencia primaria de la proteasa. Las barras horizontales azules representan los péptidos identificados y alineados con la secuencia

primaria. Las líneas verticales al interior de las barras indican las modificaciones específicas en los aminoácidos: residuos de cisteína carbamidometilados (+57,02 Da; verde), metioninas oxidadas (+15,99 Da; rojo) y cisteínas modificadas por el inhibidor (+296,0359 Da; amarillo) **(B-D)** Espectros de fragmentación MS/MS representativos de los péptidos de MPro modificados por AM79. Se detalla la asignación de los iones fragmento de las series *b* (rojo) y la serie *y* (azul) que corroboran la identidad de la secuencia peptídica y se observan los iones con la señal m/z 296,0359 correspondiente al AM79 protonado, $AM79+H^+$ para los péptidos modificados en: **(B)** Cys85, **(C)** Cys265 y **(D)** Cys300. El eje de las abscisas representa la relación masa-carga (m/z) y el de las ordenadas la abundancia relativa de los iones.

La modificación covalente de la Cys300 resulta el hallazgo más interesante que podría explicar la potente actividad inhibitoria del compuesto sobre la MPro. Este residuo se localiza en la región C-terminal del dominio III (**Figura 39**), una región α -helicoidal que gobierna la formación de la interfaz de dimerización de la MPro^{158,167,168}. Dado que la proteasa es catalíticamente activa de forma exclusiva como homodímero, la introducción de un andamiaje voluminoso en la Cys300 genera un impedimento estérico que seguramente impide el correcto acoplamiento entre los monómeros, inactivando a la enzima por un mecanismo alostérico¹⁵⁸.

Evidencias experimentales previas mostraron que EbSe (un análogo con selenio del EbS) e inhibidor de la MPro pueden inducir un cambio en la estructura dimérica de la proteína. Estudios de espectrometría de masa han identificado unión a la Cys300 y que esta podría alterar la interfaz del dímero de MPro lo cual es consistente con la unión encontrada en esta tesis.

Esta hipótesis de disrupción estructural e inactivación alostérica se ve respaldada por los ensayos biofísicos previos de termoestabilidad de la MPro mediante nanoDSF (Prometheus NT.48). Típicamente, los inhibidores competitivos clásicos que se unen al sitio activo estabilizan la conformación de la enzima, provocando un aumento en su temperatura de fusión. Por el contrario, la interacción con el compuesto AM79 provoca un descenso drástico de la temperatura de fusión de la proteasa (evaluada a una tasa de calentamiento de 1 °C/min), pasando de 55 °C a aproximadamente 39 °C. Este desplazamiento negativo tan severo (ΔT_m aproximado de -16 °C) constituye una evidencia biofísica directa de una desestabilización estructural global. Este fenómeno

indicaría que la alquilación mediada por el compuesto AM79, en la Cys300, impide la transición al del estado homodimérico estable, forzando a la proteína a permanecer en un estado monomérico o conformacionalmente distorsionado, el cual es significativamente más susceptible a la desnaturalización térmica.

Por su parte, la alquilación de la Cys85 (localizada en la superficie del dominio I) y de la Cys265 (ubicada en el dominio III; **Figura 39**) evidencia la alta reactividad del enlace heteroatómico azufre-nitrógeno frente a tioles expuestos al solvente¹⁵⁷. Si bien la modificación de estos residuos periféricos no afectaría de manera directa a la catálisis por estar alejados del sitio catalítico de la proteasa, esto podría alterar el panorama fisicoquímico de la superficie proteica e indirectamente, el correcto plegamiento de regiones que confieren estabilidad estructural a la proteína. Este conjunto de resultados corrobora empíricamente que el mecanismo de acción de esta familia química se fundamenta en su reactividad electrofílica.

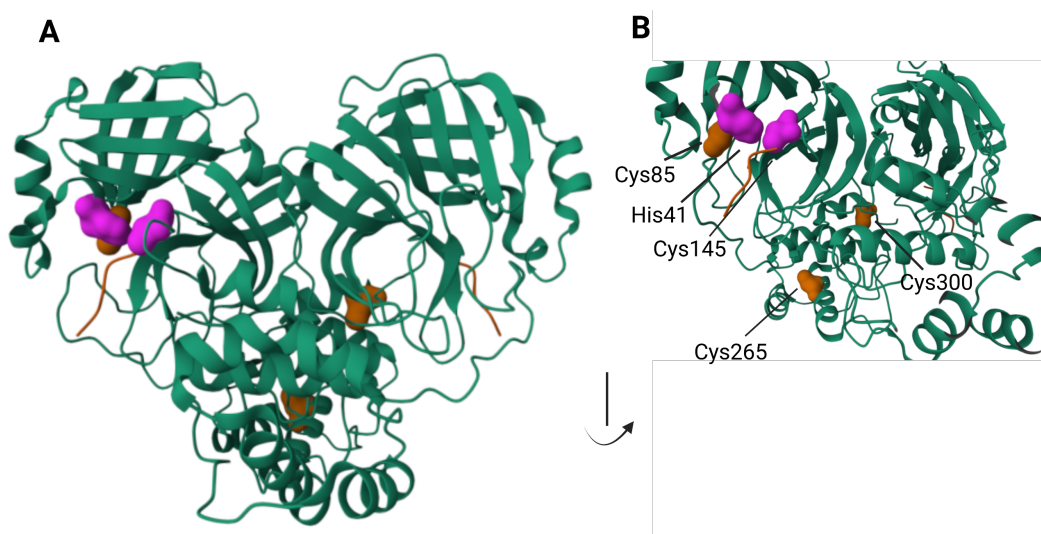


Figura 39. Localización de los residuos de cisteína de la MPro de SARS-CoV-2 modificados covalentemente por AM79. (A) Representación tridimensional del homodímero de la MPro (PDB: 7BQY). **(B)** Vista ampliada de un protómero detallando la ubicación de la diada catalítica (Cys145-His41) en magenta y las cisteínas periféricas susceptibles a la alquilación por el compuesto AM79 (naranja).

Para confirmar la naturaleza química reversible de estas modificaciones, se replicó el mapeo peptídico incubando el complejo MPro-AM79 en presencia del agente reductor DTT. Bajo estas condiciones, no se detectaron espectros de

fragmentación de péptidos que presentaran un incremento de masa de +295,0279 Da. Solo se identificaron las masas correspondientes a los fragmentos nativos y carbamidometilados (**Figura A12**). Este resultado analítico complementa los datos biofísicos anteriores, demostrando que el compuesto AM79 logra una inactivación robusta y alostérica de la MPro mediante la formación de enlaces disulfuro estructuralmente desestabilizantes pero susceptibles a la reducción química.

4.5.4. Ensayos de cristalización y aproximación estructural de los complejos MPro-inhibidor

En este trabajo se buscó identificar condiciones que permitieran obtener estructuras cristalinas de la MPro en complejo con inhibidores previamente identificados en el laboratorio. Para ello, en una primera instancia se evaluó una estrategia de co-cristalización mediante la obtención de estructuras cristalinas de la MPro en complejo con inhibidores empleando la misma versión recombinante de la enzima utilizada en esta tesis.

Para estos estudios se seleccionaron 9 inhibidores de la MPro, previamente identificados en el laboratorio, pertenecientes a cinco familias químicas: chalconas, benzofuroxanos, selenoglicósidos, benzisotiazolonas y tiazoles. La selección se basó principalmente en dos criterios: la diversidad estructural de los compuestos y su efecto sobre la estabilidad térmica de la enzima. Estos inhibidores, luego de ser incubados con la MPro en una relación molar inhibidor:enzima de 10:1, no produjeron cambios significativos en la temperatura de melting (TM) aparente de la proteasa.

La ausencia de cambios marcados o aumento del valor del TM se consideró como un indicador indirecto de que los compuestos no desestabilizaban severamente la conformación global de la proteasa, siendo menos probable que induzcan una heterogeneidad conformacional importante, factores que podrían interferir con el empaquetamiento ordenado requerido para la formación de una red cristalina. Al seleccionar los compuestos menos disruptivos, se intentó maximizar la probabilidad de obtener cristales del complejo proteína:inhibidor adecuados para estudios estructurales.

Para llevar a cabo los ensayos de co-cristalización, se procedió tal como se describe en la Sección 3.8. Usando las condiciones de cristalogénesis que

resultaron exitosas para la forma *apo* de la enzima (diferentes variantes con PEG entre 13% v/v y 31% v/v) se prepararon placas por el método de difusión de vapor en gota sentada en placas de 96 pocillos empleando el robot de cristalización Honeybee963®. El monitoreo periódico de las placas permitió identificar eventos de cristalogénesis exitosos para cuatro de los nueve compuestos ensayados pertenecientes a las familias químicas de las chalconas y los tiazoles (**Figura 40**). Se observó polimorfismo en el crecimiento, evidenciado por la formación de clústeres de microcristales tipo aguja y placas bidimensionales.

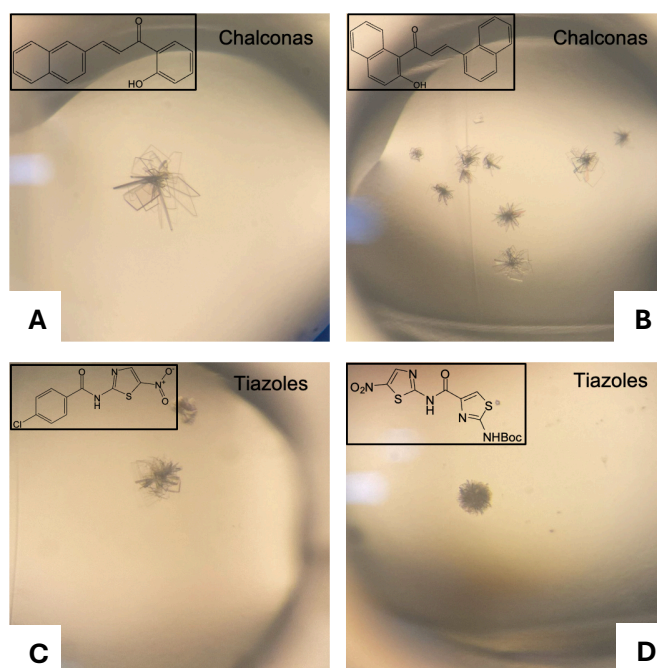


Figura 40. Cristales de la MPro obtenidos por co-cristalización en presencia de inhibidores. Se muestran imágenes representativas de cristales obtenidos en presencia de distintos inhibidores, bajo condiciones de 0,1 M MES pH 6,5 y 25% PEG 6000/4000. **(A, B)** Cristales obtenidos con compuestos de la familia de las chalconas. **(C, D)** Cristales obtenidos con compuestos de la familia de los tiazoles.

De este cribado cristalográfico, se logró montar y crioproteger un cristal proveniente de la incubación con una de las chalconas (**Figura 40A**), para la recolección de datos de difracción de rayos X en condiciones criogénicas. El procesamiento de los datos mediante el programa Xia2 arrojó excelentes estadísticas cristalográficas, logrando una resolución límite de alta calidad de 2,11 Å en el grupo espacial monoclinico C121 (**Tabla 8**).

A partir de estos datos, la estructura tridimensional se resolvió exitosamente por el método de reemplazo molecular utilizando el programa Phaser, tomando como modelo de búsqueda una estructura *apo* de la MPro previamente depositada en el PDB (PDB ID: 7ALH).

Tabla 8. Parámetros de difracción de rayos X para el cristal del complejo MPro con el inhibidor de la familia de las chalconas.

for automatic/default/native	Overall	Low	High
High resolution limit	2.11	5.72	2.11
Low resolution limit	28.16	28.16	2.15
Completeness	79.5	70.4	48.8
Multiplicity	2.7	3.0	2.3
I/sigma	14.5	42.5	2.9
Rmerge(I)	0.093	0.042	0.349
Rmerge(I+/-)	0.079	0.039	0.300
Rmeas(I)	0.116	0.050	0.442
Rmeas(I+/-)	0.112	0.055	0.425
Rpim(I)	0.068	0.028	0.266
Rpim(I+/-)	0.079	0.039	0.300
CC half	0.990	0.997	0.594
Wilson B factor	20.420		
Anomalous completeness	72.7	64.6	36.5
Anomalous multiplicity	1.4	1.7	1.3
Anomalous correlation	-0.226	0.065	-0.062
Anomalous slope	1.222		
dF/F	0.127		
dl/s(dl)	1.091		
Total observations	32676	1711	844
Total unique	12237	570	372
Assuming spacegroup:	C 1 2 1		
Unit cell (with estimated std devs):	114.834(8)	53.685(2)	44.7125(16) 90.0 101.208(5) 90.0

A pesar de la alta calidad del mapa de densidad electrónica general, la inspección detallada del modelo no reveló ninguna densidad residual que indicara la presencia del ligando unido a la estructura de la proteína. Una posible explicación de este resultado es que el paso de ultrafiltración empleado para eliminar agregados también elimina el inhibidor libre en solución. En caso de ligandos cuya cinética sea reversible, y que no sean de alta afinidad, la remoción del exceso de ligando fuerza un rápido desplazamiento del equilibrio hacia la

disociación del complejo enzima-inhibidor. En consecuencia, durante el periodo de incubación prolongado que requiere el crecimiento del cristal, la enzima se encontrará mayoritariamente en su estado *apo*. Dado que esta forma de la MPro cristaliza de manera muy favorable en presencia de polietilenglicol (PEG), la red cristalina selecciona y empaqueta preferencialmente a la proteína libre de ligando.

Con el fin de obtener cristales de mayor volumen, optimizar el orden interno de la red cristalina y evaluar si es posible retener al compuesto, se procedió a realizar un escalado utilizando placas de 24 pocillos y el método de difusión de vapor en gota colgante. Se exploró un espacio de cristalización ampliado dispensando mediante un robot Alchemist DT[®] volúmenes mayores de proteína (1 a 2 μ L) y reservorio (2 μ L), realizando un tamizado fino de la concentración de PEG (13% a 31%) y del pH del tampón MES (6,4 a 6,7). Bajo estas nuevas variables termodinámicas e hidrodinámicas, únicamente se logró reproducir la cristalización observada en el cribado original para la enzima tratada con un inhibidor de la familia de los tiazoles (**Figura 40D**). No obstante, estos nuevos cristales evidenciaron defectos de crecimiento y falta de regularidad, por lo que no presentaron la calidad óptima requerida para difractar eficientemente los rayos X, imposibilitando una nueva recolección de datos.

Más allá de las limitaciones cinéticas impuestas por el protocolo, la dificultad para obtener cristales del complejo Mpro:inhibidor con una calidad de difracción adecuada encuentra múltiples justificaciones en la termodinámica fundamental de la cristalogénesis. Este proceso requiere explorar un amplio espacio de condiciones fisicoquímicas hasta identificar aquellas que favorezcan simultáneamente la nucleación, el crecimiento cristalino y el mantenimiento de un empaquetamiento ordenado de la proteína¹⁶⁹. Si bien la resolución de un mapa de densidad electrónica proporciona una evidencia estructural directa del modo de unión, el éxito del proceso depende de variables sumamente restrictivas, que pueden variar para cada complejo de enzima:inhibidor.

Por ejemplo, la unión de ligandos, particularmente aquellos que reaccionan con múltiples tioles superficiales o que actúan de forma alostérica, pueden inducir variabilidad estructural. Además, si la ocupación del inhibidor en el sitio de unión no es total, se genera una mezcla de poblaciones *apo* y *holo* en solución que imposibilita el ensamblaje de una red cristalina periódica y ordenada^{169,170}.

Por otro lado, factores fisicoquímicos como la solubilidad de los compuestos orgánicos juegan un rol limitante durante el método de difusión de vapor. A medida que la gota se deshidrata y concentra, los inhibidores (tales como las chalconas y benzisotiazolonas) pueden alcanzar su límite de solubilidad, formando microagregados amorfos. Estos agregados actúan como “venenos” de cristalización que alteran la tensión superficial de la gota y promueven la precipitación amorfa de la proteína o inducen defectos en el crecimiento del cristal¹⁷¹.

Finalmente, las interacciones MPro:inhibidor pueden interferir de manera directa con los contactos intermoleculares. Si el compuesto se une a residuos expuestos al solvente que son indispensables para estabilizar las interacciones de red cristalina características de la enzima nativa (como en el grupo espacial C 1 2 1), la formación del complejo genera un impedimento estérico severo¹⁶⁹. Bajo estas condiciones, el sistema favorece el empaquetamiento exclusivo de las moléculas de MPro libres de ligando.

En conjunto, estos ensayos confirman la capacidad de la MPro para cristalizar bajo condiciones de precipitación con PEG, pero también evidencian los desafíos asociados a la obtención de complejos MPro:inhibidor mediante co-cristalización. Estos resultados sugieren que la obtención de estructuras cristalinas de los complejos requerirá optimizar las condiciones de cristalogénesis para cada inhibidor, considerando tanto las propiedades fisicoquímicas del compuesto como su posible impacto sobre la estabilidad, la homogeneidad conformacional y el empaquetamiento cristalino de la enzima.

Validaciones estructurales para estas familias químicas requerirán metodologías alternativas, tales como el empapado de cristales nativos (*soaking*), en el cual la concentración del inhibidor y las fuerzas de la red cristalina preexistente se mantienen constantes para forzar la ocupación del sitio de unión sin alterar la nucleación^{172,173}.

4.6 Evaluación biológica de los *hits*

Para caracterizar desde el punto de vista biológico los compuestos que presentaron actividad inhibitoria sobre la MPro, se evaluó su toxicidad en la línea celular humana A549, derivada de epitelio pulmonar. La selección de la línea se realizó con el fin de representar uno de los tejidos blanco de la infección por el

virus. Estos ensayos permiten, obtener información sobre la toxicidad no deseada de los compuestos sobre la célula huésped, y así poder seleccionar cuáles de ellos estarían en condiciones de ser evaluados en los modelos de infección viral. De esta forma podrían descartarse falsos positivos derivados de la muerte celular e identificar aquellos *hits* que poseen un margen de seguridad o ventana terapéutica adecuada.

