

- Artículo
- [Acceso abierto](#)
- [Publicado:27 marzo 2021](#)

La catepsina L desempeña un papel clave en la infección por SARS-CoV-2 en humanos y ratones humanizados y es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos

- [Miao-Miao Zhao](#) ,
- [Wei Li Yang](#) ,
- [Fang-Yuan Yang](#) ,
- [Li Zhang](#) ,
- [Wei Jin Huang](#) ,
- [Wei Hou](#) ,
- [Fanático de Chang Fa](#) ,
- [Rong Hua Jin](#),
- [Ying-Mei Feng](#),
- [Tú-Chun Wang](#) y
- [Jin-Kui Yang](#)

[Transducción de señales y terapia dirigida](#) volumen 6 , Número de artículo: 134 (2021) [Citar este artículo](#)

- **16k** Accesos
- **151** citas
- **29** Altmétrico
- [Métricadetalles](#)

Resumen

Para descubrir nuevos medicamentos para combatir la COVID-19, se necesita con urgencia comprender las bases moleculares de la infección por SARS-CoV-2. Aquí, por primera vez, informamos el papel crucial de la catepsina L (CTSL) en pacientes con COVID-19. El nivel circulante de CTSL se elevó después de la infección por SARS-CoV-2 y se correlacionó positivamente con el curso y la gravedad de la enfermedad. En consecuencia, la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 aumentó la expresión de CTSL en células humanas *in vitro* y ratones transgénicos *ACE2 humanos in vivo*, mientras que CTSL la sobreexpresión, a su vez, mejoró la infección por pseudovirus en células humanas. CTSL escindió

funcionalmente la proteína espiga del SARS-CoV-2 y mejoró la entrada del virus, como lo demuestra la sobreexpresión y eliminación de CTSL in vitro y la aplicación de fármacos inhibidores de CTSL in vivo. Además, la amantadina, un medicamento contra la influenza con licencia, inhibió significativamente la actividad de CTSL después de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 y previno la infección tanto in vitro como in vivo. Por lo tanto, CTSL es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos anti-COVID-19.

Introducción

El reciente brote de la enfermedad del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) (COVID-19) ha impuesto una grave carga de salud pública en todo el mundo. Para prevenir y tratar esta enfermedad, se necesitan con urgencia métodos eficaces, como vacunas y medicamentos. Aunque la vacunación está en marcha en algunos países, el impacto de las mutaciones del SARS-CoV-2 y el grado de protección que podría tener una vacuna son algunos de los principales temas en debate. [1](#) Por otro lado, la droga es más conveniente y aceptable para las personas. Desafortunadamente, actualmente no existe un fármaco eficaz que pueda usarse. Así, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado remdesivir para el tratamiento de COVID-19 bajo una autorización de uso de emergencia. Se cree que remdesivir puede ser útil pero no universalmente efectivo. [2](#) Por lo tanto, es importante ampliar el espectro de dianas terapéuticas.

Tanto el SARS-CoV-1, que surgió en 2002, como el nuevo SARS-CoV-2 infectan las células huésped mediante la unión de sus proteínas de punta (S) de la envoltura viral al mismo receptor, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). [3](#) Nuestro grupo se centró en la correlación entre ACE2 y las enfermedades metabólicas desde el brote de infección por SARS-CoV-1 en 2003. Nuestro estudio anterior reveló que el gen ACE2 está altamente asociado con la diabetes [4](#); la pérdida de ACE2 conduce a una disminución de la secreción de insulina, así como a un deterioro progresivo de la tolerancia a la glucosa [5-6](#); La vía ACE2 puede mejorar el flujo sanguíneo local, la inflamación, el estado de estrés y la fibrosis, lo que conduce a la mejora del transporte de glucosa, la lipólisis y la producción de adipocinas. [7-8-9](#) Estos hallazgos pueden explicar en parte la mayor morbilidad y mortalidad en pacientes con COVID-19 combinados con diabetes. [10](#)

Para entrar en las células huésped, diversos virus dependen de la escisión y activación de la proteína S por las proteasas de la célula huésped. [11](#) , [12](#) ,

[13](#), [14](#) Sin embargo, estudios recientes se han centrado principalmente en la furina y la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2). [3](#), [14](#)

La catepsina L (CTSL), un miembro de la cisteína proteasa lisosomal, contiene un dominio L de hélice α y un dominio R de hoja β en la estructura espacial. [15](#) Su función principal es la proteólisis de antígenos proteicos producidos por endocitosis de patógenos. [16](#) Estudios anteriores han indicado que la fusión de membrana del SARS-CoV-1 se basa en la proteólisis de la proteína S por parte del CTSL del huésped in vitro. [17](#), [18](#) Por lo tanto, es razonable suponer que CTSL puede ser un objetivo para el desarrollo de medicamentos para tratar la infección por SARS-CoV-2. [19](#), [20](#) Este estudio, por primera vez, analizó los niveles circulantes de CTSL en pacientes con COVID-19 y estudió sistemáticamente los efectos terapéuticos de CTSL en esta enfermedad. Indicó que CTSL podría ser un objetivo terapéutico prometedor para la prevención y el tratamiento de COVID-19.

Resultados

Matrícula y características de los pacientes con COVID-19

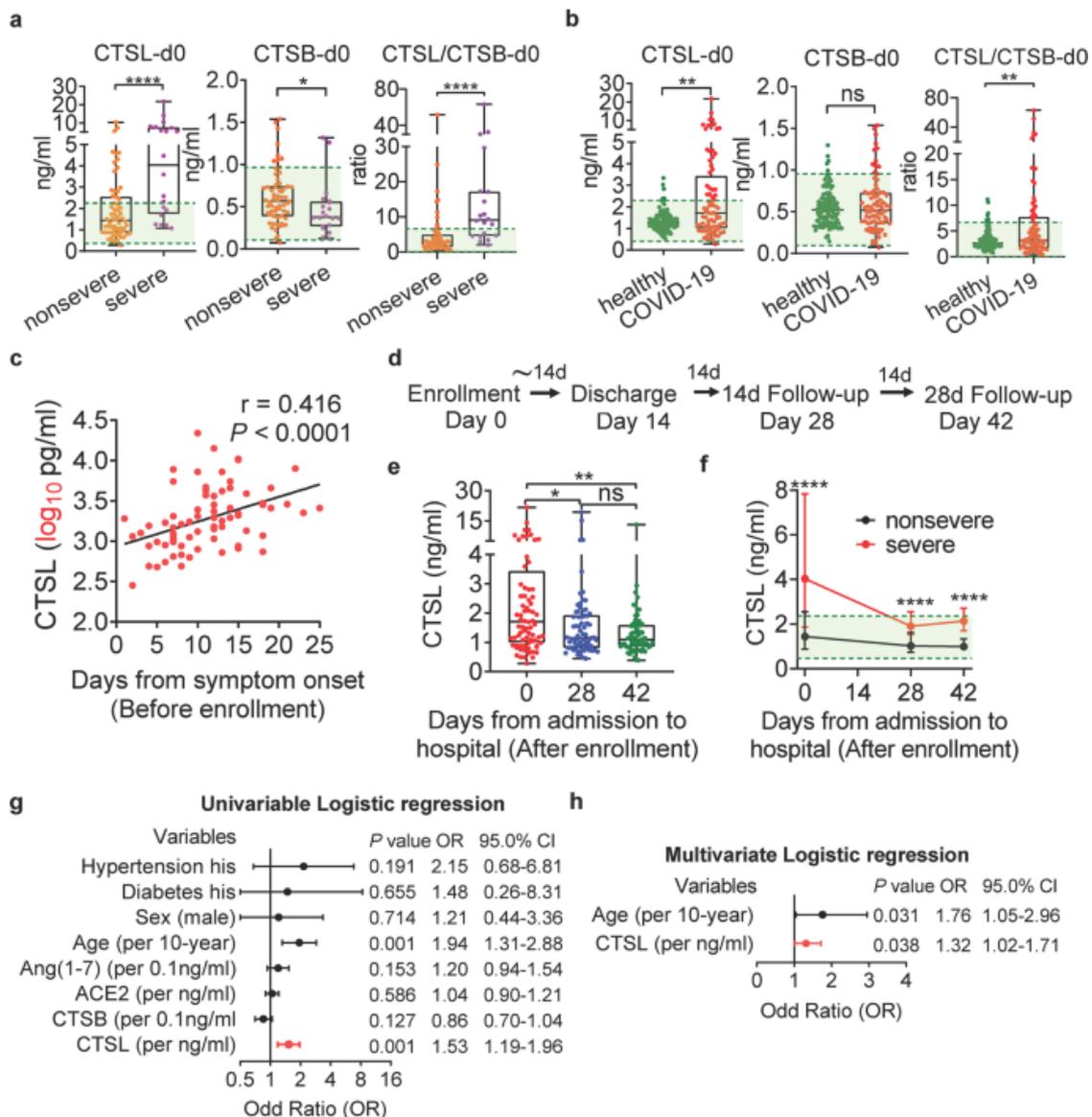
Se investigó un total de 108 pacientes consecutivos con COVID-19 ingresados en el Hospital Youan de Beijing, Universidad Médica de la Capital entre el 21 de enero y el 30 de abril de 2020. Después de excluir a 5 pacientes menores de 18 años, 1 paciente embarazada, 8 pacientes que fallecieron en muy poco tiempo y 7 pacientes que no quisieron participar, finalmente se incluyeron 87 pacientes en el análisis final. De estos 87 pacientes, 67 tenían enfermedad no grave (2 leves, 65 moderadas) y 20 tenían enfermedad grave (15 graves, 5 críticas) según la clasificación de gravedad establecida por el Comité Nacional de Salud de China. Las características demográficas y clínicas detalladas de los pacientes con COVID-19 se muestran en la Tabla complementaria [1](#). Los marcados aumentos en los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), creatina quinasa MB (CK-MB) y mioglobina indicaron que el SARS-CoV-2 ataca las células hepáticas y cardíacas, de acuerdo con informes anteriores. [21](#), [22](#)

También inscribimos a 125 voluntarios sanos que tenían la misma edad y sexo que los pacientes con COVID-19. [En la Tabla complementaria 2](#) se muestran las características demográficas y clínicas detalladas de los individuos sanos. El análisis comparativo de los parámetros entre pacientes con COVID-19 e individuos sanos se muestra en la Tabla complementaria [3](#).

El nivel circulante de CTSL está elevado en pacientes con COVID-19

Como el SARS-CoV-2 comparte una identidad de secuencia del 79,6 % con el SARS-CoV-1, [23](#) medimos los niveles plasmáticos de varias proteínas que son esenciales para la entrada del SARS-CoV-1 en las células huésped. ACE2 es el receptor de entrada tanto para el SARS-CoV-1 como para el SARS-CoV-2. Las cisteína proteasas endosómicas CTSL y la catepsina B (CTSB) median en la escisión de la proteína SARS-CoV-1 S, que es necesaria para la entrada del coronavirus en las células huésped. [17](#) , [24](#) Por lo tanto, los niveles plasmáticos de CTSL, CTSB, ACE2 y sus productos (angiotensina 1-7 (Ang(1-7))), se midieron en pacientes con COVID-19. Los niveles plasmáticos de Ang(1-7) fueron ligeramente inferior en pacientes con enfermedad grave que en pacientes con enfermedad no grave, mientras que los niveles plasmáticos de ACE2 fueron los mismos entre los dos grupos (Tabla complementaria [4](#)). Curiosamente, el nivel plasmático de CTSL y CTSL/CTSB fue notablemente más alto, mientras que el de CTSB fue ligeramente más bajo, en pacientes con enfermedad grave que en pacientes con enfermedad no grave (Fig. [1a](#) y Tabla complementaria [4](#)).

