

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	13	15-21	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	-------	---	-------------------	----------------

Enzimas de la biosíntesis del virus SARS-CoV-2 como dianas potenciales para el descubrimiento de nuevos antivirales

Biosynthetic enzymes of the SARS-CoV-2
as potential targets for the discovery of new antiviral drugs

Fecha de recepción y aceptación: 22 de marzo de 2021 y 13 de abril de 2021

DOI: 10.46583/nereis_2021.13.844

Juan A. Castillo-Garit^{1,2,*}, Yudith Cañizares-Carmenate³ y Facundo Pérez-Giménez²

¹ Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

* Correspondencia: Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Unidad de Toxicología Experimental. Santa Clara. 50200 Villa Clara. Cuba. *E-mail*: jacgarit@yahoo.es

² Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular. Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia. Universitat de València. España.

³ Unit of Computer-Aided Molecular “Biosilico” Discovery and Bioinformatic Research (CAMD-BIR Unit), Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara 54830. Villa Clara. Cuba.



RESUMEN

La aparición de la pandemia producida por la COVID-19 (enfermedad producida por coronavirus 2019), cuyo agente causal es el SARS-CoV-2, ha provocado una gran preocupación a nivel mundial. Esta emergencia sanitaria ha puesto de manifiesto la necesidad urgente que existe de desarrollar o bien una nueva vacuna o bien agentes terapéuticos antivirales que permitan combatir al SARS-CoV-2. El reposicionamiento de fármacos es una de las estrategias más rápidas y prácticas de identificar rápidamente nuevos fármacos que permitirían prevenir, controlar o incluso erradicar el virus. Encontrar agentes terapéuticos que actúen directamente sobre enzimas específicas que tengan un rol esencial en la replicación viral será un gran logro en la búsqueda de antivirales. En este trabajo se analizan las características generales de varias enzimas que desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis o replicación del virus y su potencial como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos compuestos activos contra el SARS-CoV-2. Este trabajo provee las bases y dirección para el desarrollo de futuras investigaciones de desarrollo de nuevos fármacos o el reposicionamiento de fármacos conocidos para combatir la COVID-19.

PALABRAS CLAVE: *antivirales, coronavirus, COVID-19, diana, enzima.*

ABSTRACT

The outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has raised a major global health concern. This urgent situation is pressing the world to respond with the development of novel vaccine or small molecule therapeutics for SARS-CoV-2. Drug repurposing screening is regarded as one of the most practical and rapid approaches for the discovery of such therapeutics. Direct-acting agents, targeting



specific viral enzymes that play an essential role in viral replication, represent a milestone in antiviral therapy. Several biosynthetic enzymes of the SARS-CoV-2 were analyzed as potential targets to develop new therapeutic drugs. This work provides a basis and directions for future drug development and reuse on the protein level of COVID-19.

KEYWORDS: *antiviral, coronavirus, COVID-19, target, enzyme.*

BROTE DE CORONAVIRUS

Los coronavirus (CoV) son virus encapsulados que contienen como material genético un ARN monocatenario y son los agentes causantes de un gran número de afecciones respiratorias, gastrointestinales y neurológicas en los seres humanos [1]. Los CoV representan un grupo grande y heterogéneo de patógenos humanos que periódicamente amenazan la salud pública debido a brotes epidémicos repentinos en algún lugar del globo que luego se extiende en mayor o menor medida a otras zonas del planeta. En años recientes la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha priorizado las enfermedades virales más amenazadoras para los seres humanos entre las que se encuentran: el síndrome respiratorio agudo severo, más conocido como SARS-CoV (por las siglas en inglés de *severe acute respiratory syndrome coronavirus*), y el síndrome respiratorio del medio, este conocido como MERS-CoV (por las siglas en inglés de *Middle East respiratory syndrome coronavirus*) [2].