4.6.1. Determinación de la citotoxicidad de los *hits* en células A549

Para determinar la concentración citotóxica media (CC_{50}) de los *hits* provenientes de las campañas de cribado sobre la línea celular de epitelio pulmonar humano A549 se empleó el reactivo WST-1. Este compuesto es una sal de tetrazolio que es metabolizada por las células vivas en un proceso catalizado por deshidrogenasas y reductasas desarrollando una coloración proporcional a la viabilidad celular. Los *hits* fueron ensayados entre 50 y 100 μM y se estableció como criterio de seguridad un valor estándar en química medicinal de $CC_{50} > 50 \mu M$ (aquellos que mostraron citotoxicidad se testearon a concentraciones menores). Las placas de células tratadas con los compuestos fueron observadas al microscopio para verificar la ausencia de cristales de los compuestos en el medio de cultivo y evitar una subestimación de los valores de CC_{50} . Los resultados evidenciaron perfiles de tolerabilidad marcadamente disímiles y dependientes de la familia química, lo que subraya la importancia de la estructura base o esqueleto (*scaffold*) así como de sus sustituyentes, en la inducción del efecto citotóxico (**Tabla 9; Figura 41**).

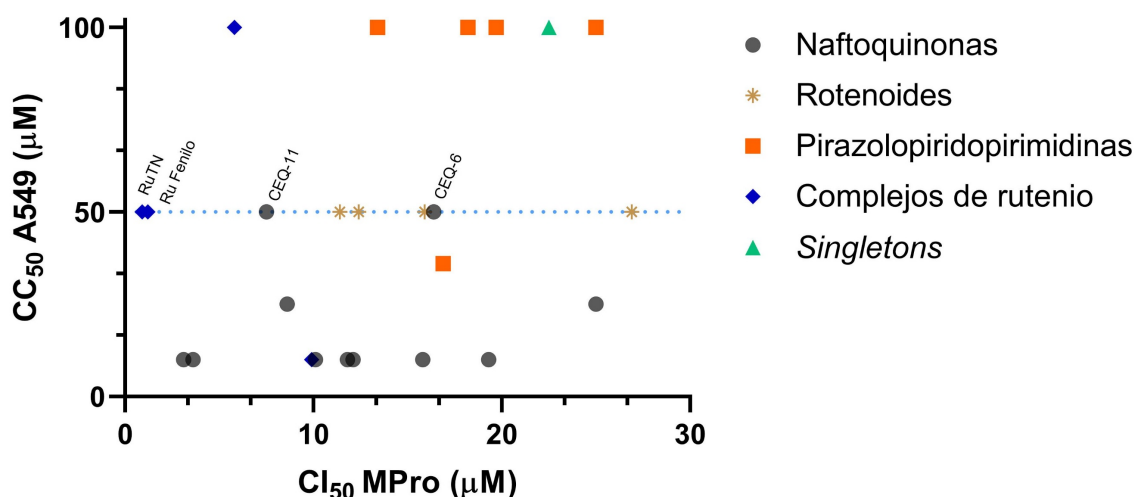


Figura 41. Perfil bidimensional de potencia enzimática y viabilidad celular para las familias de inhibidores. Gráfico de dispersión que correlaciona la concentración inhibitoria media sobre la MPro (Cl_{50} , eje abscisas) y la concentración citotóxica media en la línea celular A549 (CC_{50} , eje de ordenadas). La línea horizontal punteada marca el umbral para determinar si un *hit* es citotóxico. **Nota:** Los compuestos graficados con valores de CC_{50} anclados exactamente en 50 y 100 μM corresponden a moléculas que no resultaron citotóxicas a dichas concentraciones máximas evaluadas.

Tabla 9. Resumen comparativo de la actividad inhibitoria sobre la MPro (Cl_{50}) y la citotoxicidad en células A549 (CC_{50}) para los *hits* de esta proteasa.

Familia Química	Compuesto	Cl_{50} MPro (μM)	CC_{50} A549 (μM)
Rotenoides	Rot-9	$15,9 \pm 1,2$	>50
	Rot-14	$26,0 \pm 4,7$	>50
	Rot-31	$12,4 \pm 1,1$	>50
	Rot-32	$11,4 \pm 2,4$	>50
Pirazolopiridopirimidinas	PRV-B75	$16,9 \pm 1,3$	~36
	PRV-D64	~25	>100
	PRV-D66	$13,4 \pm 0,7$	>100
	PRV-D76	$18,2 \pm 2,5$	>100
	PRV-D77	$19,7 \pm 3,1$	>100
Complejos de rutenio	Ru TN	$0,9 \pm 0,1$	>50
	Ru fenilo	$1,2 \pm 0,2$	>50
	RuCpTM	$5,8 \pm 0,8$	~100
	RU9	$9,9 \pm 1,1$	<10
	RuCpCTZ	$12,5 \pm 2,8$	ND

Singletons	J 355	0,2 ± 0,02	ND
	P-2293486	~25	>100
	V 001	22,5 ± 3,3	>100
Naftoquinonas	CEQ-6	16,4 ± 0,2	>50
	CEQ-8	11,8 ± 0,4	<10
	CEQ-9	~25	<25
	CEQ-11	7,5 ± 0,3	>50
	CEQ-12	11,8 ± 1,0	<10
	CEQ-17	10,1 ± 0,7	<10
	CEQ-18	8,6 ± 0,4	<25
	CEQ-20	19,3 ± 0,6	~10
	CEQ-21	15,8 ± 0,5	<10
	CEQ-24	12,1 ± 0,5	<10
	CEQ-29	3,6 ± 0,2	<10
	CEQ-30	3,1 ± 0,1	<10

ND: No Determinado

Nota: Los datos de citotoxicidad y actividad inhibitoria sobre MPro se expresan como la media ± desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado (n = 3).

Se evaluaron 29 compuestos en esta línea celular, de los cuales solamente 12 presentaron una CC₅₀ menor a 50 µM. De los 12 compuestos, uno (PRV B75) pertenece a la familia de las pirazolopiridopirimidinas, uno a la familia de los complejos de rutenio (Ru9) y los otros 10 a la familia de las naftoquinonas (CEQ: 8, 9, 12, 17, 18, 20, 21, 24, 29 y 30), 2 moléculas no fueron determinadas por razones fuera de nuestro alcance (falta de sólido del compuesto o solución stock de trabajo).

A continuación, se discuten los resultados para cada familia en particular.

4.6.1.1 *Análisis de citotoxicidad de la familia de los rotenoides*

Los resultados de viabilidad celular para los derivados rotenoides resultaron ser de los más consistentes en comparación con el resto de las familias evaluadas, logrando que la totalidad de los *hits* (4; Rot-9, 14, 31, 32) exhibieran una CC₅₀ superior a 50 µM (**Figura 42**). Este perfil resulta destacable, ya que los rotenoides naturales, tales como la rotenona y la deguelina, son ampliamente

reconocidos por su profunda citotoxicidad basal^{174–176}. El mecanismo de acción tóxico primario de estos isoflavonoides policíclicos radica en la inhibición potente y selectiva del Complejo I mitocondrial (NADH:ubiquinona oxidorreductasa) en la cadena de transporte de electrones^{174,176}. Al bloquear la transferencia de electrones, los rotenoides clásicos interrumpen la fosforilación oxidativa, inducen el rápido agotamiento del ATP intracelular y desencadenan una producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo a la apoptosis celular. Dado que la línea celular A549 es metabólicamente activa (dependiente de la respiración mitocondrial), era predecible que los derivados de este *scaffold* presentaran una letalidad intrínseca elevada. Sin embargo, al enmarcarse como compuestos no citotóxicos según los criterios aplicados (superando el límite inferior de 50 μM), se infiere que las modificaciones estructurales específicas introducidas en sus anillos periféricos han logrado anular exitosamente la afinidad por la enzima respiratoria. La incorporación de estos sustituyentes genera una densa nube electrónica que seguramente imposibilita el anclaje de la molécula al Complejo I por impedimento estérico. En este contexto, los derivados de la serie ROT se consolidan como *hits* optimizados que han superado el principal obstáculo inherente asociado a su clase.

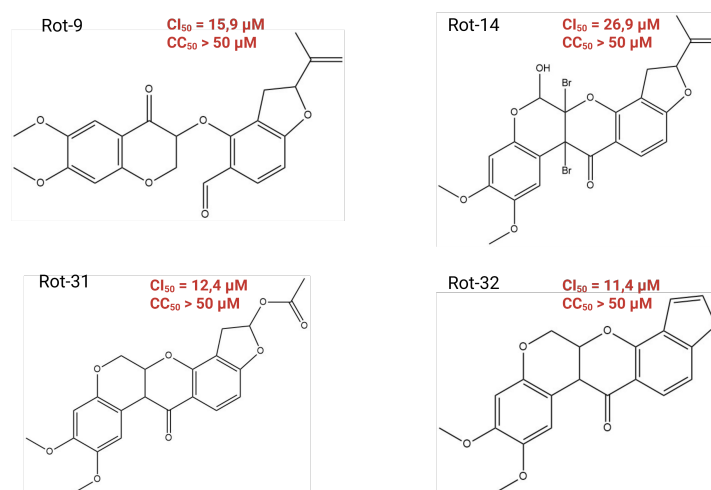


Figura 42. Estructuras y perfiles de actividad de los derivados rotenoides. Se detallan las estructuras bidimensionales de los cuatro *hits* pertenecientes a esta familia, acompañadas de sus respectivos valores de concentración inhibitoria media frente a la enzima MPro (CI_{50}) y de concentración citotóxica media en la línea celular A549 (CC_{50}).

4.6.1.2 Análisis de citotoxicidad de la familia de las pirazolopiridopirimidinas

La familia de las pirazolopiridopirimidinas reveló un perfil de seguridad altamente dependiente de las sustituciones periféricas sobre el núcleo central espiro-cíclico. Mientras que los 4 *hits* de la serie PRV-D (64, 66, 76, 77) demostraron una tolerabilidad excepcional sin evidenciar citotoxicidad a la concentración máxima evaluada ($CC_{50} > 100 \mu M$), el *hit* PRV B75 exhibió una citotoxicidad moderada limitante ($CC_{50} > \sim 36 \mu M$). Este comportamiento indica que el núcleo espiro-indolinona fusionado a la pirazolopirimidina no es intrínsecamente letal, sino que su promiscuidad biológica está dictada por la naturaleza de sus apéndices estructurales (**Figura 43**).

El compuesto citotóxico PRV B75 se caracteriza por poseer un grupo bencilo unido al átomo de nitrógeno del anillo de indolinona. La presencia de este anillo aromático adicional aumenta significativamente la rigidez global de la molécula y la densidad de electrones π expuestos. En el diseño de fármacos, el exceso de anillos aromáticos rígidos correlaciona fuertemente con un aumento en la toxicidad inespecífica¹⁷⁷, ya que promueve interacciones de apilamiento hidrofóbico (π - π *stacking*)¹⁷⁸ con dianas celulares no deseadas, como el ADN o el bolsillo de unión a ATP de diversas quinasas del huésped¹⁷⁷. Por el contrario, la totalidad de la serie PRV-D, clasificada como no citotóxica, suprime la presencia de este grupo N-bencilo. Esta simple eliminación del anillo aromático extra anula el potencial de generar interacciones inespecíficas, mejorando la biocompatibilidad del andamiaje.

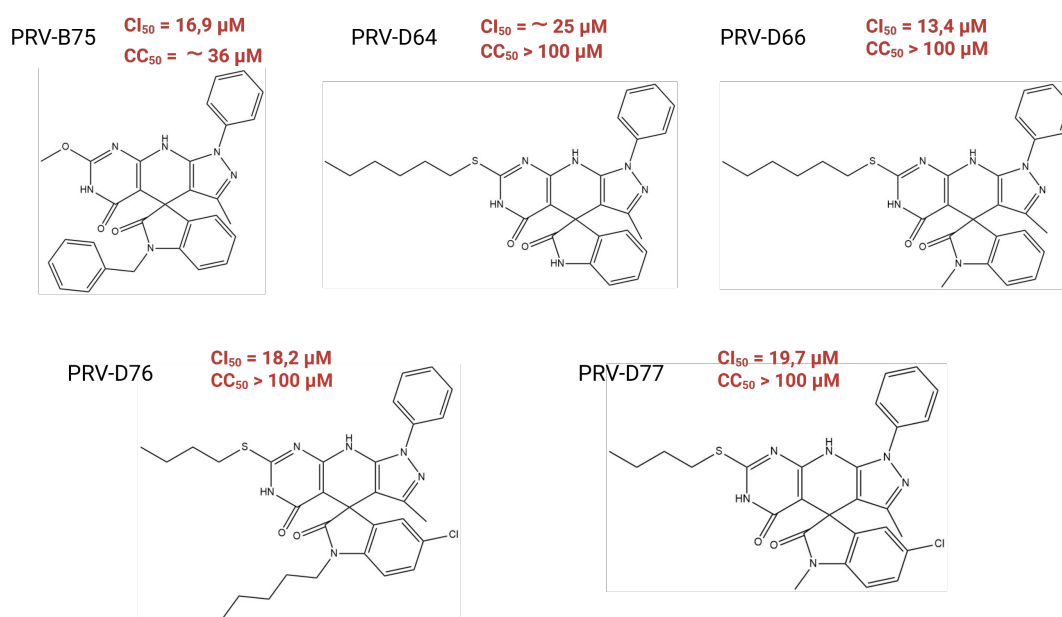


Figura 43. Estructuras y perfiles de actividad de los derivados de pirazolopiridopirimidinas. Se detallan las estructuras de los compuestos evaluados para esta serie, acompañadas de sus respectivos valores de concentración inhibitoria media frente a la MPro (CI_{50}) y de concentración citotóxica media en la línea celular A549 (CC_{50}).

4.6.1.3 *Análisis de citotoxicidad de la familia de los complejos de rutenio*

La evaluación biológica de los complejos organometálicos de rutenio reveló el perfil farmacológico más sobresaliente de todo el cribado primario. Esta familia logró combinar la máxima potencia inhibitoria frente a la MPro con márgenes de seguridad celular excepcionales. No obstante, este delicado balance resultó ser dependiente de la esfera de coordinación del metal, evidenciando un profundo efecto de los ligandos auxiliares sobre la selectividad biológica. Se observó que 3 de los 5 *hits* (RuTN, Rufenilo, RuCpTM) no presentaron citotoxicidad ($CC_{50} > 50 \mu M$), mientras que uno de los compuestos (RU9) fue citotóxico ($CC_{50} < 10 \mu M$) y el RuCpCTZ no pudo ser evaluado. El análisis de la relación estructura-actividad demuestra que los complejos RuTN y Ru Fenilo representan los diseños más exitosos. Ambos comparten una topología dinuclear soportada por ligandos areno y coordinada a derivados de tiosemicarbazonas, una combinación que resultó en una potente inhibición sin evidenciar citotoxicidad a las concentraciones evaluadas.

Desde una perspectiva fisicoquímica, el ligando areno *p*-cimeno actúa como un escudo hidrofóbico que estabiliza el centro metálico, modulando la lipofilia global del complejo para permear a través de membranas lipídicas sin afectar su integridad. Asimismo, la estructura dinuclear confiere una alta estabilidad en el medio acuoso, previniendo la disociación prematura de los ligandos minimizando interacciones inespecíficas (*off-target*) con biomoléculas del huésped. La modificación del entorno de coordinación hacia un sistema mononuclear alteró la potencia inhibitoria, sin comprometer su nula citotoxicidad. El derivado RuCpTM, el cual reemplaza el andamiaje dinuclear de *p*-cimeno por una geometría de tipo “asiento de piano” mononuclear, careció de citotoxicidad a 100 μM ($\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). A pesar de ello, su capacidad inhibitoria frente a la proteasa disminuyó respecto a la de los complejos dinucleares, un comportamiento análogo al observado para el *hit* RuCpCTZ.

En marcado contraste, la alteración radical de los ligandos en el compuesto Ru9 se asoció con una notoria citotoxicidad ($\text{CC}_{50} < 10 \mu\text{M}$). Este complejo heterobimetálico (Ru-Fe) coordinado con fosfinas y bipyridina (bipy) ilustra los riesgos toxicológicos asociados a ciertas esferas de coordinación. La citotoxicidad de este análogo puede deberse a dos fenómenos biológicos: por un lado, la presencia de múltiples centros redox activos (hierro y rutenio) que facilitarían la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante reacción de Fenton; por otro lado, el ligando bipyridina aporta al complejo una alta propensión a intercalarse en el ADN, lo que podría inducir apoptosis o arresto de la proliferación.

En conjunto, estos hallazgos validan al *scaffold* de rutenio dinuclear coordinado a *p*-cimeno y tiosemicarbazonas como una plataforma organometálica destacada. La selección racional de estos ligandos auxiliares logró suprimir la citotoxicidad inherente de los metales de transición, dirigiendo la reactividad del complejo hacia la proteasa viral.

4.6.1.4 Análisis de citotoxicidad de los compuestos singletons

Dentro del grupo de los compuestos clasificados como *singletons*, destaca el inhibidor J 355 por exhibir la potencia enzimática más alta registrada en el panel ($\text{CI}_{50} = 0,2 \mu\text{M}$). Sin embargo, su citotoxicidad no pudo ser estudiada por falta de disponibilidad de compuesto fresco. Por su parte, los compuestos P-2293486 y

V 001 cumplieron con el criterio de no ser citotóxicos a las concentraciones ensayadas ($CC_{50} > 100 \mu M$), aunque su actividad inhibitoria sobre la MPro es moderada ($CI_{50} = 25$ y $22,5 \mu M$ respectivamente)

4.6.1.5 *Análisis de citotoxicidad de la familia de las naftoquinonas*

El análisis biológico de las naftoquinonas corroboró fenotípicamente la hipótesis de toxicidad inherente a este farmacóforo^{179,180} (**Figura 44**). De los 12 *hits*, solo 2 de ellos (CEQ-6 y 11) mostraron una citotoxicidad aceptable ($CC_{50} > 50 \mu M$). Los compuestos CEQ-29 y CEQ-30 a pesar de presentar potencias inhibitorias considerables contra la MPro ($CI_{50} = 3,6$ y $3,1 \mu M$, respectivamente), exhibieron una marcada citotoxicidad sobre células de pulmón ($CC_{50} < 10 \mu M$). Esta letalidad basal está presumiblemente mediada por la inducción inespecífica de ciclos redox intracelulares¹⁷⁹. Al analizar las sustituciones se observó que los derivados que poseen un espaciador de tipo anilino (CEQ-17, -18, -20, -21 y CEQ-24) resultaron ser citotóxicos ($CC_{50} < 25 \mu M$). Desde una perspectiva electrónica, la presencia del protón del nitrógeno secundario (-NH-) permite la formación de enlaces de hidrógeno y facilita una fuerte conjugación electrónica por resonancia hacia el sistema carbonílico de la quinona. Este fenómeno estabiliza los intermediarios radicalarios (semiquinonas), favoreciendo el ciclado redox. Asimismo, la naturaleza del halógeno en la posición C-2 (cloro o bromo) demostró ser irrelevante para la mitigación de dicha citotoxicidad, lo cual se evidencia empíricamente al comparar pares de análogos directos (CEQ-20 clorado y CEQ-24 bromado), los cuales resultaron igualmente letales ($CC_{50} \leq 10 \mu M$).