Figura 1



El CTSL circulante está elevado en pacientes con COVID-19. En este estudio se inscribieron un total de 87 pacientes con COVID-19, incluidos 20 con enfermedad grave y 67 con enfermedad no grave, y 125 voluntarios sanos. **a** Niveles plasmáticos de CTSL, CTSB y CTSL/CTSB en pacientes con COVID-19 grave ($n = 20$) y no grave ($n = 67$) al ingreso hospitalario (día 0). La significación estadística se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney (bilateral). **b** Niveles plasmáticos de CTSL, CTSB y CTSL/CTSB en pacientes con COVID-19 (día 0) ($n = 87$) y voluntarios sanos emparejados por edad/sexo ($n = 125$). Las líneas verdes en los paneles **a** y **b** indican los rangos de referencia para cada parámetro, establecidos como los valores medios ± 2 DE en los participantes sanos. La significación estadística se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney (bilateral). **c** Correlación entre CTSL en plasma de pacientes con COVID-19 ($n = 87$) y la cantidad de días desde el inicio de los síntomas hasta la recolección de sangre antes de la terapia. La significación estadística se evaluó mediante el análisis de

correlación de Spearman (bilateral). **d** Diagrama de flujo del estudio de seguimiento. Los pacientes ingresaron en el hospital el día 0 y experimentaron un tiempo medio de hospitalización de 14 días (día 14). Luego, fueron seguidos el día 14 (día 28) y el día 28 (día 42) después del alta hospitalaria. Se recogieron muestras de sangre los días 0, 28 y 42. **e** Niveles de CTSL en plasma de pacientes con COVID-19 ($n = 87$) en los días 0, 28 y 42 después de la inscripción. La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. **f** Comparación de los niveles de CTSL en plasma entre pacientes con COVID-19 no grave ($n = 67$) y grave ($n = 20$) en los días 0, 28 y 42. Los datos se muestran como medianas \pm rangos intercuartílicos. *La significación estadística se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney (bilateral).* **g** Diagrama de bosque de resumen de las variables predictoras candidatas asociadas con la gravedad de COVID-19 ($n = 87$) mediante regresión logística univariable. **h** Diagrama de bosque de resumen de las variables predictoras candidatas asociadas con la gravedad de COVID-19 ($n = 87$) en regresión logística multivariable. Las variables predictoras utilizadas en el modelo final fueron hipertensión, diabetes, sexo, edad, Ang(1-7), ACE2, CTSB y CTSL

[imagen a tamaño completo](#)

Para confirmar aún más la correlación entre los cambios en los niveles de catepsina y COVID-19, se midieron los niveles de CTSL y CTSB en plasma en los 125 voluntarios sanos, y los rangos de referencia para cada parámetro se establecieron como los valores medios \pm 2 SD en los participantes sanos, indicados por los recuadros verdes en las figuras (Fig. [1a](#), [b](#)). Los niveles de CTSL y CTSL/CTSB fueron notablemente más altos en pacientes con COVID-19 que en voluntarios sanos, mientras que el nivel de CTSB no se modificó en los pacientes (Fig. [1b](#)). CTSL y CTSL/CTSB aumentaron en pacientes con COVID-19 que en individuos sanos, y en pacientes graves que en pacientes no graves. Estos resultados indicaron que CTSL o CTSL/CTSB estaban asociados con la infección por SARS-CoV-2. Se necesitan más investigaciones y validaciones.

El nivel circulante de CTSL cambia con el curso de COVID-19

En particular, se encontró una fuerte correlación entre el nivel de CTSL y la cantidad de días desde el inicio de los síntomas hasta la recolección de sangre antes de la terapia (Fig. [1c](#)). Además, realizamos un estudio de seguimiento para determinar la correlación entre el nivel de CTSL y el COVID-19. Los pacientes con COVID-19 experimentaron un tiempo de hospitalización promedio de 14 días (día 14) y fueron seguidos el día 14 (día 28) y el día 28 (día 42) después del alta hospitalaria (Fig. [1d](#)). En el

estudio de seguimiento, los niveles elevados de CTSL disminuyeron drásticamente el día 28 y permanecieron en un nivel estable el día 42 (Fig. [1e](#)). Sin embargo, la diferencia entre los grupos grave y no grave persistió durante 42 días después del ingreso al hospital, aunque en la mayoría de los pacientes, el nivel de CTSL volvió al rango normal después del alta (Fig. [1f](#)). Estos resultados indicaron que CTSL se asoció significativamente con la infección por SARS-CoV-2.

CTSL es un factor independiente de gravedad en pacientes con COVID-19

Las correlaciones entre la gravedad de la enfermedad y los parámetros clínicos, incluidos CTSL, CTSB, ACE2, Ang(1-7), edad, sexo y coexistencia de diabetes o hipertensión, se estimaron mediante el coeficiente de correlación rho de Spearman. La gravedad se correlacionó positivamente con CTSL y la edad, pero se correlacionó negativamente con CTSB. Además de estar correlacionado con la gravedad, CTSL también se correlacionó positivamente con la edad y los antecedentes de hipertensión, pero se correlacionó negativamente con CTSB (Tabla complementaria [5](#)). En el análisis de regresión logística univariable, la razón de probabilidad (OR) de experimentar un estado crítico fue significativamente mayor en los pacientes con un nivel más alto de CTSL (OR, 1,53 por ng/ml; IC del 95 %, 1,19-1,96; $P = 0,001$) y mayor edad (OR, 1,94 por 10 años; IC 95 %, 1,31-2,88; $P = 0,001$), mientras que CTSB, ACE2, Ang(1-7), el sexo y la coexistencia de diabetes o hipertensión no contribuyeron significativamente a las probabilidades de experimentar un estado crítico (Fig. [1g](#)). La regresión logística multivariable indicó que CTSL era un factor independiente para el estado de enfermedad grave después del ajuste por hipertensión, diabetes, sexo, edad, Ang(1-7), ACE2 y CTSB (Fig. [1h](#)). En conjunto, estos hallazgos nos llevaron a concluir que CTSL estaba altamente correlacionado con la infección por SARS-CoV-2 y asociado con la gravedad de la enfermedad.

El nivel de CTSL está elevado en células infectadas con pseudovirus SARS-CoV-2 in vitro

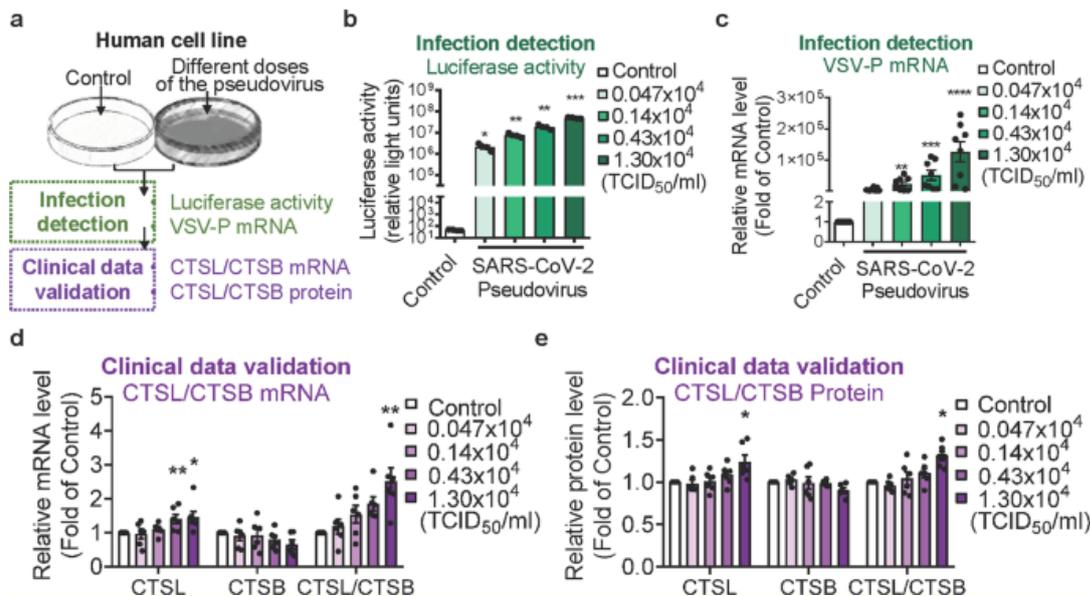
Como el nivel de CTSL está significativamente elevado en el plasma de pacientes con COVID-19, especulamos que CTSL puede ser un biomarcador importante y un objetivo terapéutico para COVID-19. Para probar esta hipótesis, realizamos una serie de experimentos in vitro e in vivo utilizando un sistema de pseudovirus SARS-CoV-2. Este pseudovirus está compuesto por partículas del virus de la estomatitis vesicular (VSV) con replicación defectuosa (pseudovirus basado en G*ΔG-VSV) que contienen proteínas SARS-CoV-2 S (SARS-2-S), refleja fielmente aspectos clave del SARS-CoV-2 entrada de celda [3](#) como informamos

anteriormente [25](#) y se puede usar de manera segura en laboratorios de nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) (Figura complementaria [1a, b](#)). VSV codifica varios tipos de proteínas, incluida la glicoproteína de unión a la célula huésped (VSV-G) y la fosfoproteína (VSV-P). Para el sistema de pseudovirus basado en G*ΔG-VSV, el gen VSV-G se eliminó y se reemplazó con genes que codifican la luciferasa de luciérnaga. [25](#) Por lo tanto, las células infectadas expresarían proteínas VSV-P y luciferasa después de haber sido infectadas por el pseudovirus basado en G*ΔG-VSV. En consecuencia, tanto la actividad de luciferasa como el nivel de ARNm de VSV-P pueden usarse como indicadores de infección por pseudovirus (Fig. [1c](#) complementaria).

Primero, para determinar la línea celular con la mayor susceptibilidad a la entrada impulsada por el SARS-2-S, comparamos varias líneas celulares humanas, incluidas células de hepatoma humano (Huh7), células de riñón embrionario humano (HEK293T), células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), y células de adenocarcinoma de pulmón humano (Calu-3) (Fig. [2a](#) complementaria). Los resultados del ensayo de luciferasa revelaron que la línea celular Huh7 tenía la mayor susceptibilidad a la infección por pseudovirus SARS-2-S (Fig. [2b-f](#) complementaria). Además, los marcados aumentos en los niveles circulantes de alanina aminotransferasa (ALT) y AST en pacientes con COVID-19 en comparación con voluntarios sanos observados en nuestro estudio (Tablas complementarias [1](#) - [2](#) y Figura complementaria [3a, b](#)) y la lesión hepatocelular observada en pacientes con COVID-19 por otros sugirieron que el SARS-CoV-2 ataca a los hepatocitos como células diana. [22](#) Por lo tanto, se seleccionaron células Huh7 para los experimentos posteriores en este estudio.