En diciembre de 2019 varios pacientes fueron diagnosticados con una neumonía viral en Wuhan, China; la cual se sospecha que se originó en el mercado de animales de esa ciudad [3]. El virus conocido como SARS-CoV-2; es un virus de ARN monocatenario que se caracteriza por su alta patogenicidad, por estar constituido de cuatro proteínas estructurales y el genoma de ARN. Este virus es el responsable de la enfermedad conocida como COVID-19 (siglas en inglés de *coronavirus disease 2019*); la cual se convirtió rápidamente en una pandemia mundial [4]. Desde el brote de esta enfermedad, muchas personas alrededor del mundo se han visto severamente afectadas, y esta fue considerada como una pandemia global extremadamente agresiva [5]. Datos en tiempo real de la OMS muestran que el 30 de enero de 2021 el número global de personas infectadas era de poco más de 102 millones y las muertes globales alcanzaban la cifra de 2.224.449 personas [6], con un porcentaje de muerte entre 0,8 y 14,5 % en los países más afectados [7]. Específicamente, Europa sobrepasa los 30 millones de casos confirmados, de los cuales poco más de 12,5 millones se han recuperado y se reportan 699.501 de fallecimientos por la COVID-19, siendo los países más afectados el Reino Unido, Alemania, Francia, Italia y España [6].

Los síntomas más habituales de la COVID-19 son la fiebre, la tos seca y el cansancio. Otros síntomas menos frecuentes que afectan a algunos pacientes son los dolores y las molestias, la congestión nasal, el dolor de cabeza, la conjuntivitis, el dolor de garganta, la diarrea, la pérdida del gusto o el olfato y las erupciones cutáneas o cambios de color en los dedos de las manos o los pies. Estos síntomas suelen ser leves y comienzan gradualmente. Alrededor de 1 de cada 5 personas que contraen la COVID-19 acaba presentando un cuadro grave y experimenta dificultades para respirar [8]. La enfermedad es más severa entre personas mayores y aquellos pacientes que presentan comorbilidades que involucran disfunción endotelial tales como hipertensión, obesidad y diabetes [9].



ESTRATEGIAS DE ENFRENTAMIENTO A LA PANDEMIA

El escenario actual ha dejado al descubierto las deficiencias en los sistemas de salud de casi todos los países para enfrentar nuevos patógenos virulentos. De hecho, las medidas más efectivas para controlar la diseminación de la infección viral están relacionadas con el distanciamiento social y el cierre total de las ciudades/países [10]. Estas drásticas medidas, diseñadas para limitar la tasa de propagación de nuevas infecciones, han resultado en una crisis económica global que ha afectado a millones de personas, incluso a la seguridad alimentaria en varias zonas geográficas [11]. Indudablemente, la COVID-19 ha impactado fuertemente en los sistemas de salud del mundo y en la economía global debido a las medidas de confinamiento, pero los daños serán aun mayores si no somos capaces de controlar de una manera efectiva la diseminación del virus [12]. Sin embargo, junto a las medidas de distanciamiento social y cierre total, la disponibilidad de fármacos antivirales efectivos contra el SARS-CoV-2 tendría un impacto beneficioso enorme en el control de esta emergencia de salud y en la posibilidad de volver a la vida normal [2].