En segundo lugar, el subgrupo con el anillo de piperazina unido directamente al núcleo quinona presentó una citotoxicidad que dependió estrictamente del sustituyente distal de la amina. Los análogos con sustituyentes alifáticos en el anillo terminal (CEQ-29 y CEQ-30, portadores de grupos ciclopentilo) o heteroaromáticos carentes de impedimento estérico (CEQ-8 y CEQ-12, con anillos de piridina) mantuvieron un marcado perfil citotóxico.

De manera excepcional, los derivados CEQ-6 y CEQ-11 carecieron de citotoxicidad a $50 \mu M$ ($CC_{50} > 50 \mu M$). El análisis estructural sugiere que una sutil modulación estérica y electrónica ubicada en el anillo aromático distal de la piperazina sería responsable de esto. El derivado CEQ-6 posee un grupo 2,4-

dimetilfenilo, en el cual los grupos metilo (particularmente el ubicado en posición *orto*) introducen un volumen estérico considerable. Por su parte, el CEQ-11 incorpora un anillo fluorofenilo; la combinación de la unión directa de la piperazina (que fuerza una torsión fuera del plano respecto a la quinona debido al choque estérico con el halógeno adyacente) junto con el impedimento estérico por estos voluminosos anillos distales podrían afectar negativamente el reconocimiento de la molécula por parte de las enzimas reductoras del huésped (ej. Deshidrogenasas, reductasas).

En conclusión, los resultados obtenidos de la serie CEQ demuestran que es factible domesticar un *scaffold* considerado como tóxico, tal como la naftoquinona. La incorporación de una amina terciaria acoplada a grupos aromáticos estéricamente impedidos podría suprimir la interacción con las enzimas generadoras de ROS, logrando disociar la letalidad celular inespecífica de la capacidad del compuesto para unirse covalentemente e inhibir de manera efectiva a la proteasa viral MPro.

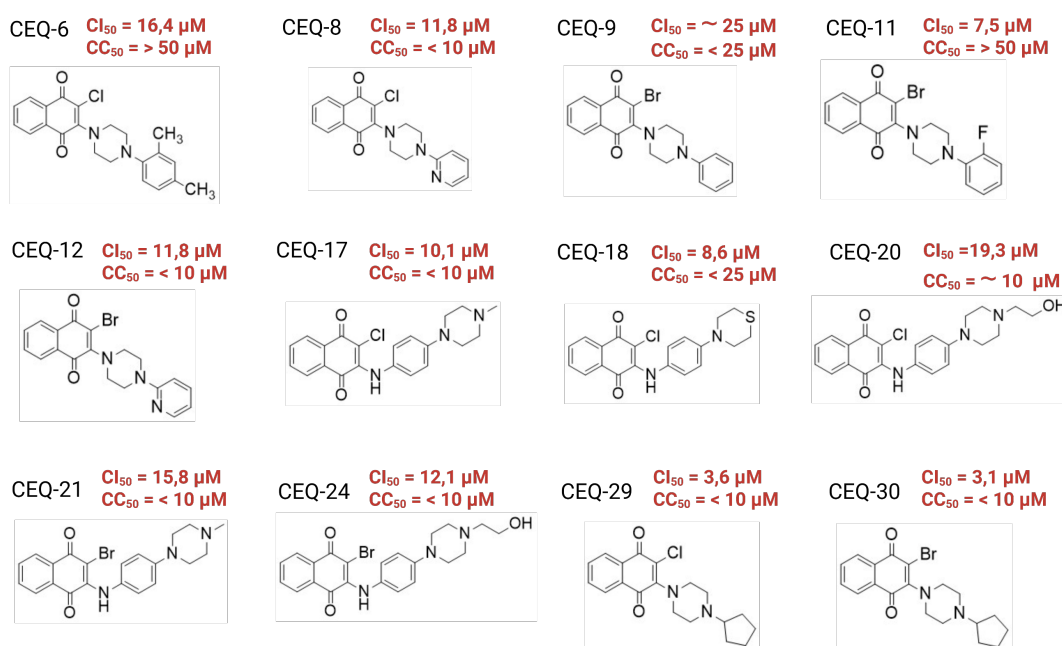


Figura 44. Estructuras químicas y perfiles de actividad de las naftoquinonas. Se detallan las estructuras de los compuestos evaluados, acompañadas de sus respectivos valores de concentración inhibitoria media frente a la MPro (CI_{50}) y de concentración citotóxica media en la línea celular A549 (CC_{50}).

4.6.2. Evaluación de la actividad antiviral y citotoxicidad sobre células Vero.

El ensayo de actividad antiviral fue realizado en colaboración con investigadores de la *Screening Discovery Platform* del Institut Pasteur Korea. Para este ensayo, se seleccionaron células Vero (de epitelio renal de mono verde africano), las cuales son permisivas a la infección por este virus debido a que expresan el receptor ACE2 en su membrana celular. Además, estas células son deficientes en INF tipo I y II, componentes esenciales para la respuesta antiviral celular, lo que las hace aún más susceptibles a la infección y replicación viral. Estas células se infectaron con la cepa Wuhan-Hu 1 de SARS-CoV-2.

La finalidad de este estudio era determinar si la inhibición enzimática observada *in vitro* frente a las proteasas de SARS-CoV-2 (MPro y PLPro) se traducía en una reducción efectiva de la replicación del virus en un contexto celular. Los compuestos a evaluar fueron seleccionados considerando la actividad de inhibición enzimática (CI_{50} en MPro $\leq 25 \mu M$). La actividad antiviral se cuantificó midiendo la reducción de la proteína de la nucleocápside (N) viral mediante inmunofluorescencia, calculando la concentración efectiva media (CE_{50}) y contrastándola simultáneamente con la citotoxicidad en la misma línea celular (CC_{50} en células Vero) para establecer el índice de Selectividad ($IS = CC_{50}/CE_{50}$).

Tabla 10. Actividad anti-SARS-CoV-2 y citotoxicidad de los *hits* de la MPro identificados en el cribado. Se detallan los valores de concentración citotóxica media en las líneas celulares A549 y Vero (CC₅₀), la concentración efectiva media frente al virus (CE₅₀) y el respectivo índice de selectividad (IS).

Compuesto	A549 CC ₅₀ (μ M)	Vero CC ₅₀ (μ M)	SARS-CoV-2 CE ₅₀ (μ M)	IS CC _{50-Vero} / CE ₅₀
Rot-9	>50	>50	NOI	ND
Rot-14	>50	>50	NOI	ND
Rot-31	>50	>50	NOI	ND
Rot-32	>50	ND	--	--
PRV-B75	~36	ND	--	--
PRV-D64	>100	ND	--	--
PRV-D66	>100	ND	--	--
PRV-D76	>100	ND	--	--
PRV-D77	>100	ND	--	--
Ru TN	>50	>50	41	>1,2
Ru fenilo	>50	N/D	--	--
RuCpTF	~100	17,7	8,8	2,0
RU9	<10	ND	--	--
RuCpCTZ	ND	ND	--	--

ND: No Determinado; NOI: No Inhibición

Nota: Los fármacos de referencia fueron evaluados de forma paralela: cloroquina CE₅₀ = 20,8 μ M y CC_{50 Vero} > 150 μ M, lopinavir CE₅₀ = 10,2 μ M y CC_{50 Vero} > 50 μ M, y remdesivir CE₅₀ = 10,2 μ M y CC_{50 Vero} > 50 μ M. Los datos de citotoxicidad se expresan como la media de los datos, ensayos realizados por duplicado (n = 2).

Cabe destacar que, debido a la disponibilidad limitante de sólido para el envío internacional, el compuesto rotenoide ROT-32 no pudo ser incluido en esta etapa de evaluación. Por el mismo motivo, el complejo RuCpTM fue sustituido por su análogo estructural RuCpTF, asumiendo un comportamiento biológico equivalente. Finalmente, la familia de las pirazolopiridopirimidinas se encuentra actualmente bajo evaluación por parte de los colaboradores del Institut Pasteur de Corea, y por lo tanto los resultados aún no están disponibles a la fecha.

4.6.2.1 Falta de actividad anti-SARS-CoV-2 de los derivados rotenoides

A pesar de haber demostrado un perfil de citotoxicidad excelente en células A549 y una inhibición moderada de la MPro, la familia de los rotenoides (Rot-9, Rot-14 y Rot-31) no exhibió capacidad para inhibir la replicación del SARS-CoV-2 en el modelo celular.

El análisis de las curvas de dosis-respuesta (**Figura 45**) revela que, a lo largo de todo el gradiente de concentraciones evaluado, la viabilidad celular se mantiene inalterada (cerca al 100% a 50 μ M, resultado equivalente al obtenido en células de pulmón humano A549), confirmando la nula citotoxicidad de los derivados y que con las modificaciones estructurales adecuadas es posible modular la actividad biológica de estos compuestos.

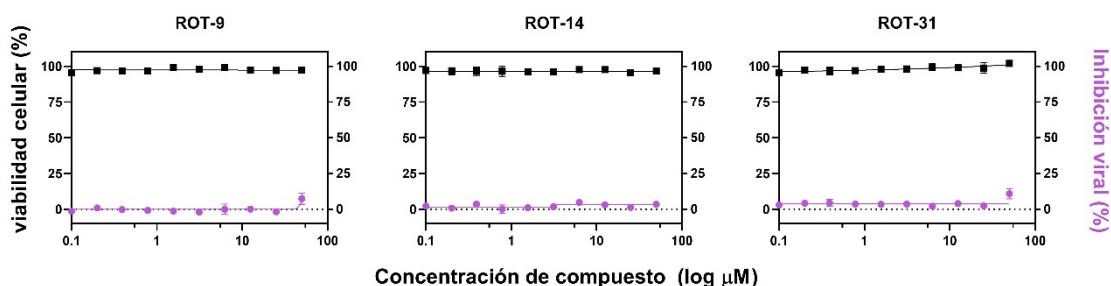


Figura 45. Actividad antiviral y citotoxicidad de los compuestos Rot-9, Rot-14 y Rot-31. Curvas de dosis-respuesta, el eje Y izquierdo representa la viabilidad celular (cuadrados negros), mientras que el eje Y derecho (círculos púrpuras) indica el porcentaje de inhibición de la replicación de SARS-CoV-2. El eje X muestra las concentraciones de compuesto evaluadas (nueve diluciones seriadas al medio, desde 50 μ M) en escala logarítmica. Los fármacos de referencia fueron evaluados de forma paralela: cloroquina $CE_{50} = 20,8 \mu$ M y $CC_{50 \text{ Vero}} > 150 \mu$ M, lopinavir $CE_{50} = 10,2 \mu$ M y $CC_{50 \text{ Vero}} > 50 \mu$ M, y remdesivir $CE_{50} = 10,2 \mu$ M y $CC_{50 \text{ Vero}} > 50 \mu$ M.

Esta marcada discrepancia entre la actividad contra la MPro y contra SARS-CoV-2 sugiere que el núcleo rotenoide presenta limitaciones a nivel de acción biológica. La falta de eficacia antiviral puede atribuirse a una baja permeabilidad a través de la membrana plasmática de las células Vero, a un secuestro significativo del compuesto por su alta afinidad a las proteínas del suero (FBS)

presentes en el medio de cultivo, o a una inactivación metabólica rápida antes de alcanzar la proteasa viral en el citosol.

4.6.2.2 Complejos organometálicos de rutenio

La evaluación del núcleo organometálico consolidó a la estructura de rutenio dinuclear como el *scaffold* con mayor viabilidad traslacional del cribado. El derivado RuTN resultó inocuo en las células Vero a las concentraciones testeadas ($CC_{50} > 50 \mu M$), comportamiento equivalente al antes observado sobre la línea celular A549, y exhibió una actividad antiviral cuantificable ($CE_{50} = 41 \mu M$), en el mismo orden de magnitud que los fármacos de referencia utilizados, generando una ventana terapéutica discernible (**Figura 46**).

Por otro lado, la evaluación del sistema mononuclear requirió una adaptación documentada en la sección 4.6.2. Debido a la falta de disponibilidad de sólido del *hit* original RuCpTM, para los ensayos de actividad antiviral, se procedió a evaluar su análogo estructural, el RuCpTF. Como se detalla en la **Figura 46**, la variación estructural entre ambos complejos radica exclusivamente en la funcionalización del nitrógeno terminal del ligando tiosemicarbazona.

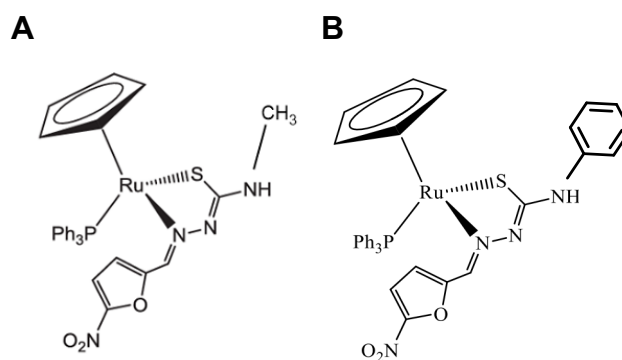


Figura 46. Comparación estructural de los complejos mononucleares de rutenio. Se ilustra la variación en el sustituyente del nitrógeno terminal del ligando semicarbazona. **(A)** El *hit* original RuCpTM presenta un grupo metilo alifático, mientras que **(B)** RuCpTF incorpora un anillo fenilo aromático.

Desde una perspectiva fisicoquímica, el reemplazo de un grupo metilo pequeño por un anillo fenilo voluminoso, incrementa marcadamente la lipofilia y densidad electrónica del derivado. En la química de compuestos de coordinación, este tipo de sustituciones en ligando tiosemicarbazonas suele

potenciar la permeabilidad a membranas celulares, pero conlleva un incremento documentado en la citotoxicidad inespecífica debido a interacciones hidrofóbicas inespecíficas¹⁸¹.

Esta modificación estructural explica el abrupto incremento de citotoxicidad observado experimentalmente para el análogo RuCpTF. Si bien este complejo exhibió una potente capacidad inhibitoria de la replicación viral ($CE_{50} = 8,8 \mu M$; **Figura 47**), la curva de viabilidad mostró una marcada citotoxicidad sobre células Vero a concentraciones $> 12,5 \mu M$ ($CC_{50} = 17,7 \mu M$). El reducido margen entre ambas variables ($IS = 2,0$) genera un cruce pronunciado de las curvas, sugiriendo que, a concentraciones relevantes para la eliminación viral, la citotoxicidad de este compuesto comprometiera su aplicación farmacológica.

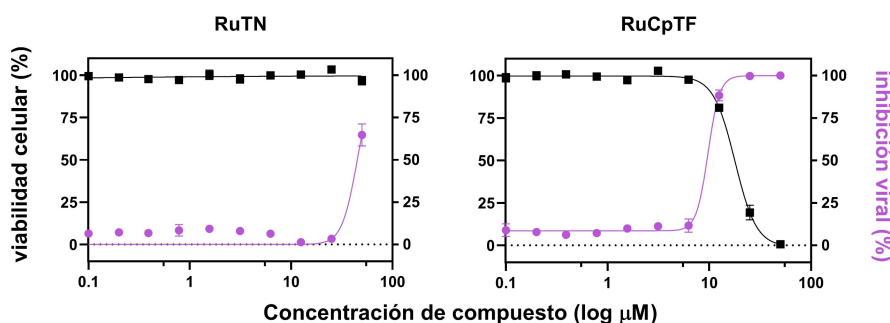


Figura 47. Actividad antiviral y citotoxicidad de los compuestos RuTN y RuCpTF.

Curvas de dosis-respuesta, el eje Y izquierdo representa la viabilidad celular (cuadrados negros), mientras que el eje Y derecho (círculos púrpuras) indica el porcentaje de inhibición viral frente al SARS-CoV-2. El eje X muestra la concentración de compuesto evaluada (nueve diluciones seriadas al medio desde $50 \mu M$) en escala logarítmica. Los fármacos de referencia fueron evaluados de forma paralela: cloroquina $CE_{50} = 20,8 \mu M$ y $CC_{50 \text{ Vero}} > 150 \mu M$, lopinavir $CE_{50} = 10,2 \mu M$ y $CC_{50 \text{ Vero}} > 50 \mu M$, y remdesivir $CE_{50} = 10,2 \mu M$ y $CC_{50 \text{ Vero}} > 50 \mu M$.

Por el contrario, el compuesto RuTN (**Figura 47**, izquierda) mantiene una viabilidad de 100% a la concentración efectiva evaluada, demostrando inhibición viral libre de citotoxicidad.

En conclusión, la comparación entre la alta viabilidad previa del andamiaje metilado y la toxicidad del análogo fenilado valida la susceptibilidad biológica de la esfera de coordinación. Por consiguiente, se prioriza el andamiaje dinuclear

RuTN como el scaffold más estable y selectivo para futuras etapas de optimización molecular.

4.6.2.3 Evaluación del potencial antiviral de la familia de las naftoquinonas

La evaluación de la serie de naftoquinonas arrojó resultados que subrayan la importancia metodológica de trazar curvas de dosis-respuesta acopladas para evitar falsos positivos en el descubrimiento de antivirales. La gran mayoría de los derivados de esta familia exhibieron valores de CE_{50} en el rango de 7 a 30 μM . Sin embargo, la cuantificación de estos parámetros biológicos (**Tabla 11**) revela que estos aparentes valores de inhibición viral se superponen a sus respectivas CC_{50} en células Vero. En consecuencia, la totalidad de la serie genera índices de selectividad cercanos a 1.

Tabla 11. Actividad anti-SARS-CoV-2 y citotoxicidad de los *hits* de la MPro correspondientes a los derivados de naftoquinonas. Se detallan los valores de concentración citotóxica media en las líneas celulares A549 y Vero (CC_{50}), la concentración efectiva media frente al virus (CE_{50}) y el respectivo índice de selectividad (IS).