A continuación, para verificar si la expresión de CTSL aumenta después de la infección por SARS-CoV-2 in vitro, se midieron los niveles de proteína y ARNm de CTSL y CTSB en células Huh7 infectadas con el pseudovirus SARS-CoV-2 (Fig. [2a](#)). Las células Huh7 se infectaron con diferentes dosis de pseudovirus SARS-CoV-2, como lo indican las actividades de luciferasa (Fig. [2b](#)) y los niveles de ARNm de fosfoproteína VSV (VSV-P) (Fig. [2c](#)). De acuerdo con nuestros datos clínicos, los niveles de ARNm (Fig. [2d](#)) y proteína (Fig. [2e](#)) de CTSL aumentaron de manera dependiente de la dosis después de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2. Estos resultados confirmaron nuestros hallazgos en pacientes con COVID-19 e indicaron que la infección por SARS-CoV-2 causó una regulación positiva de CTSL.

Figura 2



CTSL está elevado en células infectadas con pseudovirus SARS-CoV-2 in vitro. un esquema de la configuración del ensayo de validación. Las células Huh7 se infectaron con diferentes dosis de pseudovirus SARS-CoV-2 (de $0,047 \times 10^4$ TCID₅₀ /ml a $1,30 \times 10^4$ TCID₅₀ /ml). Las células no infectadas con pseudovirus se usaron como controles. Se midieron la actividad de luciferasa y los niveles de ARNm de VSV-P para evaluar la gravedad de la infección. Se midieron los niveles de ARNm y proteína de CTSL y CTSB en células Huh7 para validar los datos clínicos. **b**, **c** Actividad de luciferasa ($n = 4$) (**b**) y ARNm de VSV-P ($n = 8$) (**c**) los niveles aumentaron de forma dependiente de la dosis 24 h después de la infección por pseudovirus. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de Brown-Forsythe y Welch con la prueba post hoc de Dunnett en **b** con la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn para **c**. **d**, **e** Efectos de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 en los niveles de ARNm de CTSL y CTSB (**d**) y los niveles de proteína (**e**). $n = 6$. La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. Los datos se expresan como valores medios \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$

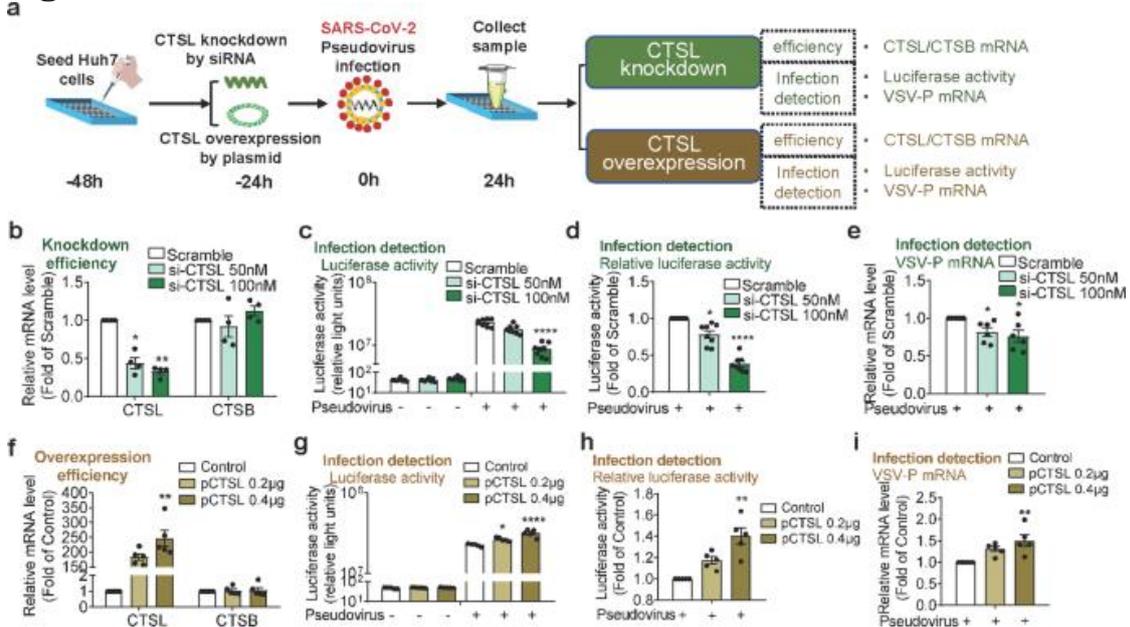
[imagen a tamaño completo](#)

La eliminación o sobreexpresión de CTSL afecta la infección por pseudovirus in vitro

Para investigar si se requiere CTSL para la entrada celular del SARS-CoV-2, usamos siRNA contra CTSL humano (si-CTSL) y plásmidos que codifican CTSL humano (pCTSL) para eliminar y sobreexpresar el gen *CTSL* en células Huh7, respectivamente. El tratamiento con si-CTSL reguló a la baja CTSL de forma dependiente de la dosis sin afectar la expresión de *CTSB* tanto en el ARNm como en el nivel de proteína (Fig. [3b](#) y Fig. [4a](#)

complementaria). La eliminación de *CTSL* condujo a una reducción significativa dependiente de la dosis en la entrada de células de pseudovirus, como lo demuestra la actividad de luciferasa y el nivel de ARNm de VSV-P (Fig. 3c-e). Por el contrario, la sobreexpresión de *CTSL* aumentó notablemente la entrada de células de pseudovirus de una manera dependiente de la dosis sin afectar la expresión de *CTSB* tanto en el ARNm como en los niveles de proteína (Fig. 3f-i y Fig. 4b complementaria). Todos estos resultados sugirieron que *CTSL* era crítico para la infección por SARS-CoV-2.

Figura 3



La eliminación o sobreexpresión de *CTSL* afecta la infección por pseudovirus in vitro. **un** esquema de la configuración del ensayo de sobreexpresión y eliminación de *CTSL*. **b** Desactivación dependiente de la dosis de *CTSL* por siRNA sin afectar la expresión de *CTSB*. $n = 4$. La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. **c** – **e** Eliminación de la entrada impulsada por el SARS-2-S inhibida en función de la dosis de *CTSL*, medida por un ensayo de luciferasa y mostrada como actividad absoluta de luciferasa ($n = 8$) (**c**) y actividad relativa de luciferasa ($n = 8$) (**d**) y niveles de ARNm de VSV-P ($n = 6$) (**e**). La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. **f** Sobreexpresión dependiente de la dosis de *CTSL* con un plásmido que codifica el gen *CTSL* sin afectar la expresión de *CTSB* ($n = 5$). La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. **g** – **i** Sobreexpresión de la entrada impulsada por el SARS-2-S promovida de forma dependiente de la dosis de *CTSL*, medida por un ensayo de luciferasa y mostrada como actividad absoluta de luciferasa (**g**) y actividad relativa de luciferasa **h**, valores y niveles de ARNm de VSV-P (**i**) $n = 5$.

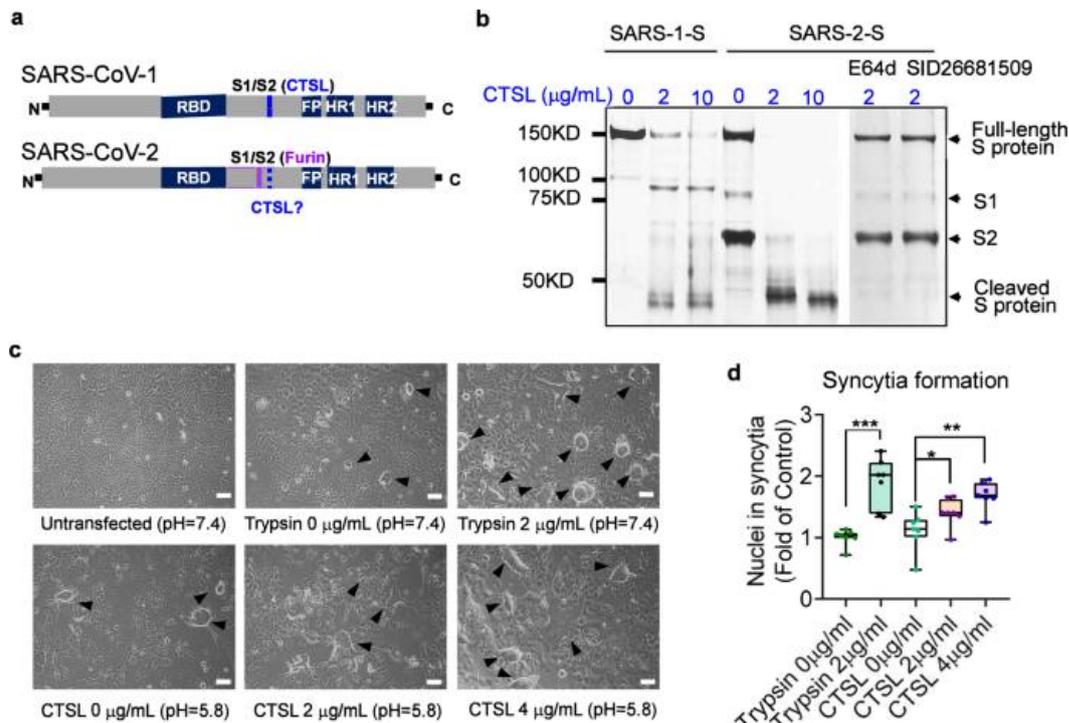
La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. Los datos se expresan como valores medios \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$

[imagen a tamaño completo](#)

CTSL escinde la proteína S, y esta escisión promueve la fusión célula-célula

CTSL divide la proteína SARS-CoV-1 S en subunidades S1 y S2 y activa proteolíticamente la fusión célula-célula. [17](#) A diferencia de la proteína S del SARS-CoV-1, la proteína S del SARS-CoV-2 se escinde previamente mediante la proproteína convertasa furina en el sitio de escisión S1/S2 (Fig. [4 bis](#)). Por lo tanto, los efectos de CTSL en el SARS-CoV-2 parecen ser reemplazados por los de la furina. Sin embargo, ningún informe ha examinado los efectos de CTSL en la escisión de la proteína S del SARS-CoV-2 y la función de CTSL en la fusión célula-célula. Aquí, detectamos directamente la escisión de la proteína SARS-CoV-2 S purificada por CTSL. El tratamiento con CTSL dio como resultado una escisión exitosa de la proteína SARS-CoV-1 S purificada, lo que sugiere que el sistema experimental era factible. En particular, CTSL también escindió de manera eficiente la proteína S SARS-CoV-2 purificada de una manera dependiente de la dosis (Fig.4b). Para confirmar aún más la especificidad, se emplearon inhibidores de CTSL. Dado que ningún fármaco disponible actualmente inhibe específicamente CTSL, [26](#) se utilizaron dos compuestos que han demostrado tener actividad inhibitoria contra CTSL (E64d, un inhibidor de catepsina de amplio espectro, y SID26681509, un inhibidor de CTSL relativamente selectivo). La actividad de escisión de CTSL fue bloqueada por E64d y SID 26681509 (Fig. [4b](#)). Estos resultados indicaron que CTSL escindió eficientemente la proteína SARS-CoV-2 S en fragmentos más pequeños después de su escisión inicial por furina.