En este contexto, el reposicionamiento de fármacos ofrece la oportunidad de identificar rápidamente nuevos fármacos que permitirían prevenir, controlar o incluso erradicar el virus del SARS-CoV-2; aunque obviamente los necesarios ensayos clínicos son requeridos [13]. La OMS ha lanzado la iniciativa “Solidaridad”, uno de los mayores ensayos clínicos internacionales para la identificación de tratamientos satisfactorios contra la COVID-19 [14]. El reposicionamiento de fármacos tiene como ventaja que propondría medicamentos ya probados en humanos y de los cuales se conoce su seguridad y datos de su clínica; solamente sería necesario un poco de evidencia experimental de su actividad antiviral. El diseño racional de nuevas entidades químicas que actuarían específicamente en pasos vitales de la replicación viral, soportados obviamente por datos biológicos de los diferentes pasos de tamizaje, representa la principal estrategia para descubrir nuevos agentes antivirales potentes y selectivos [15]. Varios fármacos se han propuesto desde el inicio de la pandemia y varios se encuentran en diferentes fases de investigación; aquí brindaremos algunos ejemplos agrupándolos según la fase del ciclo viral en la que actúan. En el proceso de unión del virus a las células tenemos: ivermectina, anticuerpos monoclonales, azitromicina, hidroxicloroquina, sitagliptina y nidazolamida, entre otros. En la fase de penetración del virus a las células humanas tenemos como ejemplos: peptidil-clorometilcetona, nafamostatmesilato, loprazolam y nelfinavir, entre otros. En la biosíntesis del virus (fase donde más dianas terapéuticas se conocen) tenemos: ribavirina, ziprasidona, vitamina B-12, ritonavir, cefuroxima y remdesivir, entre otros; siendo este último uno de los más empleados durante el primer año de pandemia en la terapéutica [5].

Otra estrategia para luchar contra la pandemia de la COVID-19 se basa en el desarrollo de vacunas. Una vacuna ideal contra el coronavirus debería brindar protección completa y de por vida contra el SARS-CoV-2 en todas las personas vacunadas con pocos efectos adversos; sin embargo, ninguna vacuna logra este objetivo ideal. Al menos se han comenzado 246 proyectos de vacunas contra la COVID-19 desde enero de 2020 y la OMS reconoce que hasta el momento se continúan 235 de ellos (12 de enero de 2021) [16]. Hasta hace pocos años desarrollar una vacuna contra un virus determinado podía tomar de 15 a 20 años para obtener la aprobación final. Pero el empleo de nuevas tecnologías y de la experiencia previa ha permitido acelerar tremendamente el proceso de desarrollo de vacunas contra los virus. De hecho, la mayoría de las vacunas que están en estudio se basan en



estudios previos contra otros coronavirus como el SARS-CoV y el MERS-CoV [17]. Dos vacunas ya han sido aprobadas y varias se encuentran en la fase III de los ensayos clínicos [16]. No obstante, la posibilidad de obtención de alguna vacuna puede no ser tan efectiva para la protección a largo plazo, ya que también su efectividad puede variar en dependencia de la cepa del virus, por lo que es necesario el desarrollo de compuestos antivirales efectivos para tratar a los afectados por esta pandemia [5].

En este sentido, el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos activos contra el SARS-CoV-2 también puede verse favorecido por el conocimiento previo adquirido en el estudio de otros coronavirus patógenos humanos como el SARS-CoV y el MERS-CoV, por mencionar los que posiblemente sean los más importantes. Este conocimiento puede impulsar el descubrimiento de inhibidores de coronavirus de amplio espectro con potencial para ser útiles contra infecciones causadas por virus de esta familia [2].

ENZIMAS DIANAS

Los esfuerzos investigativos se centran en las siguientes etapas del ciclo viral: la absorción, la penetración, la biosíntesis y el ensamblaje. En este trabajo discutiremos las dianas más importantes en la biosíntesis o replicación. Estudios previos sobre dianas de la biosíntesis del virus se han enfocado en el desarrollo de antivirales que actúen sobre las siguientes dianas: la proteasa principal (M^{pro} , de *main proteasa*), RdRp (la ARN polimerasa dependiente de ARN), PL^{pro} (*Papain-like-protease*), así como otras dos proteínas no estructurales: la NSP13 (*Non-structural protein 13*, también conocida como Helicase) y la NSP14 (*Non-structural protein 14* conocida como ExoN) [5, 18]. La inhibición de las proteasas y la polimerasa es una meta en el descubrimiento de nuevos antivirales y en el pasado ha sido la alternativa que ha producido los fármacos más efectivos para el tratamiento de la hepatitis C y el VIH [2].