Compuesto	A549 CC_{50} (μM)	Vero CC_{50} (μM)	SARS-CoV-2 CE_{50} (μM)	IS $CC_{50-Vero}/$ CE_{50}
CEQ-6	>50	>50	$35,8 \pm 0,4$	>1,4
CEQ-8	<10	29	$18,3 \pm 1,7$	1,6
CEQ-9	<25	40	$28,1 \pm 0,7$	1,4
CEQ-11	>50	33	$29,1 \pm 5,1$	1,1
CEQ-12	<10	27	$18,0 \pm 1,0$	1,5
CEQ-17	<10	7	$7,3 \pm 0,6$	0,9
CEQ-18	<25	40	29,8	1,3
CEQ-20	~10	8	$7,9 \pm 0,6$	0,9
CEQ-21	<10	9	$8,4 \pm 0,5$	1,1
CEQ-24	<10	9	$8,7 \pm 0,9$	1,1
CEQ-29	<10	19	$17,7 \pm 0,7$	1,0
CEQ-30	<10	26	$20,1 \pm 0,7$	1,3

Nota: Los fármacos de referencia fueron evaluados de forma paralela: cloroquina CE_{50} = 20,8 μM y $CC_{50 Vero}$ > 150 μM , lopinavir CE_{50} = 10,2 μM y $CC_{50 Vero}$ > 50 μM , y remdesivir

$CE_{50} = 10,2 \mu M$ y $CC_{50 \text{ Vero}} > 50 \mu M$. Los datos de citotoxicidad se expresan como la media de los datos, ensayos realizados por duplicado ($n = 2$).

Un análisis comparativo de los perfiles de citotoxicidad revela discrepancias notables en la tolerabilidad de los compuestos entre la línea celular de epitelio pulmonar (A549) y la línea renal de primate (Vero), es el caso del derivado CEQ-11. Mientras que en las células A549 este compuesto demostró un perfil de citotoxicidad aceptable ($CC_{50} > 50 \mu M$), en el modelo Vero indujo una pérdida total de viabilidad a $50 \mu M$ (**Figura 48**, $CC_{50} = 33 \mu M$). Esta variación fenotípica responde a las marcadas diferencias entre ambos modelos celulares, las cuales incluyen disparidades en la expresión de oxidorreductasas endógenas, variaciones en la capacidad de amortiguación antioxidante y diferentes niveles de expresión de transportadores de eflujo, dado por el origen de cada línea celular, (A549 es tumoral y Vero no es tumoral). Dado que el mecanismo de citotoxicidad primario de las naftoquinonas depende de un ciclado redox mediado por las enzimas del huésped, su efecto biológico depende en forma directa de la capacidad metabólica de la célula empleada¹⁵¹.

Como consecuencia de esta susceptibilidad exacerbada en las células Vero, la aparente actividad antiviral observada para el CEQ-11 ($CE_{50} = 29 \mu M$) resulta ser un artefacto consecuencia de su citotoxicidad ($IS = 1,1$). La inspección de los gráficos (**Figura 48**) confirma empíricamente este artefacto analítico, la curva de viabilidad celular colapsa exactamente en el mismo rango de concentraciones en las que la señal de inhibición viral aumenta. Esta correlación directa indica que la reducción de la carga viral observada no obedece a un bloqueo específico de la maquinaria del SARS-CoV-2, sino que es un evento secundario derivado de la muerte de la célula huésped inducida probablemente por estrés oxidativo o inhibición de enzimas celulares esenciales por parte del farmacóforo quinónico.

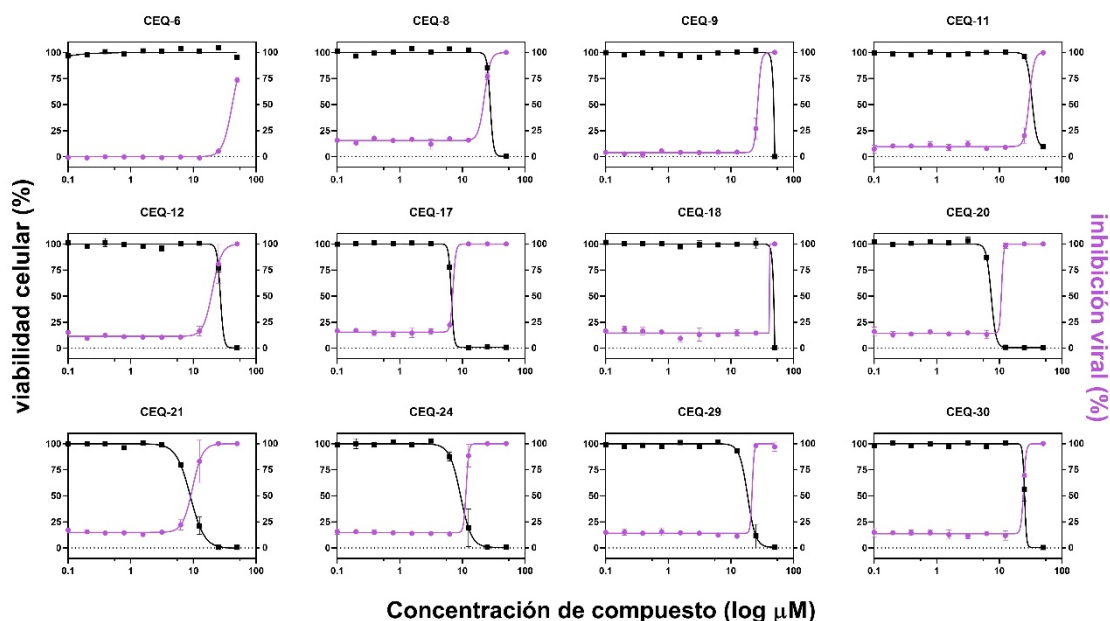


Figura 48. Actividad antiviral y citotoxicidad de los compuestos de la serie naftoquinona. Curvas de dosis-respuesta, el eje Y izquierdo representa la viabilidad celular (cuadrados negros), mientras que el eje Y derecho (círculos púrpuras) indica el porcentaje de inhibición viral frente al SARS-CoV-2. El eje X muestra la concentración de compuesto evaluada (nueve diluciones seriadas al medio desde 50 μM) en escala logarítmica. Los fármacos de referencia fueron evaluados de forma paralela: cloroquina $\text{CE}_{50} = 20,8 \mu\text{M}$, lopinavir $\text{CE}_{50} = 10,2 \mu\text{M}$, y remdesivir $\text{CE}_{50} = 10,2 \mu\text{M}$.

Excepcionalmente, el panel superior izquierdo muestra al compuesto CEQ-6, el cual exhibe una separación definida entre las curvas de citotoxicidad ($\text{CC}_{50} > 50 \mu\text{M}$) y actividad antiviral ($\text{CE}_{50} = 36 \mu\text{M}$) confirmando su efecto directo sobre la replicación de SARS-CoV-2.

Aislándose de la citotoxicidad basal de su familia, el derivado CEQ-6 ($\text{IS} > 1,4$) se consolidó como el único inhibidor antiviral validado de la serie. Una particularidad de este compuesto es la presencia de un sustituyente 2,4-dimetilfenilo que además de contribuir a la interacción efectiva con la MPro también podría hacerlo con otras dianas moleculares que afecten la replicación viral.

Al contrastar al compuesto CEQ-6 frente a los antivirales empleados como fármacos control (cloroquina $\text{CE}_{50} = 20,8 \mu\text{M}$, lopinavir $\text{CE}_{50} = 10,2 \mu\text{M}$, y remdesivir $\text{CE}_{50} = 10,2 \mu\text{M}$), se concluye que CEQ-6 posee una eficacia que se aproxima en orden de magnitud a los fármacos de referencia. No obstante, esta

molécula debería someterse a optimización estructural (*hit-to-lead*) para mejorar su índice de selectividad y principalmente su potencia antiviral. Esta molécula superó casi en su totalidad los filtros empíricos propuestos en el proyecto, estableciéndose como molécula prototipo para el desarrollo de nuevos análogos basados en su estructura.

5 CONCLUSIONES

El trabajo de esta tesis estuvo motivado por la necesidad de confirmar el poder predictivo de algoritmos computacionales implementados en una campaña previa de descubrimiento de inhibidores de MPro con actividad anti-SARS-CoV-2, así como por ampliar el hallazgo de nuevos andamiajes químicos con similares actividades y profundizar la caracterización molecular y estructural de los complejos proteasa-inhibidor.

A continuación, se resumen los principales aportes y conclusiones obtenidos en este trabajo de maestría.

- Se tamizó contra MPro un total de 433 compuestos correspondientes a 17 familias lo cual permitió identificar 29 nuevos *hits* (actividad inhibitoria superior al 50% a 25 μ M). Estos compuestos pertenecen a 5 familias: pirazolopirimidinas, complejos organometálicos de rutenio, dehidropirano, rotenoides y naftoquinonas, e incluyen un par de *singletons*.
- Tanto la serie de pirazolopirimidinas como las dehidropirano habían sido sometidas previamente a cribado *in silico*, pero no habían calificado como candidatos a inhibidores por los algoritmos predictivos. De acuerdo con los datos obtenidos en nuestro estudio esto se debería a la moderada potencia inhibitoria contra MPro de las pirazolopirimidinas o al comportamiento *outlier* del único hit de las dehidropirano.
- La tasa de éxito del cribado contra MPro fue del 7% para el total de moléculas evaluadas (433) y del 2% excluyendo aquellas que no habían sido cribadas virtualmente (rotenoides, complejos organometálicos y naftoquinonas). De este análisis se desprende que la tasa de falsos negativos de los algoritmos predictores de *hits* de la MPro empleados en la campaña anterior es baja (2%). Por otra parte, la tasa de *hits* obtenida en el cribado no sesgado es marcadamente inferior a la obtenida en la campaña de tamizaje guiada por inteligencia artificial, 29%⁶¹. Este conjunto de resultados confirmó el poder de la herramienta computacional, diseñada y validada adecuadamente, para facilitar y acelerar el descubrimiento de inhibidores de la MPro.

- Dentro de los nuevos *hits* identificados, se destacó por su potencia y selectividad la α -iodo-dehidro- γ -pirona (J 355): $Cl_{50} = 0,2 \mu M$ para la MPro y una despreciable actividad inhibitoria contra la PLPro (2% de inhibición a $25 \mu M$). La familia de complejos organometálicos aportó un gran número de inhibidores de la MPro (5 de 11 evaluados), destacándose aquellos donde el ligando era una tiosemicarbazona unida a un nitrofurano (RuTN; $Cl_{50} = 0,99 \mu M$) o fenilo (Ru Fenilo; $Cl_{50} = 1,2 \mu M$). Todos estos compuestos mostraron una potencia al menos 2,5 veces superior contra la MPro que *versus* la PLPro. La familia de las pirazolopiridopirimidinas aportó un número importante de *hits* (5) selectivos contra la MPro, pero con moderada potencia inhibitoria ($Cl_{50} = 13-20 \mu M$). También los rotenoides (4 *hits*) presentaron una potencia moderada sobre la MPro ($Cl_{50} = 11-27 \mu M$), aunque, a diferencia de los anteriores, uno de ellos se destacó por su preferencia por inhibir con mayor selectividad a la PLPro (Rot-9 $Cl_{50} = 6 \mu M$). La serie de naftoquinonas aportó el mayor número de *hits* de MPro (12 de 30) con rango de Cl_{50} entre $3-25 \mu M$. La mitad de estos *hits* también inhibió a la PLPro, aunque la mayoría lo hizo con una potencia 20-90% inferior. Finalmente, también se identificó un par de *singletons* con baja potencia inhibitoria sobre MPro ($Cl_{50} 22-25 \mu M$), uno de ellos también logró inhibir a la PLPro con el mismo orden de potencia.
- Al menos dos rotenoides (Rot-14 y Rot-32) mostraron una potencia similar contra ambas enzimas. Los complejos organometálicos Ru-TN, Ru-fenilo y Ru9, y las seis quinonas mencionadas anteriormente (CEQ-17, -20, -21, -24, -29 y -30), también califican dentro del grupo de inhibidores pan-proteasa aunque con cierta selectividad sobre la MPro. La actividad proteasa-selectiva de alguno de estos compuestos sugiere interacciones específicas entre el inhibidor y su sitio de unión a la enzima. Si bien inhibidores con actividad pan-inhibitoria de estas proteasas podrían resultar ventajosos para sortear posibles mecanismos de resistencia, es importante tener en cuenta que este tipo de compuestos podría compartir blancos moleculares de la célula huésped.
- La mayoría de los 29 *hits* de la MPro no resultaron citotóxicos contra células de adenocarcinoma de pulmón humano (modelo clínicamente relevante para SARS-CoV-2) o de riñón de primate al ser ensayados a

concentraciones $\geq 50 \mu\text{M}$. Las excepciones fueron el compuesto PRV-B75 ($\text{CC}_{50} = 36 \mu\text{M}$) perteneciente a la familia de las pirazolopiridopirimidinas, el compuesto Ru9 ($\text{CC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) perteneciente a los complejos organometálicos y las 12 naftoquinonas ($\text{CC}_{50} < 10\text{-}50 \mu\text{M}$; nota: CEQ-10 y CEQ-11 no mostraron citotoxicidad a $50 \mu\text{M}$ sobre células pulmonares, pero si sobre las renales infectadas por virus). Estos resultados resaltan la necesidad de optimizar las propiedades biológicas de las naftoquinonas con el fin de reducir su actividad citotóxica sobre las células de mamíferos.

- A pesar de ciertas limitaciones en cuanto a la disponibilidad de sólido de algunos compuestos *hits* de la MPro (dehidropiranona, pirazolopiridopirimidinas y *singletons*), la mayoría de ellos (17 compuestos) fueron estudiados por su actividad antiviral en un modelo de infección celular. De ellos, solo RuTN ($\text{CE}_{50} = 41 \mu\text{M}$, IS = 1,2) y CEQ-6 ($\text{CE}_{50} = 36 \mu\text{M}$, IS = 1,4), mostraron inhibir la replicación viral sin afectar la viabilidad de la célula huésped. La potencia antiviral de ambos compuestos fue inferior a la de los fármacos de referencia empleados en el ensayo, pero estuvo dentro del mismo orden de magnitud (lopinavir, remdesivir y cloroquina: $\text{CE}_{50} = 10\text{-}21 \mu\text{M}$).
- El análisis del modo de inhibición de MPro por CEQ-6 sugiere que este compuesto inhibe de manera covalente y reversible a la enzima y que el blanco molecular de su acción inhibitoria sería un residuo de cisteína. El análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS) no logró identificar la formación de un aducto covalente entre este compuesto y la proteasa, ni tampoco la formación de formas sobre-oxidadas de residuos de cisteína (ácido sulfínico o sulfónico) o metioninas (sulfóxidos). Esta incapacidad para detectar el sitio de unión covalente del inhibidor a la proteasa lo atribuimos a la labilidad del enlace formado y a las condiciones de preparación y análisis de la muestra (ej. alta energía de ionización) que disociarían al compuesto del complejo.
- Otro de los compuestos estudiados a nivel mecanístico fue un derivado del Ebsulfur (AM79), el cual se destaca por su alta potencia inhibitoria sobre la MPro ($\text{CI}_{50} = 0,034 \mu\text{M}$). Este compuesto también resultó inhibir de manera covalente a la MPro, aunque con un importante grado de irreversibilidad. El análisis por LC-MS/MS mostró la unión del compuesto

a los residuos Cys85, Cys256 y Cys300, los cuales no forman parte del sitio activo de la proteasa y se encuentran en cavidades con escasa exposición al solvente. Por otro lado, la modificación de la Cys300, residuo ubicado en la interfaz de dimerización de la MPro, ha sido reportada previamente para el EbSe, postulándose como un posible mecanismo de inhibición alostérica. Los resultados obtenidos en esta tesis evidencian un comportamiento similar para los análogos del EbS, y revelan otros potenciales sitios de unión de inhibidores covalentes.

- Los estudios de cristalogénesis realizados con inhibidores identificados en estudios previos y con CI_{50} en el orden nM (ej. chalconas, benzofuroxanos, selenoglicósidos, benzisotiazolonas y tiazoles) revelaron la dificultad de la co-cristalización de los complejos MPro-inhibidor. Si bien se obtuvieron microcristales para muestras conteniendo a dos compuestos de las familias de las chalconas y los tiazoles, el análisis de difracción de los mismos mostró la ausencia de densidades electrónicas compatibles con la presencia de estos compuestos.
- En conjunto, los hallazgos de esta tesis validan la efectividad de combinar estrategias *in silico*, *in vitro* e *in cellulo* para el descubrimiento de ligandos de las proteasas del SARS-CoV-2. Además, este trabajo aporta insumos valiosos sobre la relación estructura-actividad de diversas familias químicas, que podrían guiar el diseño optimizado de nuevos agentes antivirales.

6 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente investigación establecen una base sólida para el descubrimiento y optimización de nuevos agentes antivirales dirigidos contra el SARS-CoV-2. Para capitalizar los hallazgos se proponen las siguientes líneas de investigación a futuro:

- **Retroalimentación y optimización de herramientas *in silico***

Es imperativo culminar el análisis retrospectivo contrastando la base de datos empírica generada (403 compuestos evaluados *in vitro*) frente a los modelos de acoplamiento molecular y cribado virtual previamente utilizados. La identificación experimental de moléculas activas que no fueron priorizadas computacionalmente; como los complejos organometálicos de rutenio y andamiajes de alta rigidez, expone las limitaciones de los campos de fuerza actuales para parametrizar metales de transición y predecir ajustes inducidos. Los resultados cuantitativos de inhibición obtenidos en este trabajo deben emplearse como un conjunto de datos de entrenamiento (*training set*) para calibrar las funciones de puntuación de los algoritmos. Esta sinergia permitirá desarrollar plataformas híbridas más robustas y precisas para la exploración de bibliotecas químicas masivas.

- **Evolución estructural (*Hit-to-lead*) de andamiajes clave**

El cribado empírico y la evaluación dirigida permitieron identificar andamiajes prometedores, destacando los complejos organometálicos de rutenio (RuTN) y los derivados de naftoquinonas (CEQ-6). Si bien estos compuestos demostraron una eficacia antiviral validada y comparable con los fármacos de referencia, así como, una disociación exitosa de la citotoxicidad basal de sus familias, su potencia inhibitoria actual se sitúa en el rango micromolar (CI_{50} entre 1 y 16 μM). Dado que los antivirales de uso clínico operan típicamente en el rango nanomolar, estos hits constituyen el punto de partida ideal para campañas de optimización estructural (*Hit-to-lead*).