Figura 4



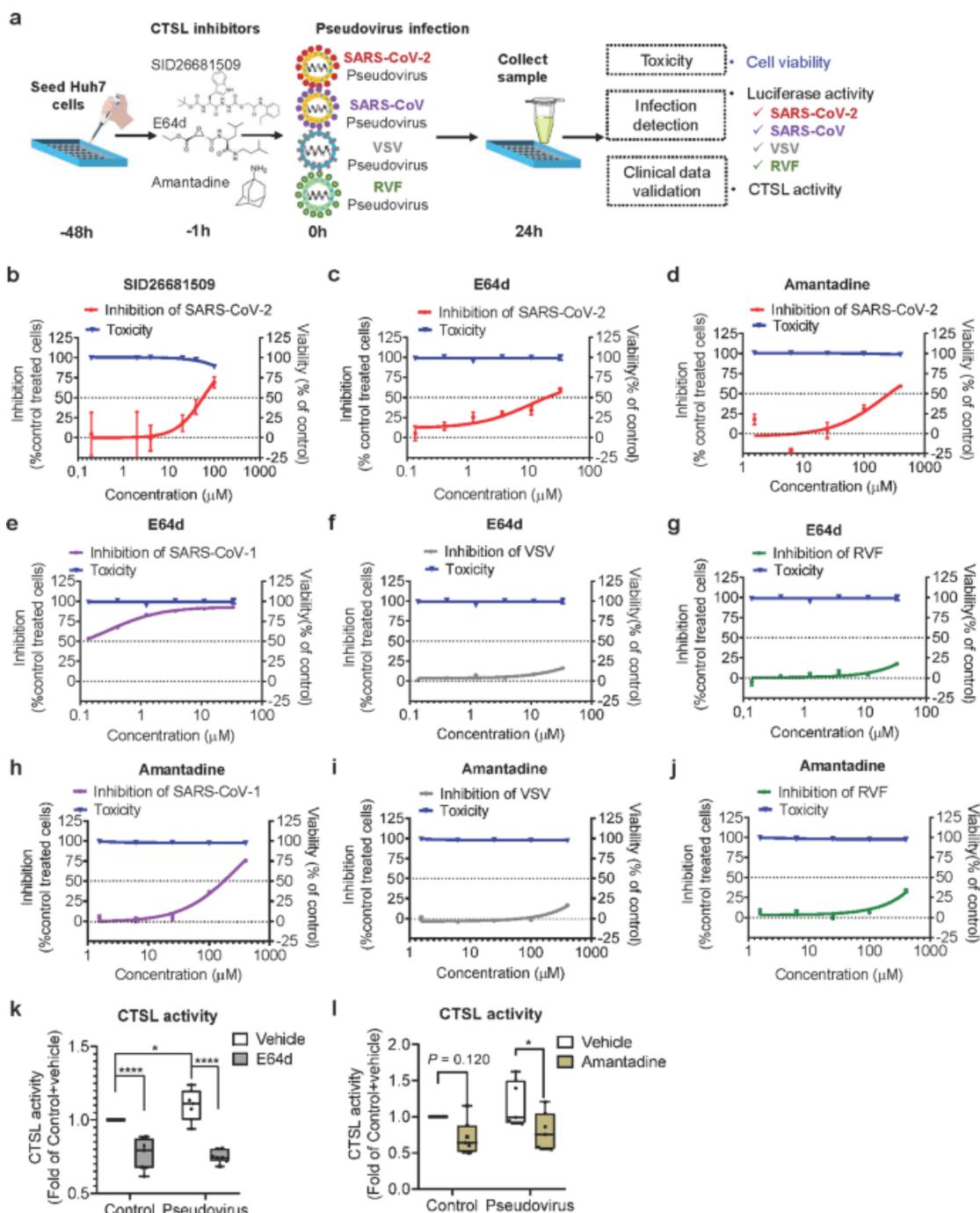
CTSL escinde la proteína del pico (S) del SARS-CoV-2, y esta escisión promueve la fusión célula-célula. **una** descripción general de los sitios de escisión de SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 S1/S2. FP (péptido de fusión), HR1 (repetición de heptada 1) y HR2 (repetición de heptada 2) son unidades de la subunidad S2 que funcionan en la fusión de membranas. **b** Análisis de la escisión de la proteína S mediada por CTSL. La proteína SARS-CoV-1 o SARS-CoV-2 S purificada se incubó en presencia o ausencia (tampón de ensayo, pH = 5,5) de CTSL (2 o 10 µg/ml en tampón de ensayo, pH = 5,5) a 37°C. °C durante 1 h. El sistema de reacción de 2 µg/ml de CTSL se complementó adicionalmente con inhibidores de CTSL (20 µM E64d o 20 µM SID 26681509), como se indica. Las proteínas se sometieron a SDS-PAGE y se detectaron mediante tinción con plata. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes. **c** Ensayo de formación de sincitios: las células Huh7 no se transfectaron (nulas) o se transfectaron con plásmido para expresar la proteína S del SARS-CoV-2. Las células se incubaron en presencia o ausencia (PBS, pH = 7,4) de tripsina (2 µg/ml en PBS, pH = 7,4) o en presencia o ausencia (PBS, pH = 5,8) de CTSL (2 o 4 µg/ml en PBS, pH = 5,8) durante 20 min. Las imágenes se adquirieron después de una incubación adicional de 16 h en el medio. (barras de escala, 50 µm). Las puntas de flecha negras indican sincitios. Se muestran datos representativos de siete experimentos independientes. **d** Análisis cuantitativo de sincitios en el panel **c**. $n = 7$. La significancia estadística se evaluó mediante ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey. Los datos se expresan como valores medios \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Para investigar si CTSL escinde funcionalmente la proteína S del SARS-CoV-2, realizamos un ensayo de fusión célula-célula mediante el registro de la formación de células gigantes multinucleadas (sincitio) impulsada por la proteína S del SARS-2. No se observaron sincitios sin expresión de proteína S, mientras que la expresión de SARS-2-S sola (tratada con PBS, pH = 7,4) dio como resultado la formación de sincitios. Tratamiento con tripsina (2 µg/ml en PBS, pH = 7,4), que ha demostrado que induce la fusión célula-célula mediada por proteína S [24-27](#) aumentó notablemente la formación de sincitios casi al doble. Además, en comparación con el tratamiento simulado (PBS, pH = 5,8), CTSL (en PBS, pH = 5,8) indujo, de forma dependiente de la dosis, un aumento en la formación de sincitios de hasta ~70 %. Estos datos indicaron que la actividad de CTSL, no las condiciones ácidas, fue responsable del aumento en la formación de sincitios (Fig. [4c, d](#)). Por lo tanto, estos resultados nos llevaron a concluir que CTSL escindió eficientemente la proteína S del SARS-CoV-2 y que esta escisión promovió la fusión célula-célula mediada por proteína S.

Los inhibidores de CTSL previenen la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 in vitro

Para confirmar aún más el papel de CTSL en la infección por SARS-CoV-2, las células Huh7 se trataron con inhibidores de CTSL, como se muestra en la Fig. [5a](#). Tanto SID 26681509 como E64d inhibieron significativamente la infección por pseudovirus SARS-CoV-2. Como E64d exhibió menos citotoxicidad que SID 26681509, se seleccionó para los experimentos posteriores (Fig. [5b, c](#)).

Figura 5



Los inhibidores de CTSL bloquean la entrada de células impulsadas por SARS-2-S in vitro. **un** esquema de la configuración del ensayo del inhibidor de CTSL. Las células Huh7 se pretrataron con diferentes fármacos 1 h antes de la infección con diferentes pseudovirus, como se indica, a la misma dosis ($1,3 \times 10^4$ TCID₅₀ /ml) . La infección por pseudovirus y la viabilidad celular se evaluaron mediante la actividad de luciferasa y el ensayo MTT, respectivamente. **b - d** Inhibición de la entrada de células impulsada por SARS-2-S por diferentes dosis de SID 26681509 (**b**), E64d (**c**) y amantadina (**d**) y viabilidad de las células tratadas con diferentes dosis de los medicamentos como se indica. $n = 4$. **e - g** Efectos de E64d en la infección por pseudovirus SARS-CoV-1 (**e**),

pseudovirus VSV (**f**) y pseudovirus RVF (**g**) y viabilidad de las células tratadas con diferentes dosis de E64d como se indica. $n = 4$. **h - j** Efectos de la amantadina sobre la infección por el pseudovirus SARS-CoV-1 (**h**), el pseudovirus VSV (**i**) y el pseudovirus RVF (**j**) y la viabilidad de las células tratadas con diferentes dosis de amantadina como se indica. $n = 4$. **k**, **l** Efectos del tratamiento previo con fármacos sobre la actividad de la enzima CTSL en células Huh7 con o sin infección por pseudovirus. Las células Huh7 se pretrataron con vehículo, E64d $30 \mu\text{M}$ (**k**) o amantadina $300 \mu\text{M}$ (**l**) durante 1 h y luego se infectaron con pseudovirus SARS-CoV-2 a una dosis de $1,3 \times 10^4 \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$. Las células no infectadas con pseudovirus se usaron como controles. $n = 7$. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como valores medios \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$

[imagen a tamaño completo](#)

Además, nos interesó descubrir que la amantadina, un agente profiláctico aprobado por la FDA de EE. UU. en 1968 para la influenza y más tarde para la enfermedad de Parkinson, suprime la transcripción del gen de *CTSL* . [19](#) A continuación, examinamos el impacto de la amantadina en la infección por SARS-CoV-2 y descubrimos que inhibió significativamente la infección por pseudovirus con poca citotoxicidad (Fig. [5d](#)). Además, tanto el E64d como la amantadina también previnieron significativamente el virus SARS-CoV-1 S-protein-driven pero no el VSV-G o el virus de la fiebre del valle del Rift (RVF) (un miembro de la familia de los bunyavirus que no requiere CTSL para ingresar a la célula.) [28](#)·[29](#) Infección por pseudovirus impulsada por proteína G (Fig. [5e-j](#)).