La M^{pro} , también conocida como $3CL^{pro}$ (por las siglas en inglés de *3-chymotrypsin-like cysteine protease*), es una de las dianas mejor estudiadas en los coronavirus [19]; debido principalmente a la similitud entre su sitio activo y mecanismo respecto a los CoV que han provocado epidemias previas como SARS-CoV y el MERS-CoV [19]. Además del alto grado de conservación, la M^{pro} del SARS-CoV-2 no tiene homóloga humana, lo cual reduce la posibilidad de reacciones adversas y la convierte en una diana muy interesante para la identificación/selección de nuevos compuestos antivirales [5]. Esta enzima desempeña un papel esencial en el proceso de maduración de otras proteínas no estructurales (NSP) y promueve la biosíntesis del virus. Varios métodos de *screening* se han empleado para encontrar nuevos inhibidores de la M^{pro} y se han dirigido en dos direcciones principales: por un lado, la búsqueda de nuevos péptidos inhibidores o moléculas pequeñas con acción inhibitoria; por otro, el reposicionamiento de fármacos aprobados por la FDA. Algunos de los fármacos mencionados en la sección anterior, como ribavirina, la vitamina B-12 y la nicotinamida son resultado de esta última estrategia y presentan acción sobre esta enzima [5].

La RdRp es una enzima crítica en el complejo proceso de replicación-transcripción del coronavirus, tiene un alto nivel de conservación en esta familia de virus y presenta un dominio esencial de polimerasa en la región C-terminal de la RdRp [2]. Esta enzima es muy importante en la síntesis de ARN y varios estudios plantean que su inhibición no debe provocar graves efectos adversos en



seres humanos [5]. A diferencia de la M^{pro}, esta proteína está mucho menos explorada como diana potencial para obtener nuevos compuestos antivirales. De los compuestos propuestos para reposicionamiento solo el remdesivir es inhibidor de la RdRp [2]. Un estudio computacional sugiere que la metilcobalamina (un derivado de la vitamina B-12) podría actuar como inhibidor de esta enzima; mientras que un *screening in silico* predijo que galidesivir, cefuroxima, hidroxiclороquina y penciclovir pueden unirse a la RdRp [5].

La función de la PL^{pro} es esencial para la corrección de la replicación viral, por lo que tiene un rol importante en el proceso de replicación del virus y en la infección de las células del huésped [5]. Esta enzima se encuentra muy conservada entre los diferentes coronavirus. Además, reconoce e hidroliza proteínas celulares ubiquitinadas que están relacionadas con la respuesta innata antiviral, por lo cual la PL^{pro} actúa como un potente supresor de los mecanismos de inmunidad dependientes de ubiquitina del huésped; bloquea las vías de producción del factor de necrosis tumoral β y otras citoquinas [2]. Teniendo esto en consideración, podemos afirmar que esta enzima es una diana interesante, ya que sus inhibidores, además de bloquear la replicación del coronavirus, potenciarán la inmunidad antiviral de la célula huésped. Al igual que la RdRp, esta proteína no ha sido investigada en tanto detalle si la comparamos con la M^{pro}, por lo cual consideramos que sería una diana muy interesante para tener en cuenta en la búsqueda de nuevos antivirales contra el SARS-CoV-2.

Por su parte, la NSP13 emplea la energía liberada de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) para participar en el desenrollamiento de la cadena viral de ARN. Un estudio reciente informó que el proceso helicoidal dependiente de NSP13 es un proceso esencial para la replicación, transcripción y traducción del SARS-CoV-2 y, por lo tanto, NSP13 puede considerarse como un objetivo farmacológico contra la COVID-19 [20]. Mientras que la NSP14, que se encuentra tanto en SARS-CoV como en SARS-CoV-2, ya se ha informado que tiene una actividad exonucleasa con función de corrección; por lo que puede corregir errores de incorporación de nucleótidos cometidos por RdRp y luego mejorar la fidelidad de la síntesis de ARN [21]. Esta enzima pudiera ser una diana interesante para desarrollar nuevos antivirales, pero hasta el momento no hay fármacos dirigidos a esta [5].