Para las naftoquinonas se proyecta la síntesis de nuevos análogos que exploren variaciones estéricas en las posiciones R_1 y R_2 para anular definitivamente cualquier capacidad residual de ciclado redox intracelular, maximizando simultáneamente las interacciones no covalentes (puentes de

hidrógeno y apilamiento π) con los subsitios S1 y S2 de la MPro, previos a la formación del enlace covalente reversible.

Por otro lado, para los complejos organometálicos se sugiere explorar la modificación sistemática de los ligandos auxiliares de la esfera de coordinación para incrementar la afinidad inicial por el sitio activo, manteniendo la estabilidad térmica y la selectividad pan-proteasa que demostró el núcleo dinuclear.

- **Elucidación estructural del complejo enzima-ligando mediante *soaking***

La resolución de los mecanismos de unión a nivel atómico es el pilar fundamental para guiar el diseño racional de fármacos. Dado que los ensayos de co-cristalización preformada enfrentaron barreras termodinámicas severas; resultando en la exclusión del ligando y la resolución de la enzima en estado *apo*, el abordaje cristalográfico futuro debe pivotar hacia la técnica de inmersión de cristales nativos (*soaking*).

Para garantizar la viabilidad y eficiencia de este procedimiento, se propone implementar la siguiente estrategia metodológica: la co-cristalización empleando una variante inmadura de la MPro como semilla (*seeding*) para promover el crecimiento cristalino de la enzima madura. Esta aproximación induce un arreglo espacial diferencial en la red cristalina, generando un empaquetamiento alternativo que expone significativamente más el sitio activo al canal de solvente en comparación con las condiciones de cristalización estándar de la MPro. Esta configuración cristalográfica de alta accesibilidad resulta crítica para facilitar la difusión fluida de los compuestos hacia el interior del cristal. De este modo, se eludirán los problemas de nucleación inducidos por la heterogeneidad conformacional, forzando la ocupación de la diada catalítica o de los sitios alostéricos y permitiendo dilucidar experimentalmente las coordenadas tridimensionales de las interacciones previamente sugeridas por espectrometría de masas y los ensayos bioquímicos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. A Centenary Tale of Two Pandemics: The 1918 Influenza Pandemic and COVID-19, Part II. *Am J Public Health*. 2021;111(7):1267-1272. doi:10.2105/AJPH.2021.306326
2. Chung YS, Lam CY, Tan PH, Tsang HF, Wong SCC. Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. *Int J Mol Sci*. 2024;25(15):8155. doi:10.3390/ijms25158155
3. Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004;10(4):368-373. doi:10.1038/nm1024
4. Hamre D, Procknow JJ. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Exp Biol Med*. 1966;121(1):190-193. doi:10.3181/00379727-121-30734
5. Woo PCY, Lau SKP, Chu C ming, et al. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol*. 2005;79(2):884-895. doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005
6. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In: *Advances in Virus Research*. Vol 100. Elsevier; 2018:163-188. doi:10.1016/bs.aivir.2018.01.001
7. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
8. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2020;91(1):157-160. doi:10.23750/abm.v91i1.9397
9. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
10. COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard. datadot. Accessed June 14, 2026. <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>
11. Vishwakarma B, Kulaye H, Tiwari S, Alam S, Pandey S, Joshi S. SARS-CoV-2: A Comprehensive Review of its Biology, Immunity, and Therapeutic Solutions. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2025;14(11):101-134. doi:10.20546/ijcmas.2025.1411.012
12. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8
13. Li X, Mi Z, Liu Z, Rong P. SARS-CoV-2: pathogenesis, therapeutics, variants, and vaccines. *Front Microbiol*. 2024;15:1334152. doi:10.3389/fmicb.2024.1334152
14. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;54:62-75. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.06.001
15. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci*. 2022;65(2):280-294. doi:10.1007/s11427-021-1964-4

16. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-1115. doi:10.1016/j.it.2020.10.004
17. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* 2020;181(4):914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011
18. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
20. Hardenbrook NJ, Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Curr Opin Virol.* 2022;52:123-134. doi:10.1016/j.coviro.2021.11.011
21. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3-20. doi:10.1038/s41580-021-00418-x
22. Coutard B, Valle C, De Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020;176:104742. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104742
23. Ou X, Liu Y, Lei X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020;11(1):1620. doi:10.1038/s41467-020-15562-9
24. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
25. Shin D, Mukherjee R, Grewe D, et al. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature.* 2020;587(7835):657-662. doi:10.1038/s41586-020-2601-5
26. Jin Z, Du X, Xu Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020;582(7811):289-293. doi:10.1038/s41586-020-2223-y
27. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39. doi:10.1038/s41580-021-00432-z
28. Klein S, Cortese M, Winter SL, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun.* 2020;11(1):5885. doi:10.1038/s41467-020-19619-7
29. Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):94. doi:10.1038/s41392-022-00950-y

30. Szabó GT, Mahiny AJ, Vlatkovic I. COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments. *Mol Ther.* 2022;30(5):1850-1868. doi:10.1016/j.ymthe.2022.02.016
31. Chavda V, Bezbaruah R, Valu D, et al. Adenoviral Vector-Based Vaccine Platform for COVID-19: Current Status. *Vaccines.* 2023;11(2):432. doi:10.3390/vaccines11020432
32. Viana R, Moyo S, Amoako DG, et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature.* 2022;603(7902):679-686. doi:10.1038/s41586-022-04411-y
33. Dhawan M, Priyanka, Choudhary OP. Emergence of Omicron sub-variant BA.2: Is it a matter of concern amid the COVID-19 pandemic? *Int J Surg.* 2022;99:106581. doi:10.1016/j.ijsu.2022.106581
34. Malune P, Iaconis D, Manelfi C, et al. Dual-Site Inhibition of SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase by Small Molecules Able to Block Viral Replication Identified through a Computer-Aided Drug Discovery Approach. *ACS Infect Dis.* 2025;11(10):2821-2835. doi:10.1021/acsinfectdis.5c00517
35. Kabinger F, Doze V, Schmitzová J, Lidschreiber M, Dienemann C, Cramer P. Structural basis of SARS-CoV-2 polymerase inhibition by nonnucleoside inhibitor HeE1-2Tyr. *Proc Natl Acad Sci.* 2025;122(10):e2419854122. doi:10.1073/pnas.2419854122
36. Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, et al. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent Sci.* 2020;6(5):672-683. doi:10.1021/acscentsci.0c00489
37. Masyeni S, Iqhrammullah M, Frediansyah A, et al. Molnupiravir: A lethal mutagenic drug against rapidly mutating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2—A narrative review. *J Med Virol.* 2022;94(7):3006-3016. doi:10.1002/jmv.27730
38. Kabinger F, Stiller C, Schmitzová J, et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2021;28(9):740-746. doi:10.1038/s41594-021-00651-0
39. Mótýán JA, Mahdi M, Hoffka G, Tózsér J. Potential Resistance of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) against Protease Inhibitors: Lessons Learned from HIV-1 Protease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3507. doi:10.3390/ijms23073507
40. Krismer L, Schöppe H, Rauch S, et al. Study of key residues in MERS-CoV and SARS-CoV-2 main proteases for resistance against clinically applied inhibitors nirmatrelvir and ensitrelvir. *Npj Viruses.* 2024;2(1):23. doi:10.1038/s44298-024-00028-2
41. Esler MA, Shi K, Rollie JA, et al. Structural basis for varying drug resistance of SARS-CoV-2 M^{pro} E166 variants. Palese P, ed. *mBio.* 2025;16(7):e02624-24. doi:10.1128/mbio.02624-24
42. Zhu Y, Yurgelonis I, Noell S, et al. In vitro selection and analysis of SARS-CoV-2 nirmatrelvir resistance mutations contributing to clinical virus resistance surveillance. *Sci Adv.* 2024;10(30):eadl4013. doi:10.1126/sciadv.adl4013

43. Zhou Y, Gammeltuft KA, Ryberg LA, et al. Nirmatrelvir-resistant SARS-CoV-2 variants with high fitness in an infectious cell culture system. *Sci Adv.* 2022;8(51):eadd7197. doi:10.1126/sciadv.add7197
44. Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science.* 2020;368(6489):409-412. doi:10.1126/science.abb3405
45. Rut W, Lv Z, Zmudzinski M, et al. Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design. *Sci Adv.* 2020;6(42):eabd4596. doi:10.1126/sciadv.abd4596
46. Van Huizen M, Bloeme - Ter Horst JR, De Gruyter HLM, et al. Deubiquitinating activity of SARS-CoV-2 papain-like protease does not influence virus replication or innate immune responses in vivo. Frieman MB, ed. *PLOS Pathog.* 2024;20(3):e1012100. doi:10.1371/journal.ppat.1012100
47. Klemm T, Ebert G, Calleja DJ, et al. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO J.* 2020;39(18):e106275. doi:10.15252/embj.2020106275
48. Li JY, Liao CH, Wang Q, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Res.* 2020;286:198074. doi:10.1016/j.virusres.2020.198074
49. Citarella A, Scala A, Piperno A, Micale N. SARS-CoV-2 Mpro: A Potential Target for Peptidomimetics and Small-Molecule Inhibitors. *Biomolecules.* 2021;11(4):607. doi:10.3390/biom11040607
50. Lee J, Kenward C, Worrall LJ, et al. X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation. *Nat Commun.* 2022;13(1):5196. doi:10.1038/s41467-022-32854-4
51. Osipiuk J, Azizi SA, Dvorkin S, et al. Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. *Nat Commun.* 2021;12(1):743. doi:10.1038/s41467-021-21060-3
52. Varghese A, Liu J, Liu B, et al. Analysis of Structures of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Bound with Ligands Unveils Structural Features for Inhibiting the Enzyme. *Molecules.* 2025;30(3):491. doi:10.3390/molecules30030491
53. Ullrich S, Nitsche C. SARS-CoV-2 Papain-Like Protease: Structure, Function and Inhibition. *ChemBioChem.* 2022;23(19):e202200327. doi:10.1002/cbic.202200327
54. Jiang H, Yang P, Zhang J. Potential Inhibitors Targeting Papain-Like Protease of SARS-CoV-2: Two Birds With One Stone. *Front Chem.* 2022;10:822785. doi:10.3389/fchem.2022.822785
55. Gervasoni S, Manelfi C, Adobati S, et al. Target Prediction by Multiple Virtual Screenings: Analyzing the SARS-CoV-2 Phenotypic Screening by the Docking Simulations Submitted to the MEDiate Initiative. *Int J Mol Sci.* 2023;25(1):450. doi:10.3390/ijms25010450

56. Calado CRC. Bridging the gap between target-based and phenotypic-based drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2024;19(7):789-798. doi:10.1080/17460441.2024.2355330
57. Hughes J, Rees S, Kalindjian S, Philpott K. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1239-1249. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
58. Ihssen J, Faccio G, Yao C, Sirec T, Spitz U. Fluorogenic in vitro activity assay for the main protease Mpro from SARS-CoV-2 and its adaptation to the identification of inhibitors. *STAR Protoc.* 2021;2(3):100793. doi:10.1016/j.xpro.2021.100793
59. Ye J, Xu T, Xu C, Liu X, Chen Y. Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay at the Crossroad: Urgent Reexamination of Assay Design for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Main Protease Inhibitors. *J Med Virol.* 2026;98(1):e70801. doi:10.1002/jmv.70801
60. Prada Gori DN, Ruatta S, Fló M, et al. Drug repurposing screening validated by experimental assays identifies two clinical drugs targeting SARS-CoV-2 main protease. *Front Drug Discov.* 2023;2:1082065. doi:10.3389/fddsv.2022.1082065
61. Ruatta SM, Prada Gori DN, Fló Díaz M, et al. Garbage in, garbage out: how reliable training data improved a virtual screening approach against SARS-CoV-2 MPro. *Front Pharmacol.* 2023;14:1193282. doi:10.3389/fphar.2023.1193282
62. Yan H, Liu Z, Yan G, et al. A robust high-throughput fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors. *Virology.* 2022;574:18-24. doi:10.1016/j.virol.2022.07.006
63. Cannalire R, Cerchia C, Beccari AR, Di Leva FS, Summa V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J Med Chem.* 2022;65(4):2716-2746. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01140
64. Markossian S, Grossman A, Baskir H, et al., eds. *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Accessed June 23, 2026. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>
65. Macarron R, Banks MN, Bojanic D, et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(3):188-195. doi:10.1038/nrd3368
66. Jang WD, Jeon S, Kim S, Lee SY. Drugs repurposed for COVID-19 by virtual screening of 6,218 drugs and cell-based assay. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(30):e2024302118. doi:10.1073/pnas.2024302118
67. Sabe VT, Ntombela T, Jhamba LA, et al. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *Eur J Med Chem.* 2021;224:113705. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113705
68. Zhang L chuan, Zhao H lin, Liu J, He L, Yu R lei, Kang C min. Design of SARS-CoV-2 Mpro, PLpro Dual-Target Inhibitors Based on Deep Reinforcement Learning and Virtual Screening. *Future Med Chem.* 2022;14(6):393-405. doi:10.4155/fmc-2021-0269
69. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

- development settings 1P11 of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26. doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0
70. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, et al. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*. 2021;374(6575):1586-1593. doi:10.1126/science.abl4784
 71. La Monica G, Bono A, Lauria A, Martorana A. Targeting SARS-CoV-2 Main Protease for Treatment of COVID-19: Covalent Inhibitors Structure–Activity Relationship Insights and Evolution Perspectives. *J Med Chem*. 2022;65(19):12500-12534. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01005
 72. Dai R, Gao H, Su R. Computer-aided drug design for virtual-screening and active-predicting of main protease (M^{pro}) inhibitors against SARS-CoV-2. *Front Pharmacol*. 2023;14:1288363. doi:10.3389/fphar.2023.1288363
 73. Li J, Fu A, Zhang L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2019;11(2):320-328. doi:10.1007/s12539-019-00327-w
 74. Hayden FG, Shinkai M, Clark TW, et al. Ensitrelvir for Covid-19 Postexposure Prophylaxis in Household Contacts. *N Engl J Med*. 2026;394(19):1905-1915. doi:10.1056/NEJMoa2509306
 75. Zhao L, Li C, Wang M, et al. Potent antiviral activity of simnotrelvir against key epidemic SARS-CoV-2 variants with a high resistance barrier. Martinez MA, ed. *Antimicrob Agents Chemother*. 2025;69(4):e01556-24. doi:10.1128/aac.01556-24
 76. Zhan Y, Lin Z, Liang J, et al. Leritrelvir for the treatment of mild or moderate COVID-19 without co-administered ritonavir: a multicentre randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *eClinicalMedicine*. 2024;67:102359. doi:10.1016/j.eclinm.2023.102359
 77. Yurgelonis I, Rai DK, Li Z, et al. Analysis of ibuzatrelvir's activity against SARS-CoV-2 circulating variants and in vitro resistance mutations. *Antiviral Res*. 2026;248:106352. doi:10.1016/j.antiviral.2026.106352
 78. Alli VJ, Singh SK, Darna M, et al. Development of acylhydrazone linked thiazoles as non-covalent dual inhibitors of SARS-CoV-2 proteases. *Eur J Med Chem*. 2025;290:117509. doi:10.1016/j.ejmech.2025.117509
 79. Bellera CL, Llanos M, Gantner ME, et al. Can drug repurposing strategies be the solution to the COVID-19 crisis? *Expert Opin Drug Discov*. 2021;16(6):605-612. doi:10.1080/17460441.2021.1863943
 80. Oprea TI, Overington JP. Computational and Practical Aspects of Drug Repositioning. *ASSAY Drug Dev Technol*. 2015;13(6):299-306. doi:10.1089/adt.2015.29011.tiodrrr
 81. Dávila B, Fló M, Ruatta S, et al. Unveiling novel pharmacophores and hit compounds for the development of anti-virals to treat severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Bioorganic Chem*. 2025;163:108724. doi:10.1016/j.bioorg.2025.108724

82. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*. 2004;432(7019):862-865. doi:10.1038/nature03197
83. Ogbadoyi EO, Umar N. The challenges and opportunities for the development of COVID-19 therapeutics and preparing for the next pandemic. *Front Drug Discov*. 2022;2:925825. doi:10.3389/fddsv.2022.925825
84. Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1972;69(8):2110-2114. doi:10.1073/pnas.69.8.2110
85. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *SLAS Discov*. 1999;4(2):67-73. doi:10.1177/108705719900400206
86. Jeon S, Ko M, Lee J, et al. Identification of Antiviral Drug Candidates against SARS-CoV-2 from FDA-Approved Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(7):e00819-20. doi:10.1128/AAC.00819-20
87. Kim JM, Chung YS, Jo HJ, et al. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health Res Perspect*. 2020;11(1):3-7. doi:10.24171/j.phrp.2020.11.1.02
88. Xue X, Yang H, Shen W, et al. Production of Authentic SARS-CoV Mpro with Enhanced Activity: Application as a Novel Tag-cleavage Endopeptidase for Protein Overproduction. *J Mol Biol*. 2007;366(3):965-975. doi:10.1016/j.jmb.2006.11.073
89. Miltner N, Kalló G, Csősz É, et al. Identification of SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) Cleavage Sites Using Two-Dimensional Electrophoresis and In Silico Cleavage Site Prediction. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3236. doi:10.3390/ijms24043236
90. Nashed NT, Aniana A, Ghirlando R, Chiliveri SC, Louis JM. Modulation of the monomer-dimer equilibrium and catalytic activity of SARS-CoV-2 main protease by a transition-state analog inhibitor. *Commun Biol*. 2022;5(1):160. doi:10.1038/s42003-022-03084-7
91. El-Baba TJ, Lutomski CA, Kantsadi AL, et al. Allosteric Inhibition of the SARS-CoV-2 Main Protease: Insights from Mass Spectrometry Based Assays**. *Angew Chem Int Ed*. 2020;59(52):23544-23548. doi:10.1002/anie.202010316
92. Cheng SC, Chang GG, Chou CY. Mutation of Glu-166 Blocks the Substrate-Induced Dimerization of SARS Coronavirus Main Protease. *Biophys J*. 2010;98(7):1327-1336. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.4272
93. Suárez D, Díaz N. SARS-CoV-2 Main Protease: A Molecular Dynamics Study. *J Chem Inf Model*. 2020;60(12):5815-5831. doi:10.1021/acs.jcim.0c00575
94. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
95. Razali R, Subbiah VK, Budiman C. Technical Data of Heterologous Expression and Purification of SARS-CoV-2 Proteases Using *Escherichia coli* System. *Data*. 2021;6(9):99. doi:10.3390/data6090099