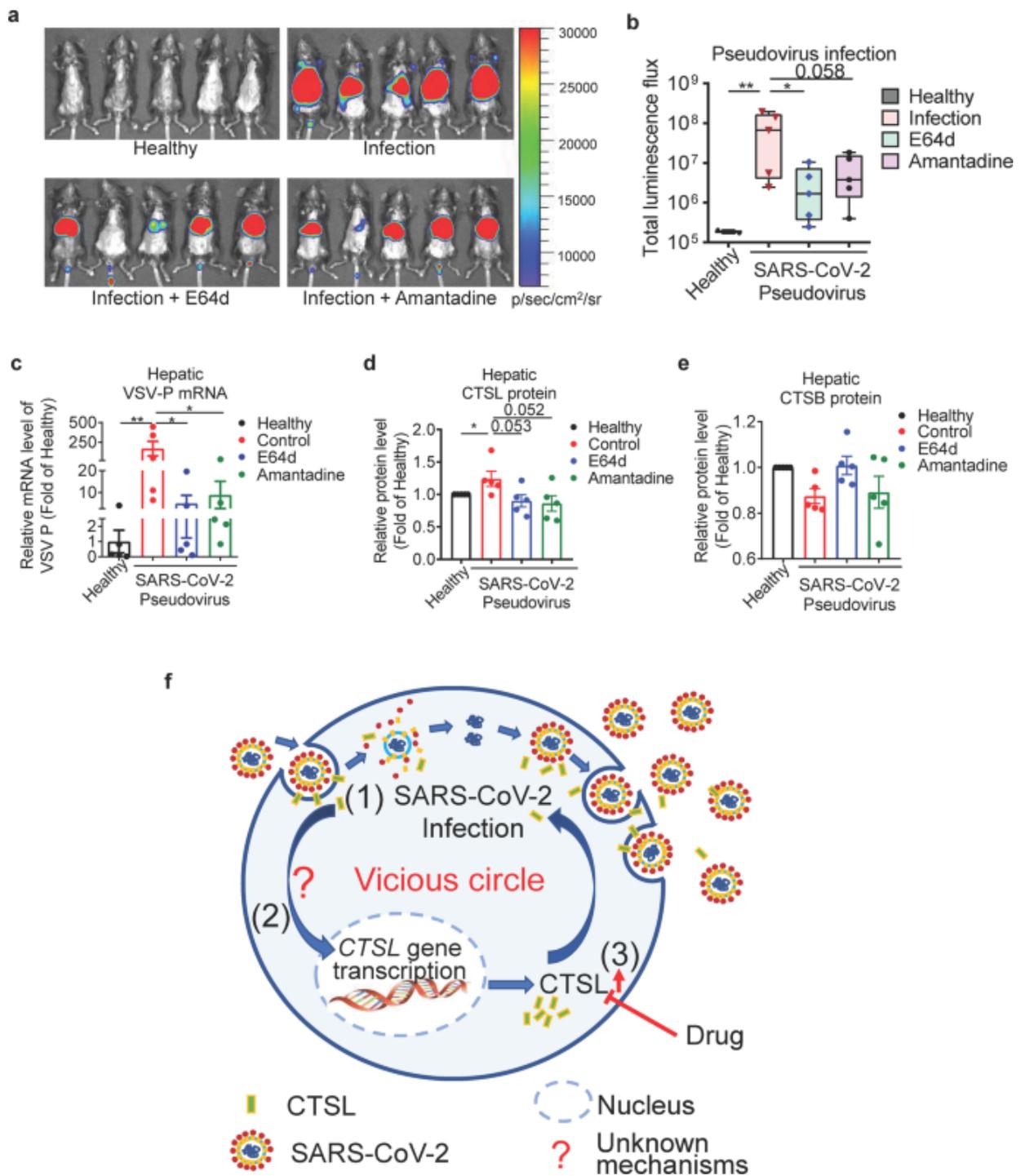
Finalmente, la actividad de la enzima CTSL se midió en células Huh7. El tratamiento con E64d (Fig. [5k](#)) y amantadina (Fig. [5l](#)) inhibió la actividad enzimática y bloqueó la activación de CTSL inducida por la infección por pseudovirus SARS-CoV-2. Estos resultados indicaron que los efectos terapéuticos tanto de E64d como de amantadina estaban mediados, al menos parcialmente, por la inhibición de la actividad de la enzima CTSL.

Los inhibidores de CTSL previenen la infección por pseudovirus en ratones humanizados

Para verificar aún más si la inhibición de CTSL puede prevenir la infección por pseudovirus in vivo, los efectos de E64d y amantadina en la prevención de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 se evaluaron en ratones mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI). Debido a que el

SARS-CoV-2 reconoce la proteína ACE2 humana, pero no la ACE2 de ratón o rata como receptor de entrada celular, [30](#) ratones humanizados *hACE2* : ratones modelo diseñados para expresar *hACE2* a través de la tecnología de inserción CRISPR/Cas9, como informamos anteriormente [31](#) — fueron empleados. El *hACE2* los ratones humanizados se dividieron al azar en cuatro grupos y se trataron con vehículo o con diferentes fármacos como se indica. La bioluminiscencia se midió y visualizó en pseudocolor como indicador de la gravedad de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2. Los ratones humanizados infectados con pseudovirus mostraron una señal de luminiscencia significativamente más alta que los ratones de control sanos, lo que indica que los ratones se infectaron con éxito (Fig. [6a, b](#)). En comparación con el tratamiento con vehículo, E64d previno significativamente la infección por pseudovirus SARS-CoV-2. La amantadina también mostró efectos supresores sobre la infección por pseudovirus, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,058$) (Fig. [6b](#)). El nivel de ARNm de VSV-P hepático aumentó notablemente en ratones humanizados después de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2, pero este aumento se suprimió significativamente mediante el pretratamiento con E64d o amantadina (Fig. [6c](#)), lo que indica que ambos medicamentos de hecho previnieron el SARS-CoV. -2 infección por pseudovirus.

Figura 6



Los inhibidores de CTSL previenen la infección por pseudovirus en ratones humanizados. Los ratones transgénicos *ACE2* humanos se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos y se pretrataron con vehículo o diferentes fármacos (E64d o amantadina) como se indica 2 días antes de la inoculación del virus mediante inyección en la vena de la cola ($1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ por ratón). Se usaron ratones sin inoculación de pseudovirus como grupo de control sano. La bioluminiscencia se midió 1 día después de la infección y se visualizó en pseudocolor. a Las intensidades relativas de la luz emitida se presentan como valores de flujo de fotones en fotones/(seg/cm²/sr) y se muestran como imágenes en pseudocolor, con

colores que van desde el azul (intensidad más baja) al rojo (intensidad más alta). **b** Infección por pseudovirus en cada grupo según lo indicado por los valores de flujo total. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. **c** Infección por pseudovirus según lo indicado por los niveles de ARNm de VSV-P en el hígado en cada grupo. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. **d** Niveles de proteína CTSL hepática en cada grupo. La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. **e** Niveles de proteína CTSB hepática en cada grupo. La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. **F** Mecanismo propuesto de acción de CTSL en la infección por SARS-CoV-2. (1) CTSL escinde la proteína SARS-2-S y libera el virus del endosoma. (2) SARS-CoV-2 promueve la transcripción del gen CTSL y la actividad enzimática a través de mecanismos desconocidos. (3) La regulación positiva de CTSL, a su vez, mejora la infección por SARS-CoV-2. $n = 5$. Los datos se expresan como valores medios \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

[imagen a tamaño completo](#)

En particular, el nivel de proteína de CTSL en el hígado aumentó significativamente en ratones infectados con SARS-CoV-2; este aumento se revirtió mediante el tratamiento con E64d o amantadina (Fig. [6d](#)), mientras que el nivel de CTSB no se vio afectado significativamente (Fig. [6e](#)). Los pulmones estaban levemente infectados por el pseudovirus SARS-CoV-2. En consecuencia, la tendencia de la elevación de CTSL estuvo presente, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. [5a, b](#) complementarias).

Discusión

Se ha demostrado que diversos virus, incluido el SARS-CoV-1, afectan la expresión de genes relacionados con la infección de la célula huésped. [32](#), [33](#), [34](#) Aquí, por primera vez, encontramos que la infección por SARS-CoV-2 promovió la expresión génica de CTSL tanto in vivo como in vitro, mientras que la sobreexpresión de CTSL, a su vez, mejoró la infección por pseudovirus en células humanas. Quedan por investigar los mecanismos detallados de este "círculo vicioso". Curiosamente, un estudio reciente también encontró que el SARS-CoV-2 puede explotar la regulación positiva de ACE2 impulsada por interferón para mejorar la infección, [35](#) lo que sugiere que la participación mecánica de otros genes relacionados con la infección en la infección por SARS-CoV-2 requiere una

mayor exploración. Sin embargo, CTSL sería un objetivo terapéutico prometedor para los inhibidores que no solo podrían inhibir la entrada del virus sino también bloquear el círculo vicioso (Fig. [6f](#)).

La infección de células con muchos tipos de virus depende de las proteasas específicas de la célula huésped. [36](#)·[37](#) Un estudio reciente sugirió que CTSL podría estar involucrado en la entrada del SARS-CoV-2 en las células HEK293 in vitro. [27](#) Sin embargo, falta evidencia clínica del papel de CTSL en la infección por SARS-CoV-2. Primero, no se había informado ninguna investigación de los niveles circulantes de CTSL en pacientes con COVID-19 antes de este estudio. En segundo lugar, la expresión tisular de CTSL aún no se ha investigado en la infección por SARS-CoV-2, aunque los niveles circulantes de CTSL pueden reflejar su perfil de expresión en muchos tejidos de órganos, como los tejidos vasculares. [38](#) En este estudio, primero analizamos el nivel circulante de CTSL en pacientes con COVID-19 y descubrimos que reflejaba con precisión la gravedad y el estado de COVID-19. Esta relación puede atribuirse a la expresión elevada de CTSL observada en células humanas infectadas con pseudovirus e hígados de ratón.

Estudios anteriores han sugerido que los inhibidores de CTSL previenen eficazmente la infección de muchos otros coronavirus, incluido el SARS-CoV-1, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el coronavirus humano (HCoV)-229E. [39](#), [40](#), [41](#) Se cree que CTSL es un objetivo potencial para el tratamiento de COVID-19, [19](#)·[20](#) aunque no se ha realizado ningún estudio sistemático. Estudios anteriores han indicado que la furina y TMPRSS2 también juegan un papel crucial en la infección por SARS-CoV-2. [3](#), [14](#)·[42](#) En este estudio, mostramos que CTSL escindió funcionalmente la proteína S del SARS-CoV-2 en fragmentos más pequeños. Esta escisión dio como resultado una mejora de hasta ~ 70% en la fusión célula-célula mediada por proteína S. CTSL mejoró de manera eficiente la infección por SARS-CoV-2, como lo demuestran nuestros datos de sobreexpresión y eliminación in vitro y los datos de inhibición in vivo. Además, la furina y TMPRSS2 escinden la proteína SARS-CoV-2 S en diferentes sitios de escisión. [14](#)·[42](#) Nuestros resultados indicaron que el sitio de escisión de CTSL era diferente al de la furina. También se ha informado que TMPRSS2 media la activación de ACE2 en la infección por SARS-CoV-1. [43](#) Por lo tanto, es razonable concluir que se requieren CTSL, TMPRSS2 y furin para la infección por SARS-CoV-2. Es importante ampliar la gama de objetivos terapéuticos para COVID-19, y los efectos de CTSL no deben subestimarse.

La pandemia de COVID-19 ha motivado los esfuerzos más inmensos hasta la fecha para identificar medicamentos que puedan reducir la morbilidad y la mortalidad de manera segura, rápida y efectiva. Centrarse en la reutilización de un medicamento con licencia para COVID-19 puede ser más eficiente que comenzar con un medicamento preclínico. Por lo tanto, se ha sugerido la reutilización de muchos medicamentos aprobados por la FDA para el COVID-19, por ejemplo, como se logró con los medicamentos antipalúdicos cloroquina (CQ) e hidroxiclороquina (HCQ) para la artritis reumatoide y con el medicamento contra la influenza amantadina para la enfermedad de Parkinson. [44](#) , [45](#)·[46](#)

La amantadina es un agente preventivo utilizado primero para la influenza y luego para la enfermedad de Parkinson. Solo tres informes de casos clínicos observacionales con un pequeño número de pacientes ($n \leq 15$ para todos) especularon que la amantadina puede usarse para el tratamiento de COVID-19, no se realizó ningún ensayo clínico sistemático en una población humana. [47](#) , [48](#)·[49](#) Algunos otros trabajos solo plantearon una hipótesis pero sin ningún experimento de validación. [50](#) , [51](#) En este estudio , investigamos sistemáticamente el papel de la amantadina en el tratamiento de la COVID-19 y descubrimos que la amantadina inhibía la actividad de la enzima CTSL en el contexto de la infección por el pseudovirus SARS-CoV-2. La amantadina inhibió significativamente la entrada de células SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 con poca citotoxicidad. Además, la amantadina mostró efectos anti-pseudovirus, con regulación a la baja de la expresión de CTSL, en ratones humanizados. Por lo tanto, la amantadina puede ser un fármaco terapéutico potente.