CONCLUSIONES

En este trabajo, se analizan las principales dianas enzimáticas relacionadas con el ciclo de biosíntesis del virus del SARS-CoV-2, lo que proporciona una base de conocimiento para el área del descubrimiento de compuestos con actividad sobre el virus causante de la pandemia de COVID-19. En varias de estas enzimas se parte de estudios previos en otros coronavirus y se enuncia la fortaleza asociada al alto nivel de homología de las enzimas entre ellos. Centrando las futuras investigaciones en estas enzimas aumentan las posibilidades de encontrar nuevos compuestos antivirales a través del reposicionamiento de fármacos. Los medicamentos con potencial actividad sobre dichas dianas pueden ser identificados a partir de grandes datos empleando estudios computacionales como QSAR, Docking, etc. Después de lo cual, se deben realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* para evaluar los efectos clínicos sobre la COVID-19.



AGRADECIMIENTOS

J. A. Castillo-Garit thanks the program “Estades Temporals per a Investigadors Convidats” for a fellowship to work at Valencia University in 2021.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zumla A, Chan JFW, Azhar EI, Hui DSC, Yuen K-Y. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15:327-47.
- [2] 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.* 2020.
- [3] Dai W, Zhang B, Jiang X-M, Su H, Li J, Zhao Y, *et al.* Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science.* 2020;368(6497):1331.
- [4] Zhu W, Xu M, Chen CZ, Guo H, Shen M, Hu X, *et al.* Identification of SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitors by a Quantitative High-Throughput Screening. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2020;3(5):1008-16.
- [5] Zhang Y, Tang LV. Overview of Targets and Potential Drugs of SARS-CoV-2 According to the Viral Replication. *J Proteome Res.* 2021;20(1):49-59.
- [6] Impact of COVID-19 in the World: *Worldmeter*; 2021.
- [7] Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell.* 2020;182(4):812-27.e19.
- [8] WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. covid19.who.int2021.
- [9] Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA.* 2020;323(20):2052-9.
- [10] Saglietto A, D’Ascenzo F, Zoccai GB, De Ferrari GM. COVID-19 in Europe: the Italian lesson. *Lancet.* 2020;395(10230):1110-1.
- [11] Van Lancker W, Parolin Z. COVID-19, school closures, and child poverty: a social crisis in the making. *Lancet Public Health.* 2020;5(5):e243-e4.
- [12] Lewnard JA, Lo NC. Scientific and ethical basis for social-distancing interventions against COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(6):631-3.
- [13] Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41-58.
- [14] Alpern JD, Gertner E. Off-Label Therapies for COVID-19 —Are We All In This Together? *Clin Pharmacol Ther.* 2020;108(2):182-4.
- [15] Everts M, Cihlar T, Bostwick JR, Whitley RJ. Accelerating Drug Development: Antiviral Therapies for Emerging Viruses as a Model. *Annu Rev Pharmacol.* 2017;57(1):155-69.
- [16] Covid vaccine development: The shots available and the doses administered; 2021.
- [17] Zarandi PK, Zinatizadeh MR, Zinatizadeh M, Yousefi MH, Rezaei N. SARS-CoV-2: From the Pathogenesis to Potential Anti-viral Treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021:111352.



- [18] Ton A-T, Gentile F, Hsing M, Ban F, Cherkasov A. Rapid Identification of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease by Deep Docking of 1.3 Billion Compounds. *Mol Inform.* 2020;39(8):2000028.
- [19] Chen YW, Yiu C-PB, Wong K-Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CLpro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. *F1000Research.* 2020;9:129.
- [20] Frick DN, Lam AMI. Understanding Helicases as a Means of Virus Control. *Current Pharmaceutical Design.* 2006;12(11):1315-38.
- [21] Ogando NS, Ferron F, Decroly E, Canard B, Posthuma CC, Snijder EJ. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity. *Frontiers in Microbiology.* 2019;10(1813).