96. Andreini C, Arnesano F, Rosato A. The zinc proteome of SARS-CoV-2. *Metallomics*. 2022;14(7):mfac047. doi:10.1093/mtomcs/mfac047
97. Barretto N, Jukneliene D, Ratia K, Chen Z, Mesecar AD, Baker SC. The Papain-Like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Has Deubiquitinating Activity. *J Virol*. 2005;79(24):15189-15198. doi:10.1128/JVI.79.24.15189-15198.2005
98. Nguyen TTH, Woo HJ, Kang HK, et al. Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 2012;34(5):831-838. doi:10.1007/s10529-011-0845-8
99. Kuo CJ, Chi YH, Hsu JTA, Liang PH. Characterization of SARS main protease and inhibitor assay using a fluorogenic substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(4):862-867. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.098
100. Kuo CJ, Chao TL, Kao HC, et al. Kinetic Characterization and Inhibitor Screening for the Proteases Leading to Identification of Drugs against SARS-CoV-2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(4):e02577-20. doi:10.1128/AAC.02577-20
101. Lee H, Lei H, Santarsiero BD, et al. Inhibitor Recognition Specificity of MERS-CoV Papain-like Protease May Differ from That of SARS-CoV. *ACS Chem Biol*. 2015;10(6):1456-1465. doi:10.1021/cb500917m
102. Copeland RA. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. 1st ed. Wiley; 2013. doi:10.1002/9781118540398
103. Ma C, Hu Y, Townsend JA, et al. Ebselen, Disulfiram, Carmofur, PX-12, Tideglusib, and Shikonin Are Nonspecific Promiscuous SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2020;3(6):1265-1277. doi:10.1021/acspsci.0c00130
104. Weglarz-Tomczak E, Tomczak JM, Talma M, Burda-Grabowska M, Giurg M, Brul S. Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 2021;11(1):3640. doi:10.1038/s41598-021-83229-6
105. Amporndanai K, Meng X, Shang W, et al. Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives. *Nat Commun*. 2021;12(1):3061. doi:10.1038/s41467-021-23313-7
106. Riva L, Yuan S, Yin X, et al. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature*. 2020;586(7827):113-119. doi:10.1038/s41586-020-2577-1
107. Guma SD, Zhou Z, Song K, et al. Discovery of peptidomimetic spiropyrrolidine derivatives as novel 3CLpro inhibitors against SARS-CoV -2. *Eur J Med Chem*. 2025;281:117004. doi:10.1016/j.ejmech.2024.117004
108. Lovering F, Bikker J, Humblet C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J Med Chem*. 2009;52(21):6752-6756. doi:10.1021/jm901241e
109. Bansal A, Kumar V, Aggarwal R, Hooda M, Kumar S, Meera. Advances in Pyrazolopyrimidine Scaffold: Synthetic Strategies and Biological Applications

- (2019-Present). *Arch Pharm (Weinheim)*. 2026;359(3):e70226. doi:10.1002/ardp.70226
110. Olosunde A, Hu X. Molecular Recognition of SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors: Insights from Cheminformatics and Quantum Chemistry. *Molecules*. 2025;30(10):2174. doi:10.3390/molecules30102174
 111. Douangamath A, Fearon D, Gehrtz P, et al. Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. *Nat Commun*. 2020;11(1):5047. doi:10.1038/s41467-020-18709-w
 112. Xiong M, Su H, Zhao W, Xie H, Shao Q, Xu Y. What coronavirus 3C-like protease tells us: From structure, substrate selectivity, to inhibitor design. *Med Res Rev*. 2021;41(4):1965-1998. doi:10.1002/med.21783
 113. Scholfield MR, Zanden CMV, Carter M, Ho PS. Halogen bonding (X-bonding): A biological perspective. *Protein Sci*. 2013;22(2):139-152. doi:10.1002/pro.2201
 114. Bulut H, Higashi-Kuwata N, Ogata-Aoki H, et al. Impact of Single Halogen Atom Substitutions on Antiviral Profile of Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease. *ACS Omega*. 2026;11(3):4541-4550. doi:10.1021/acsomega.5c10895
 115. Dai W, Zhang B, Jiang XM, et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science*. 2020;368(6497):1331-1335. doi:10.1126/science.abb4489
 116. Zheng L, Li Y, Wu D, et al. Development of covalent inhibitors: Principle, design, and application in cancer. *MedComm – Oncol*. 2023;2(4):e56. doi:10.1002/mog2.56
 117. Serafim RAM, Gehringer M, Borsari C. Targeted Covalent Inhibitors in Drug Discovery, Chemical Biology and Beyond. *Pharmaceuticals*. 2024;17(2):206. doi:10.3390/ph17020206
 118. Carrasco R. Las Cisteino proteasas y los compuestos tipo aceptores de Michael. In: 2003. https://www.researchgate.net/publication/275890147_LAS_CISTEINO_PROTEASAS_Y_LOS_COMPUESTOS_TIPO_ACEPTORES_DE_MICHAEL
 119. Citarella A, Vittorio S, Dank C, Ielo L. Syntheses, reactivity, and biological applications of coumarins. *Front Chem*. 2024;12:1362992. doi:10.3389/fchem.2024.1362992
 120. Li Z, Kong D, Liu Y, Li M. Pharmacological perspectives and molecular mechanisms of coumarin derivatives against virus disease. *Genes Dis*. 2022;9(1):80-94. doi:10.1016/j.gendis.2021.03.007
 121. Li JL, Wang XH, Sun JC, Peng YY, Ji CB, Zeng XP. Chiral Tertiary Amine Catalyzed Asymmetric [4 + 2] Cyclization of 3-Aroylcoumarines with 2,3-Butadienoate. *Molecules*. 2021;26(2):489. doi:10.3390/molecules26020489
 122. Alshams MA, Nafie MS, Ashour HF, Yassen ASA. A comprehensive review and recent advances on isatin-based compounds as a versatile framework for anticancer therapeutics (2020–2025). *RSC Adv*. 2025;15(39):32188-32231. doi:10.1039/D5RA05002B

123. Arif MN, Sarwar S, Firdous F, et al. Discovery and prospects of new heterocyclic Isatin-hydrazide derivative with a novel role as estrogen receptor α degrader in breast cancer cells. *Front Chem.* 2024;12:1424637. doi:10.3389/fchem.2024.1424637
124. Brown LD, Girgis AS, Patel S, et al. Novel isatin conjugates endowed with analgesic and anti-inflammatory properties: design, synthesis and biological evaluation. *Future Med Chem.* 2025;17(1):59-73. doi:10.1080/17568919.2024.2437981
125. Baell JB, Holloway GA. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J Med Chem.* 2010;53(7):2719-2740. doi:10.1021/jm901137j
126. Yang H, Yang M, Ding Y, et al. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(23):13190-13195. doi:10.1073/pnas.1835675100
127. Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020;30(17):127377. doi:10.1016/j.bmcl.2020.127377
128. Mercorelli B, Bazzacco A, Eleuteri M, et al. Novel SARS-CoV-2 allosteric inhibitors that destabilize the Main Protease Mpro dimer. *Int J Biol Macromol.* 2025;319:145162. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.145162
129. Günther S, Reinke PYA, Fernández-García Y, et al. X-ray screening identifies active site and allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Science.* 2021;372(6542):642-646. doi:10.1126/science.abf7945
130. Puthanveedu V, Muraleedharan K. Phytochemicals as potential inhibitors for COVID-19 revealed by molecular docking, molecular dynamic simulation and DFT studies. *Struct Chem.* 2022;33(5):1423-1443. doi:10.1007/s11224-022-01982-4
131. Lešnik S, Jukić M, Bren U. Unveiling polyphenol-protein interactions: a comprehensive computational analysis. *J Cheminformatics.* 2025;17(1):50. doi:10.1186/s13321-025-00997-3
132. Zeng P, Zhou X, Guo L, Li W, Li J. Structural insights of the coronavirus main protease in complex with the non-covalent inhibitor CCF0058981. *J Struct Biol X.* 2026;13:100143. doi:10.1016/j.jsbx.2026.100143
133. Kneller DW, Phillips G, O'Neill HM, et al. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. *Nat Commun.* 2020;11(1):3202. doi:10.1038/s41467-020-16954-7
134. McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. *J Med Chem.* 2002;45(8):1712-1722. doi:10.1021/jm010533y
135. Haas KL, Franz KJ. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem Rev.* 2009;109(10):4921-4960. doi:10.1021/cr900134a
136. Karges J, Stokes RW, Cohen SM. Metal complexes for therapeutic applications. *Trends Chem.* 2021;3(7):523-534. doi:10.1016/j.trechm.2021.03.006

137. Cohen SM. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol.* 2007;11(2):115-120. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.012
138. Pessoa JC, Etcheverry S, Gambino D. Vanadium compounds in medicine. *Coord Chem Rev.* 2015;301-302:24-48. doi:10.1016/j.ccr.2014.12.002
139. Demoro B, Sarniguet C, Sánchez-Delgado R, et al. New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Trans.* 2012;41(5):1534-1543. doi:10.1039/C1DT11519G
140. Ahmad A, Graminha AE, Anam, et al. Exploring the therapeutic potential of Thiosemicarbazones-ruthenium (II) complexes: In vitro evaluation. *Polyhedron.* 2025;282:117788. doi:10.1016/j.poly.2025.117788
141. Gambino D, Otero L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chim Acta.* 2012;393:103-114. doi:10.1016/j.ica.2012.05.028
142. Fernández M, Arce ER, Sarniguet C, et al. Novel ruthenium(II) cyclopentadienyl thiosemicarbazone compounds with antiproliferative activity on pathogenic trypanosomatid parasites. *J Inorg Biochem.* 2015;153:306-314. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.06.018
143. Teixeira-Guedes C, Brás AR, Teixeira RG, Valente A, Preto A. Ruthenium(II)–Cyclopentadienyl-Derived Complexes as New Emerging Anti-Colorectal Cancer Drugs. *Pharmaceutics.* 2022;14(6):1293. doi:10.3390/pharmaceutics14061293
144. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem Rev.* 1996;96(7):2239-2314. doi:10.1021/cr9500390
145. Cirri D, Marzo T, Tolbatov I, et al. In Vitro Anti-SARS-CoV-2 Activity of Selected Metal Compounds and Potential Molecular Basis for Their Actions Based on Computational Study. *Biomolecules.* 2021;11(12):1858. doi:10.3390/biom11121858
146. Abd El-Lateef HMA, El-Dabea T, Khalaf MM, Abu-Dief AM. Development of Metal Complexes for Treatment of Coronaviruses. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6418. doi:10.3390/ijms23126418
147. Catalano A, Mariconda A, Sinicropi MS, et al. Biological Activities of Ruthenium NHC Complexes: An Update. *Antibiotics.* 2023;12(2):365. doi:10.3390/antibiotics12020365
148. Vuong W, Vederas JC. Improved Synthesis of a Cyclic Glutamine Analogue Used in Antiviral Agents Targeting 3C and 3CL Proteases Including SARS-CoV-2 M^{pro}. *J Org Chem.* 2021;86(18):13104-13110. doi:10.1021/acs.joc.1c01299
149. Gao X, Qin B, Chen P, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(1):237-245. doi:10.1016/j.apsb.2020.08.014
150. Madani A, Benkortbi O, Laidi M. In silico prediction of the inhibition of new molecules on SARS-CoV-2 3CL protease by using QSAR: PSOSVR approach. *Braz J Chem Eng.* 2024;41(1):427-442. doi:10.1007/s43153-023-00332-z

151. Valente C, Moreira R, Guedes RC, Iley J, Jaffar M, Douglas KT. The 1,4-naphthoquinone scaffold in the design of cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(15):5340-5350. doi:10.1016/j.bmc.2007.04.068
152. Bolton JL, Dunlap T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(1):13-37. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00256
153. Funk LM, Poschmann G, Chari A, et al. Redox regulation of the SARS-CoV-2 main protease provides new opportunities for drug design. *Biochemistry*. Preprint posted online April 19, 2022. doi:10.1101/2022.04.18.487732
154. Lu Y, Yang Q, Ran T, et al. Discovery of orally bioavailable SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitor as a potential treatment for COVID-19. *Nat Commun*. 2024;15(1):10169. doi:10.1038/s41467-024-54462-0
155. Joyce RP, Hu VW, Wang J. The history, mechanism, and perspectives of nirmatrelvir (PF-07321332): an orally bioavailable main protease inhibitor used in combination with ritonavir to reduce COVID-19-related hospitalizations. *Med Chem Res*. 2022;31(10):1637-1646. doi:10.1007/s00044-022-02951-6
156. Zhou Y, Gammeltoft KA, Tjørnelund-Sjursen HD, et al. SARS-CoV-2 Mpro inhibitor ensitrelvir: asymmetrical cross-resistance with nirmatrelvir and emerging resistance hotspots. *Emerg Microbes Infect*. 2025;14(1):2552716. doi:10.1080/22221751.2025.2552716
157. Hu Q, Xiong Y, Zhu G, et al. The SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm*. 2022;3(3):e151. doi:10.1002/mco2.151
158. Fabbian S, Fabi S, Schwarz L, et al. Insights into the complexity of SARS-CoV-2 M^{pro} inhibition: Ebselen and its derivatives impair dimerisation of the enzyme. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2026;41(1):2604232. doi:10.1080/14756366.2025.2604232
159. Ravanfar R, Sheng Y, Shahgholi M, et al. Surface cysteines could protect the SARS-CoV-2 main protease from oxidative damage. *J Inorg Biochem*. 2022;234:111886. doi:10.1016/j.jinorgbio.2022.111886
160. Sies H, Parnham MJ. Potential therapeutic use of ebselen for COVID-19 and other respiratory viral infections. *Free Radic Biol Med*. 2020;156:107-112. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.032
161. Sands KN, Burman AL, Ansah-Asamoah E, Back TG. Chemistry Related to the Catalytic Cycle of the Antioxidant Ebselen. *Molecules*. 2023;28(9):3732. doi:10.3390/molecules28093732
162. Alves De Lima E Silva A, Rio-Tinto A. Ebselen: A Promising Repurposing Drug to Treat Infections Caused by Multidrug-Resistant Microorganisms. Behzadi P, ed. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2024;2024:1-15. doi:10.1155/2024/9109041
163. Noguchi N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Arch Biochem Biophys*. 2016;595:109-112. doi:10.1016/j.abb.2015.10.024

164. Quiroga C, Incerti M, Benítez D, et al. Restyling an old scaffold: Ebsulfur analogs with improved activity and selectivity against the infective stage of trypanosomes. *Eur J Med Chem.* 2025;292:117675. doi:10.1016/j.ejmech.2025.117675
165. Thun-Hohenstein STD, Suits TF, Malla TR, et al. Structure-Activity Studies Reveal Scope for Optimisation of Ebselen-Type Inhibition of SARS-CoV-2 Main Protease. *ChemMedChem.* 2022;17(4):e202100582. doi:10.1002/cmdc.202100582
166. Qiao Z, Wei N, Jin L, et al. The Mpro structure-based modifications of ebselen derivatives for improved antiviral activity against SARS-CoV-2 virus. *Bioorganic Chem.* 2021;117:105455. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105455
167. Antonopoulou I, Sapountzaki E, Rova U, Christakopoulos P. Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (M^{pro}) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022;20:1306-1344. doi:10.1016/j.csbj.2022.03.009
168. Davis DA, Bulut H, Shrestha P, et al. Regulation of the Dimerization and Activity of SARS-CoV-2 Main Protease through Reversible Glutathionylation of Cysteine 300. Damania B, ed. *mBio.* 2021;12(4):e02094-21. doi:10.1128/mBio.02094-21
169. McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun.* 2014;70(1):2-20. doi:10.1107/S2053230X13033141
170. Dessau MA, Modis Y. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. *J Vis Exp.* 2011;(47):2285. doi:10.3791/2285
171. Hassell AM, An G, Bledsoe RK, et al. Crystallization of protein–ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63(1):72-79. doi:10.1107/S0907444906047020
172. Kaščáková B, Koutská A, Burdová M, Havlíčková P, Kutá Smatanová I. Revealing protein structures: crystallization of protein-ligand complexes – co-crystallization and crystal soaking. *FEBS Open Bio.* 2025;15(4):542-550. doi:10.1002/2211-5463.13913
173. Noske GD, Nakamura AM, Gawriljuk VO, et al. A Crystallographic Snapshot of SARS-CoV-2 Main Protease Maturation Process. *J Mol Biol.* 2021;433(18):167118. doi:10.1016/j.jmb.2021.167118
174. Xiong N, Long X, Xiong J, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol.* 2012;42(7):613-632. doi:10.3109/10408444.2012.680431
175. Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, Nath C. Astrocyte Activation: A Key Step in Rotenone Induced Cytotoxicity and DNA Damage. *Neurochem Res.* 2012;37(10):2178-2189. doi:10.1007/s11064-012-0841-y
176. Caudle M. Occupational exposures and parkinsonism. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Vol 131. Elsevier; 2015:225-239. doi:10.1016/B978-0-444-62627-1.00013-5
177. Ritchie TJ, Macdonald SJF. The impact of aromatic ring count on compound developability – are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug Discov Today.* 2009;14(21-22):1011-1020. doi:10.1016/j.drudis.2009.07.014

178. Varela MT, Dias GG, De Oliveira LFN, et al. Spirocyclic compounds as innovative tools in drug discovery for medicinal chemists. *Eur J Med Chem.* 2025;287:117368. doi:10.1016/j.ejmech.2025.117368
179. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52(1):221-247. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517
180. BenchChem. A Comprehensive Technical Guide to the Pharmacology of 1,4-Naphthoquinones. Published online April 2026.
181. Bai XG, Zheng Y, Qi J. Advances in thiosemicarbazone metal complexes as anti-lung cancer agents. *Front Pharmacol.* 2022;13:1018951. doi:10.3389/fphar.2022.1018951