En conclusión, informamos que la infección por SARS-CoV-2 promovió la expresión de CTSL y la actividad enzimática, lo que, a su vez, mejoró la infección viral. CTSL escindió funcionalmente la proteína SARS-CoV-2 S y mejoró la entrada viral. Por lo tanto, CTSL es probablemente un objetivo terapéutico importante para COVID-19. Además, demostramos que la amantadina, un fármaco contra la influenza con licencia, inhibió significativamente la actividad de CTSL después de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 y previno la infección tanto in vitro como in vivo. Por lo tanto, nuestro estudio muestra que la amantadina u otros inhibidores de CTSL pueden ser una estrategia terapéutica potencial para la infección por SARS-CoV-2. En el futuro, se necesitan experimentos con virus SARS-COV-2 vivos y ensayos clínicos para investigar el papel de los inhibidores de CTSL en el tratamiento de COVID-19.

materiales y métodos

Declaración de aprobación ética

El estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Beijing Youan, Universidad Médica de la Capital y el Comité de Ética del Hospital Tongren de Beijing, Universidad Médica de la Capital.

Participantes y muestras clínicas

Los pacientes diagnosticados con COVID-19 y hospitalizados en el Hospital Youan de Beijing, Universidad Médica de la Capital del 21 de enero al 30 de abril de 2020, se inscribieron en este estudio. Todos los pacientes inscritos fueron confirmados como positivos para el ácido nucleico del SARS-CoV-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). El ensayo de RT-PCR se realizó según el protocolo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los criterios de diagnóstico y clasificación clínica y el plan de tratamiento (versión 7.0) de COVID-19 fueron lanzados por el Comité Nacional de Salud de China (<http://www.nhc.gov.cn/>). La clasificación clínica de la gravedad es la siguiente: (1) leve, con síntomas leves, las imágenes no muestran neumonía. (2) Moderada, con fiebre, síntomas del tracto respiratorio y las imágenes muestran neumonía. (3) Grave, cumple con cualquiera de los siguientes signos: dificultad respiratoria, frecuencia respiratoria ≥ 30 latidos/min; b en estado de reposo, saturación de oxígeno en los dedos ≤ 93 %) presión parcial de oxígeno en sangre arterial (PaO₂ /concentración de oxígeno (FiO₂) ≤ 300 mmHg (1 mmHg = 0,133 kPa). (4) Crítico, una de las siguientes condiciones: ocurre una insuficiencia respiratoria y requiere ventilación mecánica; b Se produce un choque; c Se requiere ingreso en la UCI por insuficiencia orgánica combinada. Los pacientes con COVID-19 experimentaron una media de 14 días de hospitalización (día 14) y fueron seguidos el día 14 (día 28) y el día 28 (día 42) después del alta hospitalaria. Las muestras de sangre se recolectaron poco después de la admisión al hospital (día 0) (para algunos pacientes que fueron trasladados desde otros hospitales, sus muestras de sangre se recolectaron poco después de la admisión en el hospital Beijing Youan) y los días 28 y 42.

Los datos demográficos, clínicos y de laboratorio se extrajeron del sistema electrónico de información hospitalaria mediante un formulario estandarizado.

Se reclutó un total de 125 voluntarios sanos del mismo sexo y edad en el Hospital Tongren de Beijing, Universidad Médica de la Capital. Los

criterios de inclusión son los siguientes: (1) 18 a 70 años de edad; (2) sin enfermedades subyacentes; (3) ningún uso a largo plazo de ningún medicamento; (4) dispuesto a participar en el estudio. Se recogieron muestras de sangre después de una noche de ayuno para la determinación de parámetros bioquímicos, concentraciones de CTSL y CTSB. Todas las mediciones bioquímicas han participado en el Programa de Evaluación de la Calidad del Ministerio de Salud de China.

Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Youan de Beijing, Universidad Médica de la Capital y la Comisión de Ética renunció al requisito de consentimiento informado.

Biomarcadores de fusión de membranas del virus

Las muestras de plasma de pacientes con COVID-19 recolectadas al ingreso (día 0), el día 14 después del alta (día 28) y el día 28 después del alta (día 42) se recolectaron y almacenaron a -80 °C dentro de las 2 h. Las muestras se analizaron utilizando ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) disponibles comercialmente siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron detectadas sin inactivación de virus para conservar los resultados originales en un laboratorio de bioseguridad P2+. La angiotensina (1-7) y la ACE2 se midieron con el kit Human Angiotensin (1-7) y Human ACE2 Elisa (Cloud-Clone Corp, Houston, Texas, EE. UU.) con límites de detección de <10 y 0,64 pg/ml, respectivamente. CTSL y CTSB se midieron utilizando el kit ELISA Human CTSL y Human CTSB (Elabscience, Houston, TX, EE. UU.) con límites de detección de 37,5 pg/ml y 0,1 ng/ml, respectivamente.

ratones experimentales

El estudio utilizó ratones transgénicos ACE2 humanos de 4 a 5 semanas de edad, un modelo de ratón que expresa ACE2 humano (hACE2) generado mediante el uso de la tecnología de inserción CRISPR/Cas9 como se informó anteriormente. [31](#) Los ratones hACE2 utilizados en este manuscrito eran ratones macho C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad, con un peso corporal entre 13 y 17 g. Y los ratones fueron validados en nuestro artículo anterior. [31](#) Todos los protocolos con animales fueron aprobados por el Comité de Revisión Ética del Instituto de Zoología de la Universidad Médica de la Capital, China.

Cultivo celular y reactivos

La línea celular de hepatoma humano Huh7, las células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano y las células HEK293T(293T)

humanas se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. suero bovino (FBS, Gibco, Carlsbad, CA), 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (Thermo Fisher Scientific). La línea celular de adenocarcinoma de pulmón Calu-3 humana se cultivó en medio mínimo esencial (Eagle) con L -glutamina 2 mM y BSS de Earle ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio 1,0 mM y 10% SFB. Todas las celdas se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 95 % de aire y 5 % de CO₂. E64d (Cat. No. HY-100229), SID 26681509 (Cat. No. HY-103353) y Amantadine (Cat. No. HY-B0402A) se adquirieron de Med Chem Express (MCE, NJ, EE. UU.). El plásmido de expresión de CTSL humano (pENTER-CTSL, Cat. No. CH807099, Pubmed ID: NM_001912) y el vector pENTER (Cat. No. PD88001) se adquirieron de Vigenebio Ltd (China).

pseudovirus

Los pseudovirus del SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, la fiebre del valle del Rift (RVF) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) se generaron con la incorporación de la proteína espiga del SARS-CoV-2 (SARS-2-S), SARS - Proteína espiga de CoV-1 (SARS-1-S), glicoproteína de unión de células huésped de RVF (RVF-G) y glicoproteína de unión de células huésped de VSV (VSV-G) en un sistema de pseudovirus basado en VSV. Los pseudovirus utilizados en el presente estudio han sido validados en estudios previos. [52](#) , [53](#) , [54](#) Para este sistema de pseudovirus basado en VSV, la columna vertebral la proporcionó el virus pseudotipado VSV-G (G*ΔG-VSV) que empaqueta casetes de expresión para luciferasa de luciérnaga en lugar de VSV-G en el genoma de VSV. [25](#) Por lo tanto, la actividad de luciferasa y el nivel de ARNm de fosfoproteína de VSV (VSV-P) se utilizaron como indicadores de infección por pseudovirus.

Ensayo de luciferasa

Las actividades de las luciferasas de luciérnaga se midieron en lisados celulares usando sustrato de luciferasa (Perkinelmer, BRITELITE PLUS 100 ml KIT, Cat. No. 6066761) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para placas de 96 pocillos, el sobrenadante del cultivo se aspiró suavemente para dejar 100 µl en cada pocillo; luego, se agregaron 100 µl de sustrato de luciferasa a cada pocillo. Dos minutos después de la incubación a 37 °C, se aspiraron 150 µl de lisado a un tubo EP estéril limpio de 1,5 ml para medir rápidamente la actividad de luciferasa de luciérnaga para cada pocillo utilizando un luminómetro (Turner BioSystems) como se describió anteriormente. [55](#)

Selección de línea celular

Las células Huh7, 293T, A549 y Calu-3 se sembraron en placas de 48 pocillos, respectivamente, y se infectaron con diferentes dosis de pseudovirus SARS-CoV-2 (a partir de 0 a $1,3 \times 10^4$ TCID₅₀ /ml). Las células se cultivaron durante otras 24 h antes del análisis de actividad de luciferasa. Células sin la adición de pseudovirus como control celular. Se seleccionó la línea celular más susceptible para experimentos posteriores.

Verificación de datos clínicos in vitro

Para verificar los datos clínicos, las células Huh7 se sembraron en placas de 48 pocillos y se les permitió adherirse hasta que las células tuvieran una confluencia de alrededor del 70 %, seguido de la infección con diferentes dosis de pseudovirus SARS-CoV-2 (a partir de 0 a $1,3 \times 10^4$ DICT₅₀ /ml). Después de 24 h de incubación, las células se lisaron para el análisis de la actividad de luciferasa de luciérnaga, el ARNm de VSV-P y la detección de CTSL y CTSB mediante ensayos ELISA.

Escisión de la proteína SARS-CoV-2 S por CTSL

El dominio extracelular purificado de la proteína S del SARS-CoV-2 (YP_009724390.1. Sino Biological, Cat. No. 40589-V08B1) y la proteína S del SARS-CoV (NP_828851.1. Sino Biological, Cat. No. 40634-V08B) se adquirieron de Sino Biological (China). Se incubó un microgramo de cada proteína con 2 o 10 µg/ml de CTSL (Sigma-Aldrich, Cat. No. SRP0291) en tampón de ensayo (acetato de sodio 400 mM, pH 5,5, con EDTA 4 mM y DTT 8 mM) durante 1 hora a 37 °C. CTSL se preactivó a 30 °C durante 1 min antes de su uso. Cuando se indique, se agregaron 20 µM de E64d o 20 µM de SID 26681509 en el sistema de reacción con 0,5 µg de proteína SARS-CoV-2 S y 2 µg/ml de CTSL. A continuación, las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se analizaron mediante tinción con plata (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 24612).

Ensayo de formación de sincitio

Las células Huh7 se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con plásmidos de expresión de proteína S del SARS-CoV-2 (Sino Biological, Cat. No. VG40589-CF) (0,65 µg/pocillo) usando el reactivo Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Las soluciones de transfección se cambiaron a medio de cultivo estándar 6 horas después de la transfección y las células se incubaron durante 12 horas adicionales. A continuación, las células se trataron en ausencia (PBS, pH = 7,4) o presencia de 2 µg/ml de tripsina (Sigma-Aldrich) (en PBS, pH =

7,4), o en ausencia (PBS, pH = 5,8) o presencia de 2 o 4 µg/ml de CTSL (Sigma-Aldrich) (en PBS, pH = 5,8) durante 20 min a 37 °C. Luego, las soluciones se cambiaron a un medio de cultivo estándar y las células se incubaron adicionalmente durante 16 h.