8 ANEXOS

8.1. Vector de expresión de la MPro

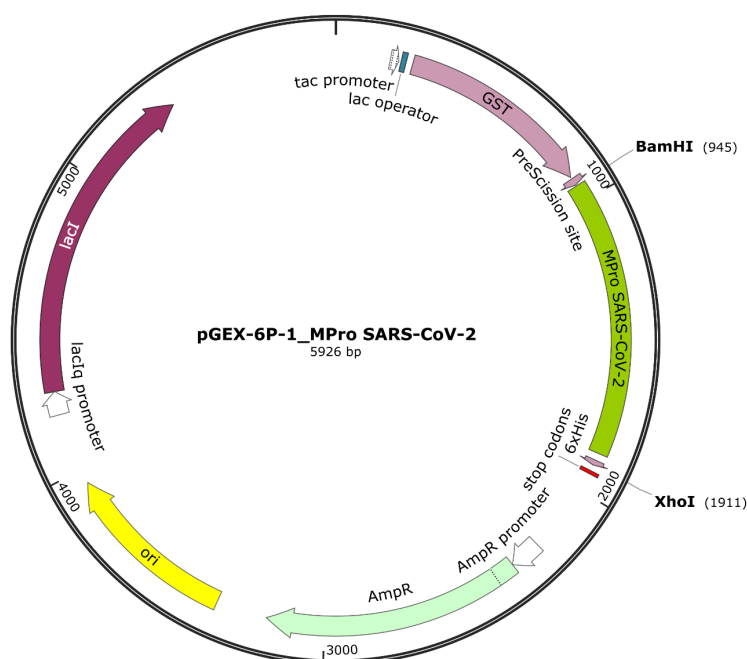


Figura A1. Representación del vector de expresión recombinante pGEX-6P-1-MPro. El mapa detalla el plásmido construido para la expresión heteróloga de la proteasa MPro del SARS-CoV-2 en *E. coli*. Fue clonado en el vector pGEX-6P-1 para garantizar la obtención de la enzima con sus extremos auténticos. En este vector la expresión de la proteína heteróloga fusionada a etiquetas de purificación está bajo el control de una secuencia promotora de la ARNpol del fago T7 y un operon *lac* (inducible por IPTG). La secuencia codificante para la MPro (correspondiente a la región de unión Nsp4/Nsp5) está precedida por la secuencia codificante para la GST de *S. japonicum* (comúnmente empleada como etiqueta de purificación por afinidad en columnas con glutatión conjugado). Dado que la primera retiene su sitio de autoclivaje en la región N-terminal, durante la expresión, la auto-proteólisis en esta posición escinde la GST de la MPro. El extremo C-terminal de la MPro se haya fusionado a una secuencia de 6xHis provista por el vector, que permite su purificación por IMAC, y además posee una sustitución de lisina por prolina en la posición P2' de un segundo sitio de corte. Esta mutación impide el autoclivaje prematuro por la propia MPro, y genera un sitio de reconocimiento específico para la proteasa PreScission (3C de rinovirus humano). Por lo tanto, la auto-proteólisis en el N-terminal de la MPro y el corte *in vitro* con PreScission escinden a las etiquetas de purificación: GST y la cola de 6xHis, generando la forma nativa de la MPro. El plásmido cuenta con el gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*) para la selección bacteriana. Obtenido de Hilgenfeld R. (German Center for Infection Research, University of Lübeck, Germany).

8.2. Vector de expresión de la PLPro

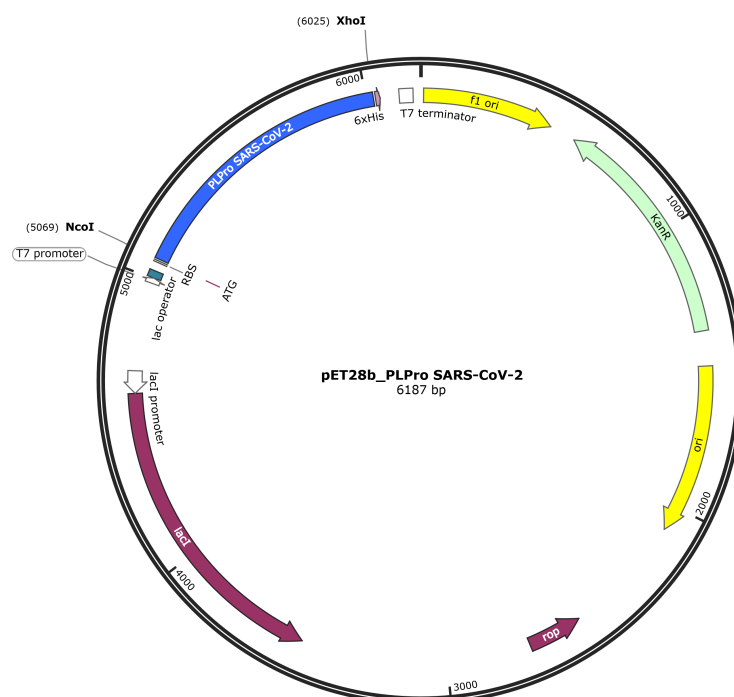


Figura A2. Representación del vector de expresión recombinante pET-28b-PLPro.

El mapa detalla el plásmido empleado para la expresión heteróloga de la proteasa PLPro de SARS-CoV-2 en *E. coli*. El vector contiene la secuencia codificante de la proteína Nsp3 de SARS-CoV-2 (aminoácidos 746-1060; GenBank: YP_009725299.1) bajo el control de una secuencia promotora de la ARNpol del fago T7 y un operon *lac* (inducible por IPTG). Para facilitar los procesos de purificación cromatográfica, la secuencia de la proteasa posee una etiqueta de polihistidina (6xHis) fusionada a su extremo C-terminal. Adicionalmente, en el esquema destaca el gen de resistencia a kanamicina (*KanR*) necesario para la selección de las bacterias transformantes. Obtenido de Dikic (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt, Germany).

8.3. Curva de calibración de SEC

Proteína estándar	Masa molecular (kDa)	Volumen de retención (mL)
Albúmina (BSA)	67,0	53,1
Ovoalbúmina	43,0	59,2
Quimiotripsina A	25,0	70,3
Ribonucleasa A	13,7	78,7

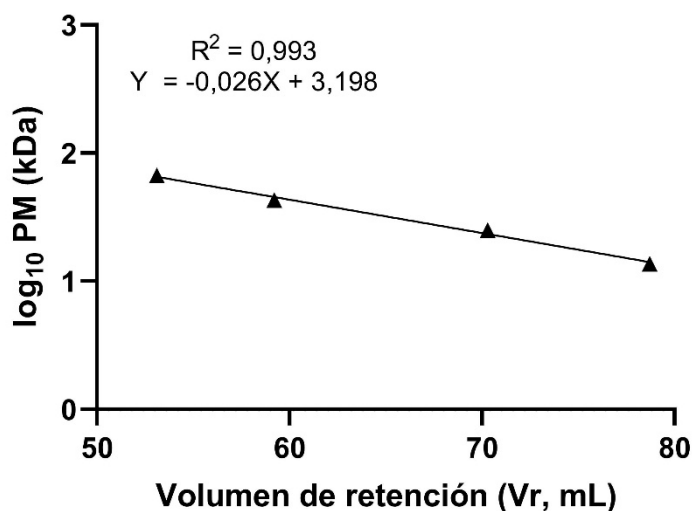


Figura A3. Curva de calibración empírica de la columna de exclusión molecular Superdex 75 16/60. El panel superior detalla las proteínas estándar globulares utilizadas para la estandarización del sistema y sus respectivos volúmenes de retención (V_r), calibrados en tampón PBS 1X a un flujo constante de 1 mL/min. El volumen muerto (V_0) se determinó en 44,6 mL empleando *Blue Dextran* (2000 kDa). La gráfica muestra la regresión lineal del logaritmo decimal del peso molecular ($\log_{10} PM$) en función del V_r . Los puntos negros representan los estándares de referencia.

8.4. Curvas dosis-respuesta de rotenoides

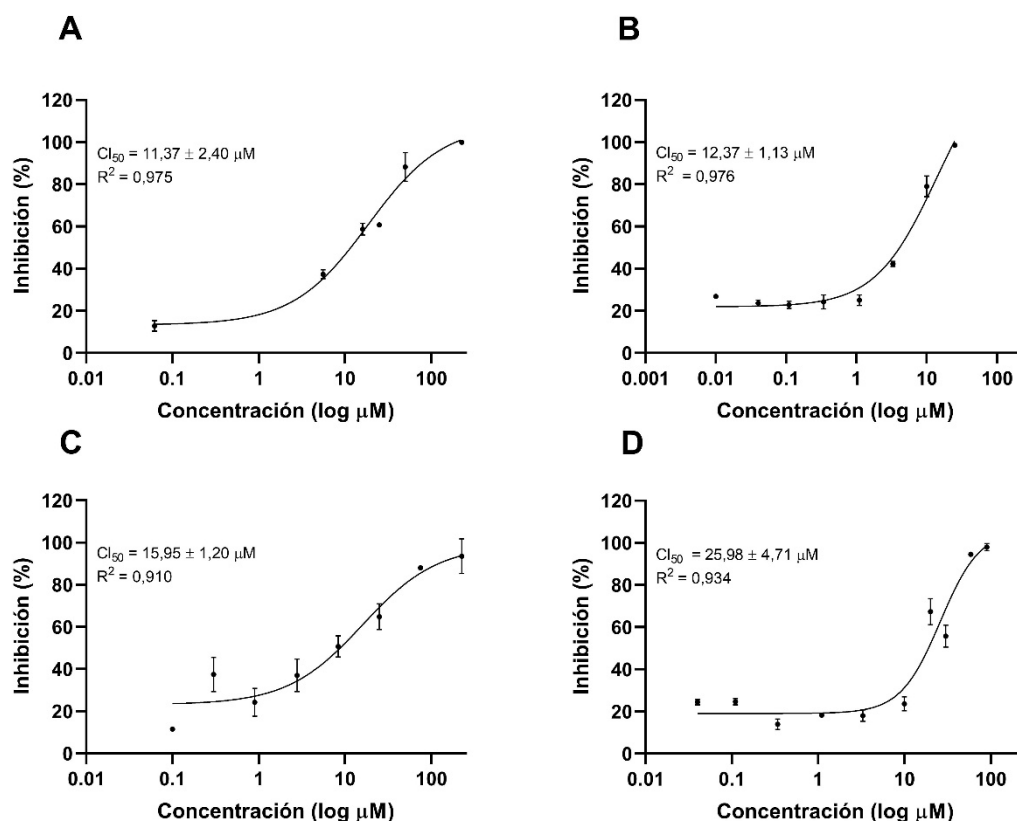


Figura A4. Curvas dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los *hits* rotenoides frente a la MPro de SARS-CoV-2. Se representa el porcentaje de inhibición enzimática en función de la concentración del inhibidor (escala logarítmica) para los compuestos **(A)** Rot-32, **(B)** Rot-31, **(C)** Rot-9 y **(D)** Rot-14. Los puntos experimentales indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoideal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

8.5. Curvas dosis-respuesta de pirazolopiridopirimidinas

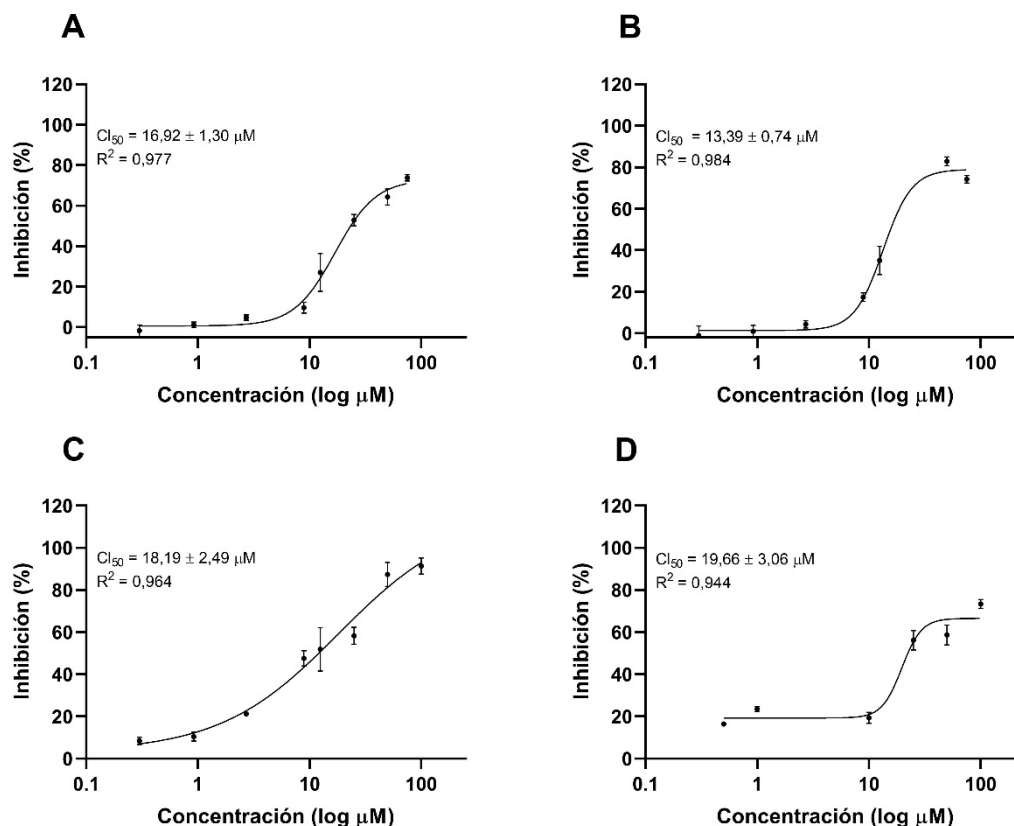


Figura A5. Curvas dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los *hits* pirazolopiridopirimidinas frente a la MPro de SARS-CoV-2. Se representa el porcentaje de inhibición enzimática en función de la concentración del inhibidor (escala logarítmica) para los compuestos **(A)** PRV B75, **(B)** PRV-D66, **(C)** PRV-D76 y **(D)** PRV-D77. Los puntos experimentales indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión no lineal dosis-respuesta sigmoidal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

8.6. Curvas dosis-respuesta de complejos organometálicos

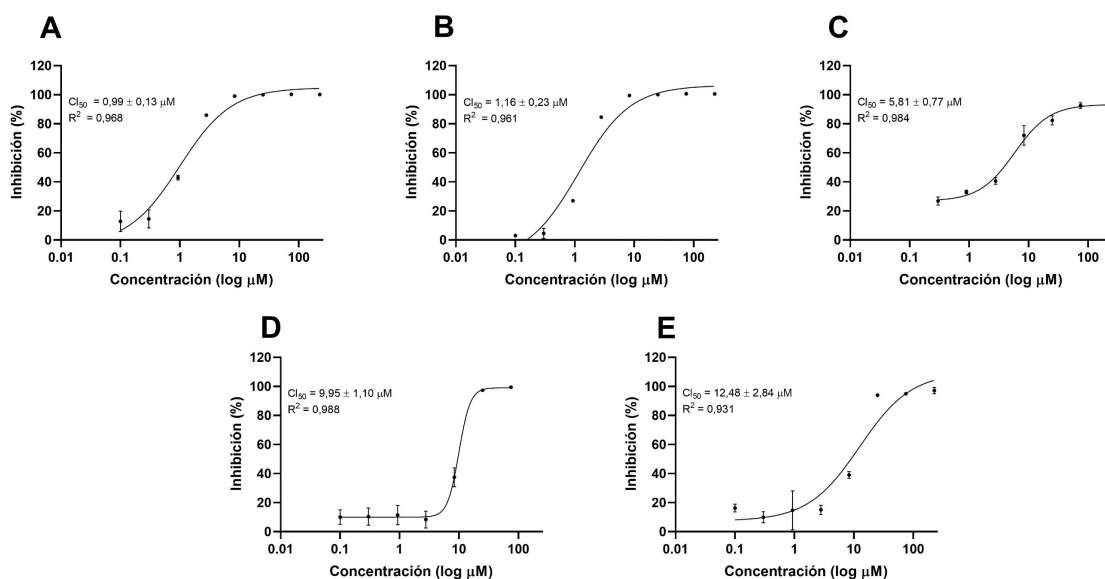


Figura A6. Curvas de dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los complejos organometálicos de rutenio (II) frente a la MPro de SARS-CoV-2. Se representa el porcentaje de inhibición enzimática en función de la concentración del inhibidor (escala logarítmica) para los compuestos **(A)** RuTN, **(B)** Ru fenilo, **(C)** RuCpTM, **(D)** RU9 y **(E)** RuCpCTZ. Los puntos experimentales indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoideal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

8.7. Curvas dosis-respuesta de los *singletons*

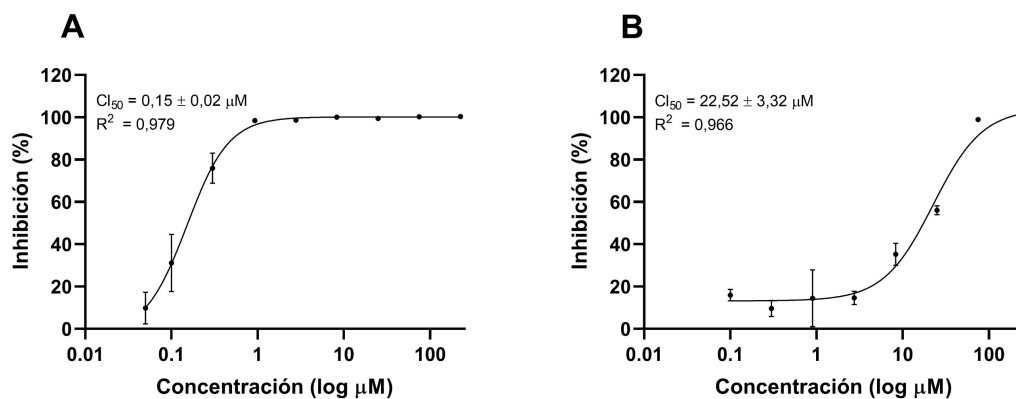


Figura 7. Curvas de dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los compuestos *singletons* (huérfanos) frente a la MPro de SARS-CoV-2. Se representa el porcentaje de inhibición enzimática en función de la concentración del inhibidor (escala logarítmica) para los compuestos **(A)** J 355 y **(B)** V 001. Los puntos experimentales indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoidal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

8.8. Curvas dosis-respuesta de los *hits* de la PLPro

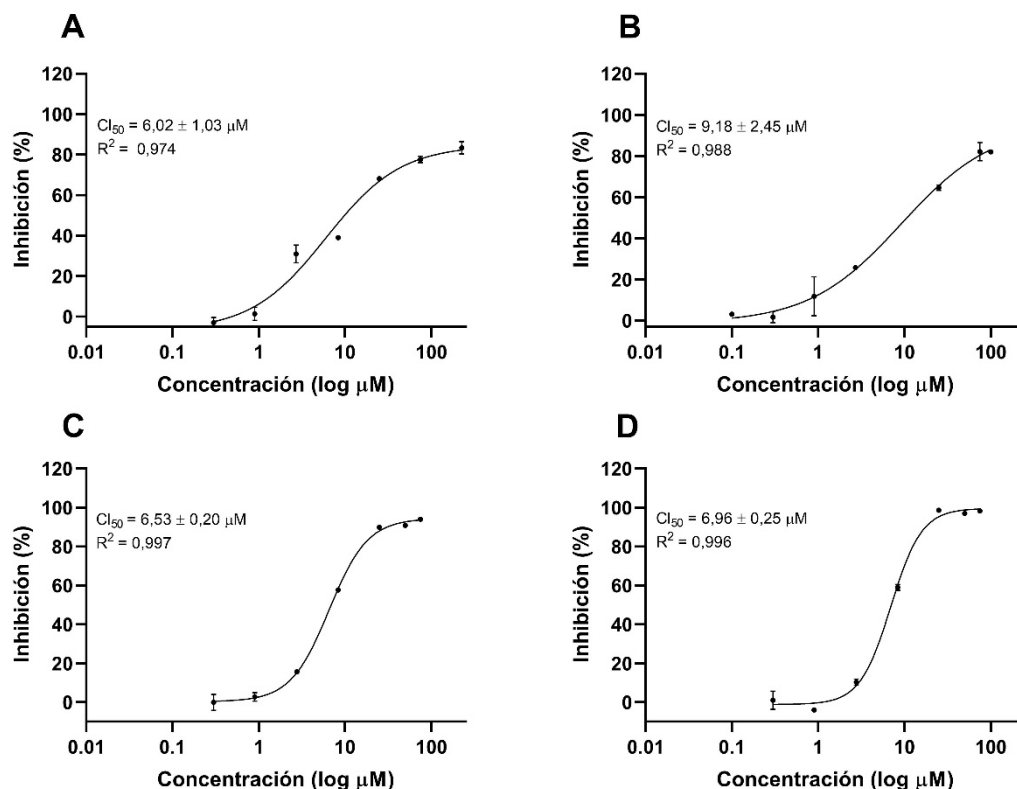


Figura A8. Curvas de dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los inhibidores duales frente a la proteasa PLPro de SARS-CoV-2. Se representa el porcentaje de inhibición enzimática en función de la concentración del compuesto (escala logarítmica) para los derivados Rotenoides **(A)** Rot-9 y **(B)** Rot-32, y para los complejos organometálicos de rutenio **(C)** Ru TN y **(D)** Ru fenilo. Los puntos experimentales indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos experimentales fueron ajustados mediante un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoidal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

8.9. Curvas dosis-respuesta de las naftoquinonas

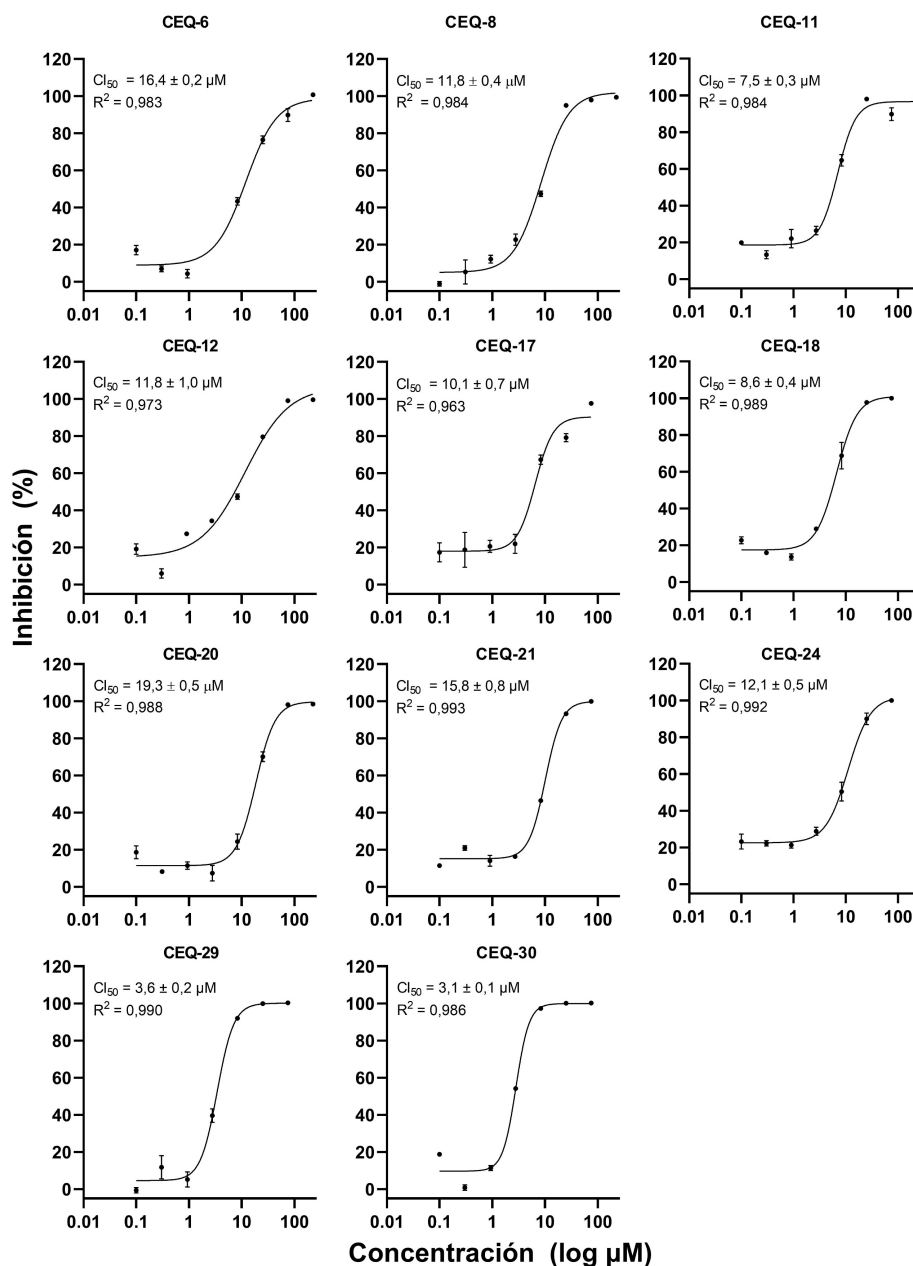


Figura A9. Curvas de dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los derivados de naftoquinona frente a la MPro de SARS-CoV-2. Se representa el porcentaje de inhibición enzimática en función de la concentración del compuesto (escala logarítmica) para los hits identificados. Los puntos experimentales indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos experimentales fueron ajustados mediante un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoidal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

8.10. Curvas dosis-respuesta de las naftoquinonas frente a la PLPro

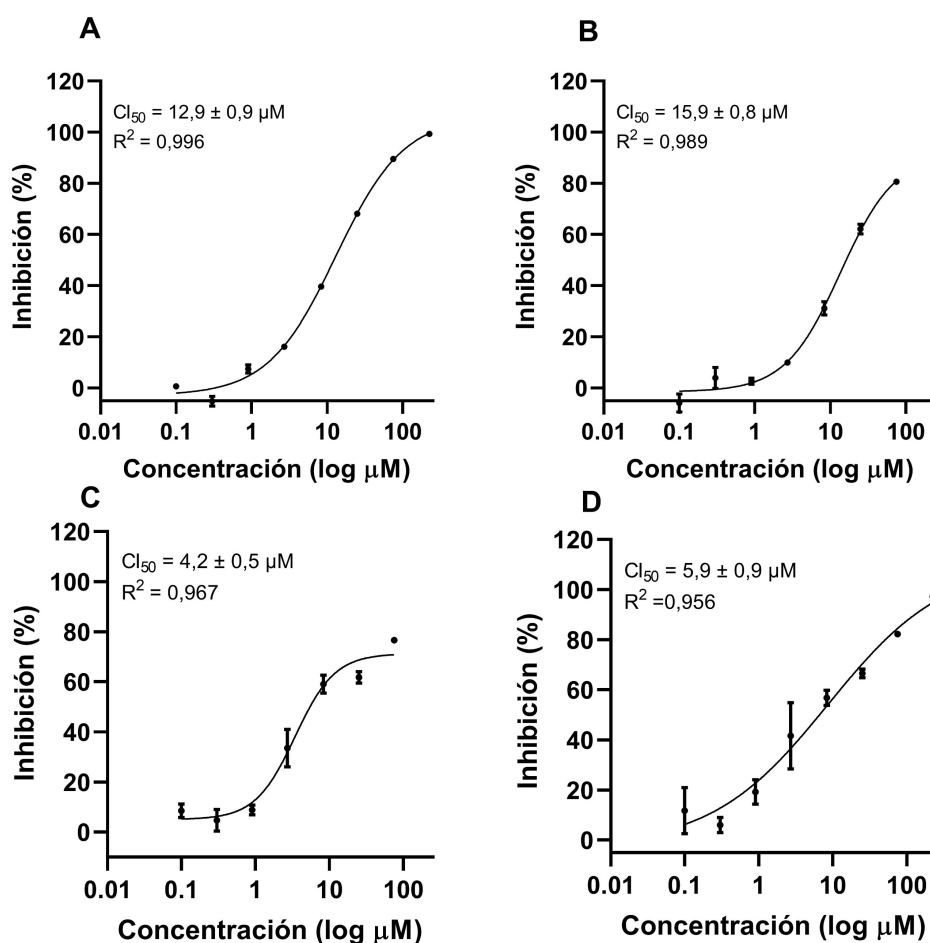
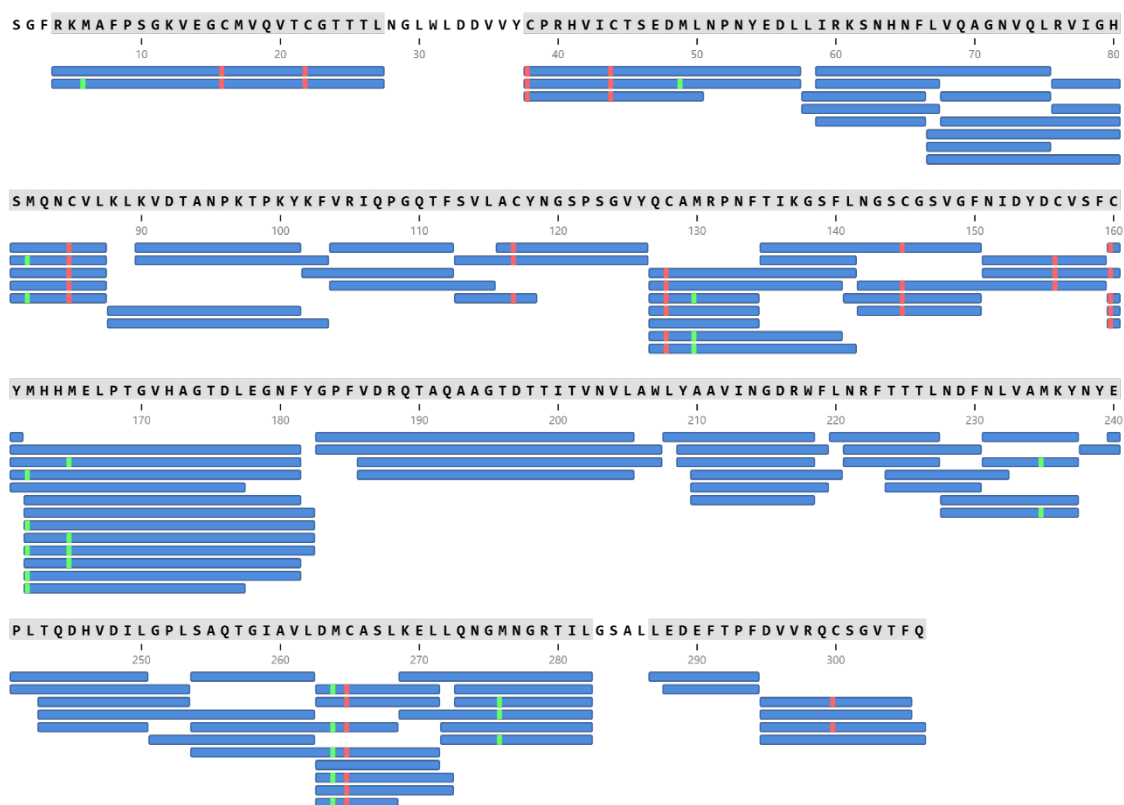


Figura A10. Curvas de dosis-respuesta para la determinación de la CI_{50} de los derivados de naftoquinona frente a la proteasa PLPro de SARS-CoV-2. Curvas dosis-respuesta representativas para el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la proteasa PLPro de SARS-CoV-2 en función de la concentración del inhibidor expresada en escala logarítmica. Los compuestos **(A)** CEQ-21, **(B)** CEQ-24, **(C)** CEQ-29 y **(D)** CEQ-30. Los puntos indican el valor medio y las barras de error representan la desviación estándar de los puntos ($n = 3$). Los datos fueron ajustados mediante un modelo de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoideal utilizando el software GraphPad Prism v8.0.

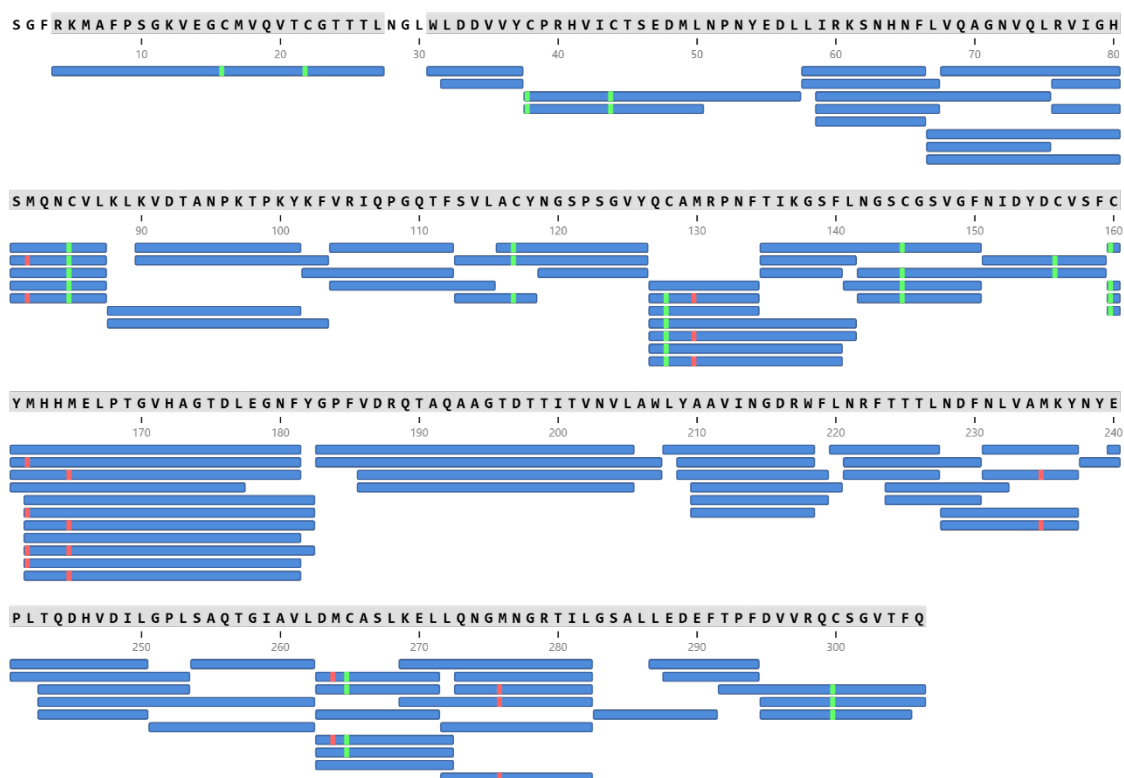
8.11. Mapa de cobertura de la MPro



Generated by PatternLab - www.patternlabforproteomics.org

Figura A11. Mapa de cobertura de secuencia de la MPro tras el tratamiento con el derivado de naftoquinona CEQ6. Análisis de mapeo peptídico mediante LC-MS/MS obtenido tras digestión quimiotriptica, alcanzando un 94,4% de cobertura de la secuencia primaria de la proteasa. Las barras horizontales azules representan los péptidos identificados y alineados con la secuencia de la proteína. Las líneas verticales al interior de las barras denotan las modificaciones químicas estándar esperadas por el protocolo de preparación de la muestra: residuos de cisteína carbamidometilados (+57,02 Da; rojo) y metioninas oxidadas (+15,99 Da; verde). No se detectaron modificaciones adicionales asociadas al incremento de masa del aducto covalente de CEQ-6 en ninguno de los péptidos analizados.

8.12. Mapa de cobertura de la MPro en presencia de DTT



Generated by PatternLab - www.patternlabforproteomics.org

Figura A12. Mapa de cobertura de secuencia de la MPro tras incubación con la benzisotiazolona AM79 y posterior desafío reductor con DTT. Análisis de mapeo peptídico mediante LC-MS/MS obtenido tras la digestión quimiotrípica, alcanzando un 98% de cobertura de la secuencia primaria de la proteasa. Las barras horizontales azules representan los péptidos identificados y alineados. Las líneas verticales al interior de las barras denotan modificaciones químicas específicas: residuos de cisteína carbamidometilados (+57,02 Da; verde) resultantes del tratamiento con yodoacetamida, y residuos de metionina oxidados (+15,99 Da; rojo). No se detectaron modificaciones adicionales asociadas al incremento de masa del aducto covalente de AM79.