Eliminación de CTSL por siRNA y sobreexpresión por plásmido in vitro

Para la eliminación de CTSL, las células Huh7 se sembraron en placas de 48 pocillos y se transfectaron con siRNA 50 nM o 100 nM contra homo CTSL mRNA (si-CTSL) o siRNA de control negativo 50 nM (revuelto) usando el reactivo Lipofectamine 3000. Para la sobreexpresión de CTSL, las células Huh7 se sembraron en placas de 48 pocillos y se transfectaron con 0,2 µg o 0,4 µg de plásmido de expresión de CTSL humano (pENTER-CTSL, pCTSL) o 0,2 µg de plásmido de control (pENTER-vector, Con). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron para el análisis de los niveles de ARNm de CTSL y CTSB para evaluar la eficacia de si-CTSL y pCTSL. Para evaluar el efecto de CTSL en la entrada de SARS-CoV-2, se sembraron células Huh7 en placas de 48 pocillos y se transfectaron con si-CTSL o pCTSL en las mismas condiciones indicadas anteriormente. Veinticuatro horas después de la transfección, el medio se reemplazó con medio fresco. ⁴ TCID₅₀ / ml) y se cultivaron durante otras 24 h antes de la actividad de la luciferasa de luciérnaga y el análisis del ARNm de VSV-P. Las secuencias de siRNA se proporcionaron en la Tabla complementaria [6](#).

Efecto del tratamiento farmacológico en la entrada de SARS-CoV-2 in vitro

La actividad anti-SARS-CoV-2 de SID 26681509, E64d y amantadina se realizó en placas de 96 pocillos mediante la cuantificación de la actividad de luciferasa de luciérnaga. Las células Huh7 se pretrataron con diferentes concentraciones de fármaco o la cantidad equivalente de solvente durante 1 hora y luego se infectaron con pseudovirus SARS-CoV-2 ($1,3 \times 10^4$:TCID₅₀ /ml) en un ambiente con 5 % de CO₂ a 37 °C durante 24 h antes del análisis de actividad de luciferasa de luciérnaga. En detalle, las concentraciones de diferentes fármacos son las siguientes: SID 26681509 (0,2, 2, 4, 20, 40 y 100 µM), E64d (0,14, 0,42, 1,23, 3,7, 11,1 y 33,3 µM) y amantadina (1,56, 6,25, 25, 100, 400 y 1600 µM).

Ensayo de viabilidad celular

Los efectos de SID 26681509, E64d y amantadina sobre la viabilidad celular se midieron mediante ensayo MTT. Las células Huh7 se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de $0,5 \times 10^4$ por pocillo y se dejó adherir hasta que las células tuvieran una confluencia de aproximadamente el 70 %, seguido de un tratamiento con

diferentes concentraciones de fármacos o la cantidad equivalente de disolvente durante 24 h. Las concentraciones de diferentes fármacos se detallaron anteriormente. Células sin ningún tratamiento como control en blanco. Después de los tratamientos, se añadió MTT al medio de cultivo hasta la concentración final de 0,5 mg/ml y luego las células se incubaron durante 4 h a 37 °C en una incubadora. Después de retirar el medio de cultivo, las células se lisaron rotando suavemente en 200 µl de DMSO durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia a 570 nm se midió utilizando un lector de placas automático. La absorbancia promedio reflejó la viabilidad celular con los datos normalizados al grupo de control en blanco. Los experimentos se realizaron por quintuplicados y se repitieron al menos tres veces.

experimentos con animales

La actividad anti-SARS-CoV-2 de E64d y amantadina se realizó en ratones transgénicos ACE2 humanos mediante un ensayo de imágenes bioluminiscentes (BLI) como antes. Se trataron [56 ratones con E64d \(12,5 mg/kg de peso corporal\) o amantadina \(50 mg/kg de peso corporal\) o la cantidad equivalente de disolvente una vez al día por vía intraperitoneal \(IP\) 2 días antes de la inoculación del virus.](#) Luego, a los ratones se les inyectó 1.5×10^6 TCID₅₀ SARS-CoV-2 pseudovirus por ratón mediante inyección en la vena de la cola (1 ml por ratón). Los ratones pretratados con disolvente de fármaco pero sin inoculación de pseudovirus sirvieron como grupo de control sano. La bioluminiscencia se midió 1 día después de la infección y se visualizó en pseudocolor. Finalmente, los ratones se sacrificaron para el análisis experimental inmediatamente después de la medición de la bioluminiscencia.

Extracción de ARN y PCR en tiempo real

El ARN total se extrajo de células cultivadas o hígados de ratón utilizando un kit de tejido puro de preparación de ARN (Tiangen), y la transcripción inversa se realizó con el kit de síntesis de ADNc de primera hebra RevertAid™ (Fermentas K1622) según el fabricante. A continuación, se realizó la qPCR en tiempo real en el sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 96 (Roche) utilizando el reactivo SYBR Green I Master Mix (Roche) con los cebadores y utilizando GAPDH como gen de mantenimiento. Todas las secuencias de cebadores para ensayos de PCR cuantitativos se enumeran en la Tabla [7](#) complementaria .

Análisis de la actividad CTSL

Las actividades de CTSL de células Huh7 infectadas con control o pseudovirus en presencia de vehículo o de diferentes fármacos, como se

indica, se midieron utilizando un kit disponible en el mercado (ab65306) según el fabricante.

análisis estadístico

Los datos clínicos se expresaron como mediana (rango intercuartílico (RIC)) o porcentaje, según correspondiera. La comparación de datos continuos entre grupos se determinó mediante la prueba *U de Mann-Whitney*. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas, según correspondiera. Para explorar los factores de riesgo asociados a la gravedad se utilizaron modelos de regresión logística univariados y multivariados. Se utilizó la prueba rho de Spearman (dos colas) para analizar las correlaciones no paramétricas de los parámetros relacionados con la infección por SARS-CoV-2 y la gravedad de la enfermedad. *Para el análisis estadístico se utilizaron el software SPSS para Windows 17.0 y Graphpad prism 7.0, con una significación estadística establecida en $P < 0,05$ bilateral.*

Disponibilidad de datos

Los datos que respaldan los hallazgos de este estudio están disponibles del autor correspondiente a pedido razonable.

Referencias

1. Dos Santos, WG Impacto de la variabilidad genética del virus y la inmunidad del huésped para el éxito de las vacunas COVID-19. *Farmacéutico de Biomedicina. = Biomedicina farmacoterapéutica* **136** , 111272 (2021).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

2. Sanders, JM, Monogue, ML, Jodlowski, TZ & Cutrell, JB Tratamientos farmacológicos para la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): una revisión. *Mermelada. Medicina. Asoc.* **323** , 1824–1836 (2020).

[Artículo CAS Google Académico](#)

3. Hoffmann, M. et al. La entrada de células SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de proteasa clínicamente probado. *Celda* **181** , 271–280 e278 (2020).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

4. Yang, JK et al. Interacciones entre genes relacionados del sistema renina-angiotensina asociados con la diabetes tipo 2. *Diabetes Care* **33** , 2271–2273 (2010).

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

5. Niu, MJ, Yang, JK, Lin, SS, Ji, XJ y Guo, LM La pérdida de la enzima convertidora de angiotensina 2 conduce a una alteración de la homeostasis de la glucosa en ratones. *Endocrino* **34** , 56–61 (2008).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

6. Fang, HJ & Yang, JK Patrón específico de tejido de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 en páncreas de rata. *J. Int. Medicina. Res.* **38** , 558–569 (2010).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

7. Cao, X. et al. La enzima convertidora de angiotensina 2/angiotensina-(1-7)/eje Mas activa la señalización de Akt para mejorar la esteatosis hepática. *ciencia Rep.* **6** , 21592 (2016).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

8. Cao, X. et al. La enzima convertidora de angiotensina 2 inhibe la vía asociada al estrés del retículo endoplásmico para preservar la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **35** , E3123 (2019).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

9. Cao, X., Yang, FY, Xin, Z., Xie, RR & Yang, JK El eje ACE2/Ang-(1-7)/Mas puede inhibir la resistencia a la insulina hepática. *Mol. Endocrinol celular.* **393** , 30–38 (2014).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

10. Hussain, A., Bhowmik, B. & do Vale Moreira, NC COVID-19 y diabetes: conocimiento en progreso. *Diabetes Res. clin. Pr.* **162** , 108142 (2020).

[Artículo CAS Google Académico](#)

11. Millet, JK & Whittaker, GR Entrada en la célula huésped del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio después de la activación de dos pasos mediada por furina de la proteína espiga. *Proc. Academia Nacional. ciencia EE . UU.* **111** , 15214 –15219 (2014).

[Artículo PubMed CAS Centro de PubMed Google Académico](#)

12. Simmons, G. et al. Diferentes proteasas de células huésped activan la proteína de punta del SARS-coronavirus para la fusión célula-célula y virus-célula. *Virología* **413** , 265–274 (2011).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

13. Sjoberg, M., Lindqvist, B. y Garoff, H. La activación de la proteína del pico del alfavirus es suprimida por el E3 unido. *J. Virol.* **85** , 5644–5650 (2011).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

14. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. y Pohlmann, S. Un sitio de escisión multibásico en la proteína espiga del SARS-CoV-2 es esencial para la infección de las células pulmonares humanas. *Mol. Celda* **78** , 779–784 e775 (2020).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

15. Fujishima, A. et al. La estructura cristalina de la catepsina L humana complejada con E-64. *FEBS Lett.* **407** , 47–50 (1997).

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

16. Gomes, CP et al. Catepsina L en COVID-19: de las evidencias farmacológicas a la genética. *Frente. Célula. Infectar. Microbiol.* **10** , 589505 (2020).

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

17. Simmons, G. et al. Los inhibidores de la catepsina L previenen la entrada del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *Proc. Academia Nacional. ciencia EE . UU.* **102** , 11876–11881 (2005).
-

[Artículo PubMed CAS Centro de PubMed Google Académico](#)

18. Huang, IC et al. El coronavirus del SARS, pero no el coronavirus humano NL63, utiliza catepsina L para infectar células que expresan ACE2. *J. Biol. química* **281** , 3198–3203 (2006).
-

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

19. Smieszek, SP, Przychodzen, BP y Polymeropoulos, MH La amantadina interrumpe la expresión del gen lisosomal: una hipótesis para el tratamiento con COVID19. *En t. J. Antimicrobiano. Agentes* **55** , 106004 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

20. Liu, T., Luo, S., Libby, P. & Shi, GP Inhibidores selectivos de catepsina L: un tratamiento potencialmente prometedor para pacientes con COVID-19. *Farmacol. El r.* **213** , 107587 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

21. Madjid, M., Safavi-Naeini, P., Solomon, SD y Vardeny, O. Efectos potenciales de los coronavirus en el sistema cardiovascular: una revisión. *JAMA Cardiol.* **5** , 831–840 (2020).
-

[Artículo PubMed Google Académico](#)

22. Gupta, A. et al. Manifestaciones extrapulmonares de la COVID-19. *Nat. Medicina.* **26** , 1017–1032 (2020).
-

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

23. Zhou, P. et al. Un brote de neumonía asociado a un nuevo coronavirus de probable origen murciélago. *Naturaleza* **579** , 270 – 273 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

24. Bosch, BJ, Bartelink, W. & Rottier, PJ La catepsina L escinde funcionalmente la proteína de fusión de clase I del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo corriente arriba en lugar de adyacente al péptido de fusión. *J. Virol.* **82** , 8887–8890 (2008).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

25. Nie, J. et al. Establecimiento y validación de un ensayo de neutralización de pseudovirus para SARS-CoV-2. *emergente Los microbios infectan.* **9**, 680 –686 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

26. Dana, D. & Pathak, SK Una revisión de inhibidores de moléculas pequeñas y sondas funcionales de catepsina L humana. *Moléculas* **25**, 698 (2020).
-

[Artículo Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

27. Ou, X. et al. Caracterización de la glicoproteína espiga del SARS-CoV-2 en la entrada del virus y su reactividad cruzada inmune con el SARS-CoV. *Nat. común* **11**, 1620 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

28. Hofmann, H. et al. La fiebre grave con glicoproteínas del virus de la trombocitopenia son el objetivo de los anticuerpos neutralizantes y pueden usar DC-SIGN como un receptor para la entrada dependiente del pH en las líneas celulares humanas y animales. *J.Virol.* **87**, 4384–4394 (2013).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

29. Spiegel, M., Plegge, T. & Pohlmann, S. El papel de las glicoproteínas de phlebovirus en la entrada, ensamblaje y liberación viral. *Virus* **8**, 202 (2016).
-

[Artículo Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

30. Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, RS y Li, F. Reconocimiento de receptores por el nuevo coronavirus de wuhan: un análisis basado en estudios estructurales de una década de duración del coronavirus del SARS. *J.Virol.* **94**, E00127–20 (2020).
-

[PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

31.Sol, SH et al. Un modelo de ratón de infección y patogénesis por SARS-CoV-2. *Microbio huésped celular* **28** , 124 -133 e124 (2020).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

32.Peng, X. et al. Firmas únicas de expresión larga de ARN no codificante en respuesta a la infección por virus y señalización inmunitaria innata alterada. *mBio* **1** , e00206-10 (2010).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

33.Dinan, AM et al. Análisis comparativo de la expresión génica en cepas virulentas y atenuadas del virus de la bronquitis infecciosa en resolución de subcodón. *J.Virol.* **93** , E00714-19 (2019).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

34.Zhang, Q., Chen, CY, Yedavalli, VS & Jeang, KT El ARN no codificante largo de NEAT1 y los cuerpos paramoteados modulan la expresión postranscripcional del VIH-1. *mBio* **4** , e00596-00512 (2013).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

35.Ziegler, CGK et al. El receptor ACE2 del SARS-CoV-2 es un gen estimulado por interferón en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas y se detecta en subconjuntos celulares específicos en todos los tejidos. *Celda* **181** , 1016-1035 e1019 (2020).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

36.Sakai, K. et al. La proteasa huésped TMPRSS2 juega un papel importante en la replicación in vivo de los virus H7N9 emergentes y de la influenza estacional. *J.Virol.* **88** , 5608-5616 (2014).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

37.Reinke, LM et al. Diferentes residuos en la proteína del pico del SARS-CoV determinan la escisión y la activación por parte de la proteasa de la célula huésped TMPRSS2. *PLoS ONE* **12** , e0179177 (2017).

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

- 38.Liu, J. et al. Expresión y regulación de catepsina L en aneurisma aórtico abdominal humano, aterosclerosis y células vasculares. *Atherosclerosis* **184** , 302–311 (2006).
-

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

- 39.Zhou, N. et al. Los antibióticos glicopéptidos inhiben potentemente la catepsina L en el endosoma/lisosoma tardío y bloquean la entrada del virus del ébola, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV). *J. Biol. química* **291** , 9218–9232 (2016).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

- 40.Shah, PP et al. Un inhibidor de oxocarbazato de molécula pequeña de la catepsina L humana bloquea el síndrome respiratorio agudo severo y la infección por el virus pseudotipo ébola en células 293T de riñón embrionario humano. *Mol. Farmacia* **78** , 319–324 (2010).
-

[Artículo CAS Google Académico](#)

- 41.Bertram, S. et al. TMPRSS2 activa el coronavirus humano 229E para la entrada en la célula huésped independiente de la catepsina y se expresa en células diana virales en el epitelio respiratorio. *J.Virol.* **87** , 6150–6160 (2013).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

- 42.Bestle, D. et al. TMPRSS2 y la furina son esenciales para la activación proteolítica del SARS-CoV-2 en las células de las vías respiratorias humanas. *Ciencias de la vida Alianza* **3** , e202000786 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

- 43.Heurich, A. et al. TMPRSS2 y ADAM17 escinden ACE2 de manera diferencial y solo la proteólisis por TMPRSS2 aumenta la entrada impulsada por la proteína del pico del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *J.Virol.* **88** , 1293–1307 (2014).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

44. Gautret, P. et al. Hidroxicloroquina y azitromicina como tratamiento de COVID-19: resultados de un ensayo clínico abierto no aleatorizado. *En t. J. Antimicrobiano. Agentes* **56** , 105949 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

45. Mitja, O. & Clotet, B. Uso de medicamentos antivirales para reducir la transmisión de COVID-19. *Globo de Lancet. Salud* **8** , e639–e640 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

46. Ballout, RA, Sviridov, D., Bukrinsky, MI & Remaley, AT El lisosoma: una coyuntura potencial entre la infectividad del SARS-CoV-2 y la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, con implicaciones terapéuticas. *FASEBJ.* **34** , 7253–7264 (2020).
-

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

47. Rejdak, K. & Grieb, P. Los adamantanes podrían proteger contra la COVID-19 en pacientes con enfermedades neurológicas: esclerosis múltiple, parkinsonismo y deterioro cognitivo. *Mult. Escler. Relativo Desorden.* **42** , 102163 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

48. Aranda-Abreu, G., Aranda-Martínez, J. & Araújo, R. Uso de amantadina en un paciente con SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* **93** , 110 – 111 (2020).
49. Aranda-Abreu, G. et al. Estudio observacional de personas infectadas por SARS-Cov-2, tratadas con amantadina. *Farmacol. Rep.* **72** , 1538–1541 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

50. Araujo, R., Aranda-Martinez, JD & Aranda-Abreu, GE Tratamiento con amantadina para personas con COVID-19. *Arco. Medicina. Res.* **51** , 739–740 (2020).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

51. Cortes Borra, A. ¿La amantadina tiene efecto protector frente al COVID-19? *Neurología y neurocirugía Pol.* **54**, 284–285 (2020).
-

[Artículo Google Académico](#)

52. Whitt, MA Generación de pseudotipos de VSV utilizando DeltaG-VSV recombinante para estudios sobre la entrada de virus, identificación de inhibidores de entrada y respuestas inmunitarias a las vacunas. *J. Virol. Métodos* **169**, 365–374 (2010).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed CAS Google Académico](#)

53. Lv, Z. et al. Base estructural para la neutralización de SARS-CoV-2 y SARS-CoV por un potente anticuerpo terapéutico. *Ciencia* **369**, 1505–1509 (2020).
-

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

54. Chen, RF et al. Características de neutralización de diferentes genotipos y variantes del virus del síndrome de trombocitopenia febril. *Barbilla. J. Microbiol. inmunol.* **40**, 607–615 (2020).
-

[Google Académico](#)

55. Yang, W. et al. NFE2 induce miR-423-5p para promover la gluconeogénesis y la hiperglucemia al reprimir la vía hepática FAM3A-ATP-Akt. *Diabetes* **66**, 1819–1832 (2017).
-

[Artículo PubMed CAS Google Académico](#)

56. Zhang, L. et al. Un modelo de ratón de imágenes bioluminiscentes para el virus de Marburg basado en un sistema de pseudovirus. *Tararear. Inmunotra vacuna.* **13**, 1811–1817 (2017).
-

[Artículo PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

57. Zhao, M.-M. et al. La catepsina L desempeña un papel clave en la infección por SARS-CoV-2 en humanos y ratones humanizados y es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos. Preimpresión en

[Descargar referencias](#)

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por subvenciones del Programa Nacional de Investigación y Desarrollo Clave de China (2017YFC0909600) y la Fundación Nacional de Ciencias Naturales de China (81930019, 8151101058, 81471014), Proyecto Científico de la Comisión Municipal de Ciencia y Tecnología de Beijing (D171100002817005), Administración Municipal de Hospitales de Beijing Clinical Medicine Development of Special Funding Support ([ZYLX201823](#)) para JKY [57](#)

Información del autor

Notas del autor

1. Estos autores contribuyeron por igual: Miao-Miao Zhao, Wei-Li Yang, Fang-Yuan Yang, Li Zhang

Autores y Afiliaciones

- 1. Departamento de Endocrinología, Hospital Tongren de Beijing, Universidad Médica Capital, Beijing, China**
Miao-Miao Zhao, Wei-Li Yang, Fang-Yuan Yang y Jin-Kui Yang
- 2. División de Vacunas contra el VIH/SIDA y los Virus de Transmisión Sexual, Instituto para el Control de Productos Biológicos, Institutos Nacionales para el Control de Alimentos y Medicamentos (NIFDC), Beijing, China**
Li Zhang, Wei-Jin Huang y You-Chun Wang
- 3. Departamento de Ciencia y Tecnología, Hospital Youan de Beijing, Universidad Médica Capital, Beijing, China**
Wei Hou, Rong-Hua Jin y Ying-Mei Feng
- 4. División de Investigación de Modelos Animales, Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio, Institutos Nacionales para el Control de Alimentos y Medicamentos, Beijing, China**
Fanático de Chang Fa

Contribuciones

J.-KY concibió la idea del estudio, apoyó el estudio, diseñó los experimentos y escribió el artículo. M.-MZ y W.-LY diseñaron, realizaron los experimentos y escribieron la primera versión del artículo. F.-YY y LZ diseñaron y realizaron los experimentos. W.-JH, WH, C.-FF y R.-HJ realizaron parcialmente los experimentos. Y.-MF y Y.-CW ayudaron con la

interpretación de los resultados, el diseño de experimentos y la prueba del artículo.

Autores correspondientes

Correspondencia con [Ying-Mei Feng](#) , [You-Chun Wang](#) o [Jin-Kui Yang](#) .

Declaraciones de ética

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Información suplementaria

[Datos complementarios R1](#)

Derechos y permisos

Acceso abierto Este artículo tiene una licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0, que permite el uso, el intercambio, la adaptación, la distribución y la reproducción en cualquier medio o formato, siempre que se otorgue el crédito correspondiente al autor o autores originales y a la fuente. proporcionar un enlace a la licencia Creative Commons e indicar si se realizaron cambios. Las imágenes u otro material de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito al material. Si el material no está incluido en la licencia Creative Commons del artículo y su uso previsto no está permitido por la regulación legal o excede el uso permitido, deberá obtener el permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> .

[Reimpresiones y permisos](#)

Acerca de este artículo

Citar este artículo

Zhao, MM., Yang, WL., Yang, FY. *et al.* La catepsina L desempeña un papel clave en la infección por SARS-CoV-2 en humanos y ratones humanizados y es un objetivo prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos. *Sig*

Transduct Target Ther **6** , 134 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00558-8>

[Descargar cita](#)

- Recibió 03 diciembre 2020
- Revisado 02 febrero 2021
- Aceptado 20 febrero 2021
- Publicado 27 marzo 2021
- DOI <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00558-8>

Comparte este artículo

Cualquier persona con la que compartas el siguiente enlace podrá leer este contenido: