

EXPRESIÓN DE LA PROTEASA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN LA CEPA ROSETTA DE ESCHERICHIA COLI

AUTORES:

JJ Barrazaa^a, MR Montes^{a,b}, SE Faraja^{a,b}, CV Filomatori^{a,b}^a Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Química Biológica. Buenos Aires, Argentina. ^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini" (IQIFIB). Buenos Aires, Argentina.<https://doi.org/10.55634/3.3.1>

RESUMEN

Las proteasas virales desempeñan un papel crucial durante el ciclo replicativo de diversos virus, lo que las convierte en blancos clave para el diseño de fármacos antivirales.

En este trabajo, describimos el desarrollo y la optimización de un ensayo in vitro para medir la actividad enzimática de la proteasa del virus chikungunya.

Para este ensayo, fue preciso disponer de la proteasa viral recombinante y de un sustrato sintético que imita uno de los sitios de corte naturales.

La expresión de ambas proteínas se realizó utilizando la cepa Rosetta de Escherichia coli, la cual está optimizada para mejorar la expresión de proteínas que contienen codones raros. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad y permitió obtener ambas proteínas en forma pura y con alto rendimiento.

Los experimentos de validación mostraron que el ensayo de actividad enzimática es robusto, cuantitativo y nos permite seguir la actividad enzimática en el tiempo.

Nuestros resultados destacan el potencial de este método como herramienta para la caracterización de nuevos compuestos antivirales contra el virus chikungunya, y pueden servir en el desarrollo de ensayos para estudiar otras proteasas virales.

PALABRAS CLAVE: Virus chikungunya, Proteasa viral, Test actividad, Cepa Rosetta

INTRODUCCIÓN

El virus Chikungunya (CHIKV) es un patógeno transmitido a humanos por la picadura de mosquitos vectores del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (1) (1).

Las personas infectadas presentan diversos síntomas que incluyen debilidad muscular, fiebre, mialgia, erupción cutánea y dolor articular (2, 3).

Aunque rara vez provoca la muerte, el dolor articular puede durar meses o años, o bien convertirse en un dolor crónico, causa de discapacidad para algunas personas.

A pesar de que este virus fue identificado en la década de 1950, se considera reemergente debido a la presencia de casos en regiones donde anteriormente no se habían reportado (4-7).

Durante las primeras décadas del siglo XXI se informaron casos de CHIKV en todos los continentes, excepto en la Antártida.

Según la Organización Panamericana de Salud, en el período 2023-2024 se reportaron en América 810.684 casos (8).

El aumento de la prevalencia de la enfermedad, los recurrentes e imprevisibles brotes epidémicos y la falta de inmunidad preexistente hacen que el CHIKV sea una amenaza significativa a la salud mundial.

Sin embargo, aún no se dispone de tratamientos específicos para la enfermedad, por lo que los síntomas son tratados principalmente con analgésicos y drogas antiinflamatorias (2).

El CHIKV presenta un genoma compacto de ARN que codifica para proteínas esenciales para el virus, entre éstas las que forman parte del complejo de replicación viral (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) (9).

Se sabe que estas proteínas se sintetizan como una poliproteína inmadura que es escindida por la cisteína proteasa viral (nsP2), la cual libera secuencialmente las proteínas virales individuales (10).

Al ser una enzima exclusivamente viral y esencial para la replicación, las proteasas virales son el blanco de elección para el diseño de agentes antivirales específicos.

El objetivo de nuestro trabajo es desarrollar un método sencillo que permita medir la actividad enzimática de la proteasa nsP2 de CHIKV. Para esto, se requiere expresar y purificar tanto la enzima, como su sustrato.

La cepa Rosetta es una variante modificada de *E. coli* que se utiliza para la expresión de proteínas heterólogas.

Está diseñada para mejorar la expresión de proteínas que contienen codones raros, ya que posee genes que codifican para tRNAs específicos.

Esto ayuda a optimizar la traducción y a obtener una mayor cantidad de la proteína deseada en comparación con otras cepas de *E. coli*.

En este trabajo, utilizamos la cepa Rosetta para expresar la proteasa nsP2 y un sustrato de diseño que contiene uno de los sitios de corte naturales.

Siguiendo técnicas de cromatografía de afinidad, logramos obtener en forma pura y con alto rendimiento ambas proteínas.

Utilizando estas proteínas, pusimos a punto un ensayo sencillo y económico para medir la actividad enzimática, basado en la resolución de los productos de reacción en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Los ensayos *in vitro* de actividad enzimática se utilizan ampliamente para evaluar compuestos antivirales, por lo que nuestro desarrollo podría proporcionar una herramienta valiosa para identificar nuevas moléculas con potencial terapéutico, contribuyendo al tratamiento de las infecciones virales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonado, expresión y purificación de la proteasa nsP2 y un sustrato de diseño que contiene el sitio de corte

Para obtener la proteasa nsP2 de CHIKV (Figura 1), obtuvimos el ADNc que codifica para la enzima mediante una PCR sobre el clon infeccioso de CHIKV, utilizando los primers GGCAGCCATATGACCTTTGATACGTTCC (sentido) y GTGGTGCTCGAGTTATCCTACAAAGGCTG (antisentido).

Este ADNc lo clonamos en el vector de expresión pET28c (Novagen).

Transformamos bacterias competentes de la cepa Rosetta de *E. coli* con el vector y crecimos cultivos en medio LB suplementado con kanamicina 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y cloranfenicol 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Indujimos la expresión de la proteína mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM, y luego de la expresión cosechamos las bacterias por centrifugación.

Para la purificación de nsP2, lisamos las bacterias mediante pulsos de sonicación a 4 °C en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, glicerol 5 % (v/v), ditiotretitol (DTT) 0.5 mM, imidazol 20 mM, Tween-20 1 % (v/v) y lisozima 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A continuación centrifugamos los lisados celulares para separar las fracciones soluble e insoluble.

Ya que las proteínas expresadas utilizando el vector pET28c se producen unidas a un tracto de histidinas, sembramos el sobrenadante en una columna de afinidad a iones níquel (HisTrap, GE).

Tras exhaustivos lavados, eluimos la enzima con imidazol 200 mM. Luego de dializar la enzima para remover el imidazol, la almacenamos en nitrógeno líquido.

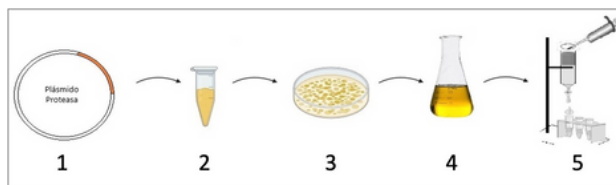


Figura 1. Esquema del clonado, expresión y purificación de nsP2. Clonamos la secuencia que codifica para la proteasa unida a un tracto de histidinas en un plásmido de expresión (1). Introdujimos el plásmido en bacterias *E. coli* de la cepa Rosetta (2), que cultivamos en medio LB-agar para aislar colonias (3). A partir de una colonia crecimos bacterias en un cultivo líquido y indujimos la expresión de la proteasa mediante el agregado de lactosa (4). Lisamos las bacterias y purificamos la nsP2 mediante cromatografía de afinidad a iones de níquel (5).

De igual manera que para nsP2, transformamos la construcción que contiene la secuencia del sustrato en el vector de expresión pET28c, en bacterias competentes de la cepa Rosetta de *E. coli*. Luego, indujimos la expresión y purificación de la proteína.

En este caso, la elución del sustrato de la columna se realizó con 100 mM de imidazol.

Clonado, expresión y purificación de la nsP2 mutante

Para generar una mutante inactiva de nsP2 reemplazamos la cisteína del sitio activo por alanina (C478A). Para esto, realizamos un clonado sin enzimas de restricción que implicó (i) una primera PCR para amplificar la secuencia con la mutación diseñada utilizando los *primers* 5'AACGTTGCTGGGCTAAG3'(sentido) y 5'GTGGTGCTCGAGTTATCCTACAAAGGCT3' (antisentido), (ii) una segunda PCR utilizando el producto de la primera PCR como *megaprimer* y el plásmido pET28c que contiene la secuencia que codifica para nsP2 como molde, y (iii) digestión con DpnI y transformación del segundo producto de PCR.

Los plásmidos se enviaron a secuenciar (*Macrogen*, Corea) y una vez corroborado el éxito del clonado, procedimos a expresar la nsP2 mutante en *E. coli* Rosetta y purificarla mediante cromatografía, siguiendo el protocolo anteriormente descrito para la nsP2 silvestre.

Medidas de actividad proteasa

Los ensayos de actividad proteasa consisten en incubar la enzima nsP2 purificada con su sustrato en condiciones óptimas de reacción.

En nuestros ensayos, la composición del medio de reacción fue Hepes 20 mM pH 7.5, NaCl 6 mM, DTT 1 mM.

La nsP2 recombinante (0.5 μ M) y su sustrato (5 μ M) se incubaron a 25 °C durante distintos tiempos, hasta 30 minutos.

En cada caso, detuvimos la reacción mediante el agregado de buffer de siembra, que contiene Tris-HCl 50 mM pH 6.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), β mercaptoetanol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0.05 % (p/v).

Luego, resolvimos los productos de la reacción mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por densitometría (*Image J*), estimamos la concentración del sustrato y los productos a cada tiempo de reacción.

RESULTADOS

Diseño del sustrato

Para los ensayos de actividad enzimática, utilizamos un sustrato que contiene un segmento de 15 aminoácidos que presenta el sitio de reconocimiento natural de la proteasa nsP2 ubicado en la unión entre nsP3 y nsP4 (DELRLDRAGG|YIFSS).

Como no es posible resolver los productos de la hidrólisis de un péptido pequeño mediante SDS-PAGE, el sustrato

posee dos dominios proteicos flanqueando al sitio de corte. Estos dominios son la enzima fluorescente verde (GFP) en el extremo N-terminal y la tiorredoxina (TRX) en el extremo C-terminal (Figura 2A) (11).

Este sustrato tiene un peso molecular aproximado de 40 kDa y cuando es escindido por la proteasa, genera productos de 27 kDa (GFP) y 12 kDa (TRX) que pueden ser resueltos mediante SDS-PAGE.

Una cuestión importante a tener en cuenta en el diseño del sustrato es la accesibilidad del sitio de corte, ya que los dominios GFP y TRX podrían hacer que éste quede oculto. Para estudiar la accesibilidad del sitio de corte, realizamos una predicción de su estructura tridimensional mediante el algoritmo *AlphaFold*(12).

Como se observa en la Figura 2B, GFP y TRX se pliegan en dominios independientes (en verde y azul, respectivamente), mientras que la secuencia que contiene el sitio de corte se localiza en un *loop* flexible y totalmente expuesto (en rosa).

Este resultado sugiere que GFP y TRX no afectan el reconocimiento del sitio de corte y clivaje del sustrato por nsP2, por lo cual la conformación del mismo sería adecuada para su empleo en el ensayo de actividad enzimática.

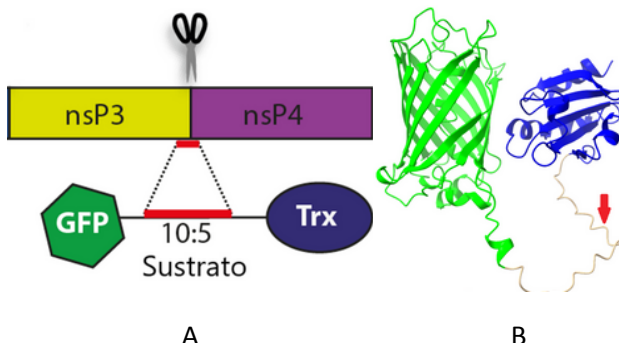


Figura 2. Sustrato de la proteasa. (A) Esquema del sustrato, compuesto por los dominios proteicos GFP y TRX, unidos mediante un espaciador que contiene la secuencia de reconocimiento natural nsP3/4 de la proteasa (10 residuos previos y 5 posteriores al sitio de corte). (B) Predicción de la estructura del sustrato realizada mediante *AlphaFold*. GFP se muestra en verde, TRX en azul y el segmento que contiene el sitio de corte en rosa. La flecha roja indica el sitio de corte de nsP2.

Purificación y rendimiento de la nsP2 silvestre, la nsP2 mutante y el sustrato recombinante

Una vez diseñados y clonados la nsP2 y su sustrato procedimos a su expresión y purificación. Al término de este procedimiento, examinamos la pureza de las preparaciones mediante SDS-PAGE, la cual fue superior al 98 % (Figura 3A). Luego, cuantificamos espectroscópicamente las proteínas en base a la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente

de extinción molar de 51255 y 43695 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para nsP2 y el sustrato, respectivamente (Figura 3B).

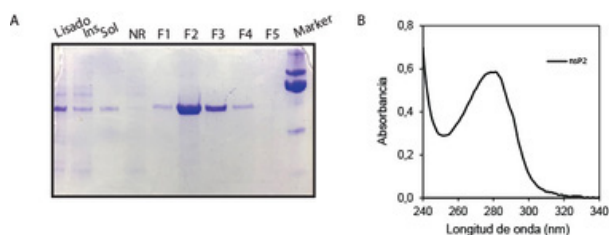


Figura 3. Purificación de proteínas. (A) SDS-PAGE representativo de los pasos intermedios de la purificación de las variantes de nsP2 y su sustrato. Las calles corresponden al lisado bacteriano total (calle 1), la fracción insoluble y la fracción soluble (calles 2 y 3), la fracción no retenida en la columna de afinidad (calle 4), las fracciones recuperadas luego de la elución con imidazol (calles 5 a 9) y el marcador de peso molecular (calle 10). (B) Espectro de absorción de la nsP2 purificada.

En el caso del sustrato, puesto que contiene GFP en su extremo N-terminal, es posible evidenciar la expresión del mismo e identificar las fracciones donde está enriquecido mediante la detección de fluorescencia bajo luz ultravioleta (Figura 4).

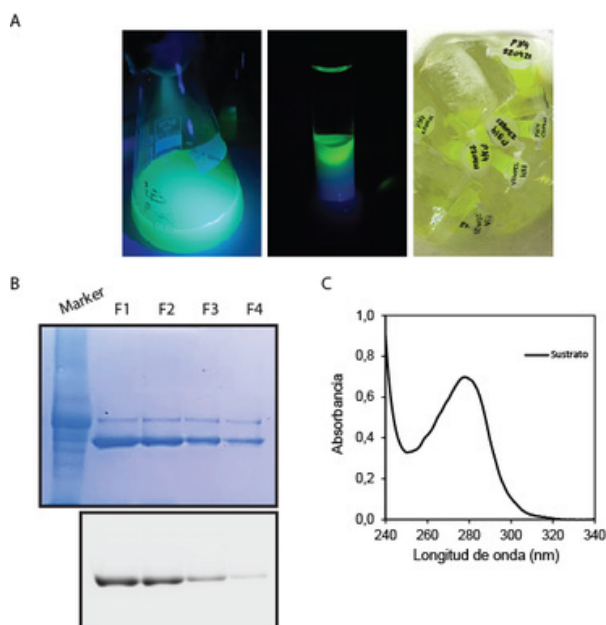


Figura 4. Expresión y purificación del sustrato. (A) Fotografías bajo luz ultravioleta de un cultivo de bacterias *E. coli* que expresan el sustrato (izquierda), columna cromatográfica de afinidad en la que se sembró la fracción soluble del lisado de bacterias (centro) y fotografía bajo luz visible de la enzima purificada, una vez eluida de la columna de afinidad (derecha). (B) SDS-PAGE representativo de la purificación del sustrato, revelado mediante tinción con Coomassie blue (arriba) y fluorescencia de GFP (abajo). Marcador de peso molecular (calle 1) y fracciones recuperadas luego de la elución con imidazol (calles 2 a 5). (C) Espectro de absorción del sustrato purificado.

Actividad enzimática de la nsP2 silvestre y la nsP2 con una mutación en el sitio activo

Para estudiar la actividad enzimática, incubamos la nsP2 silvestre con el sustrato purificado durante distintos tiempos a 25 °C.

Evidenciamos la hidrólisis producto de la actividad de nsP2 a partir de la desaparición de la banda correspondiente al sustrato completo, y la aparición de aquella correspondiente a GFP, visualizadas por tinción con Coomassie blue o haciendo uso de un lector de fluorescencia (Figura 5A).

Mediante densitometría, cuantificamos la intensidad de cada banda y calculamos la concentración de producto obtenido a cada tiempo en base a la estimación espectrofotométrica de la concentración del sustrato. Finalmente, representamos la concentración del producto en función del tiempo de reacción (Figura 5B).

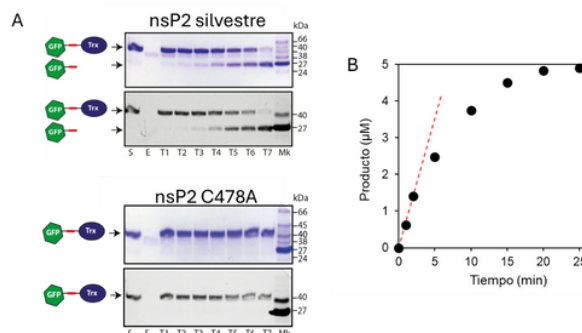


Figura 5. Ensayo de actividad de la nsP2. (A) Incubamos la enzima nsP2 silvestre (arriba) o mutante C378A (abajo) con el sustrato durante 0, 2, 5, 10, 16, 20 o 30 minutos (T1 a T7) y resolvimos los productos de la reacción mediante SDS-PAGE, que fue revelado por tinción con Coomassie blue (arriba) y fluorescencia de GFP (abajo). Se muestra la degradación del sustrato en función del tiempo de reacción. Se incluyó también el sustrato en ausencia de enzima (S) y la enzima sin sustrato (E) y un marcador de peso molecular (Mk). (B) Cantidad de producto en función del tiempo de reacción, obtenido a partir de la cuantificación mediante densitometría de las bandas del SDS-PAGE para la enzima nsP2 silvestre.

Nuestros resultados indican que la aparición de producto es directamente proporcional al tiempo de reacción durante los primeros dos minutos (recta roja punteada de la Figura 5B). En consecuencia, es posible determinar la velocidad inicial de la proteólisis como la pendiente de esta recta. La velocidad inicial estimada fue de 50 nmoles de producto por hora.

Las evidencias en la literatura muestran que los residuos de la díada catalítica C478 y H548 son absolutamente esenciales para la proteólisis y la replicación viral (13).

Por consiguiente, para validar el método de medida, decidimos clonar, expresar y purificar una proteasa de

CHIKV que contiene una mutación en el sitio activo de nsP2 (C478A).

Luego, realizamos el ensayo de actividad con esta enzima mutante. Como esperábamos, el sustrato es estable durante el tiempo de incubación y la nsP2 C478A es incapaz de hidrolizarlo.

En su conjunto, los resultados indican que nuestro método es robusto y específico, y permite obtener de manera rápida y sencilla medidas cuantitativas de la actividad de nsP2. Puesto que las proteasas virales son los blancos de elección para el diseño de antivirales, ensayos como el propuesto pueden también extrapolarse para el estudio de fármacos dirigidos para las proteasas de otros virus.

DISCUSIÓN

En este trabajo, describimos la expresión y purificación de la proteasa del virus chikungunya y un sustrato sintético que contiene uno de los sitios de corte naturales de la enzima. Utilizando las proteínas recombinantes purificadas logramos poner a punto un ensayo sencillo, económico, robusto, y cuantitativo de actividad enzimática.

El diseño de antivirales específicos es un desafío en la terapéutica de las enfermedades virales, ya que los virus usan las maquinarias celulares para la mayor parte de sus procesos metabólicos.

Sin embargo, las células eucariotas no disponen de ciertas enzimas necesarias para la replicación viral, por lo que los genomas virales contienen la información que las codifica. Entre estas enzimas se encuentran la polimerasa, la helicasa y la proteasa viral.

Puesto que estas enzimas son exclusivamente virales, desde hace décadas son los blancos de elección para el diseño de antivirales específicos.

Los primeros inhibidores de proteasas estuvieron dirigidos a la proteasa del VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1).

En 1990, Roberts y colaboradores (14) diseñaron una serie de derivados peptídicos basados en el concepto mimético del estado de transición que inhiben la proteasa de VIH-1 y VIH-2 en el rango nanomolar.

Estos compuestos mostraron un escaso efecto a 10 μ M frente a las proteasas aspárticas humanas estructuralmente relacionadas, lo que indica que poseen un elevado índice terapéutico.

En 1995, se aprobó el saquinavir (*Invirase*, Roche), el primer inhibidor de proteasas para VIH, que fue parte de un avance significativo en el tratamiento del VIH/SIDA.

Posteriormente, debido a la baja disponibilidad oral del saquinavir y la rápida selección de virus con mutaciones que confieren resistencia, fue necesario el desarrollo de nuevos inhibidores (ritonavir, indavir, lopinavir, entre otros) (15).

Los inhibidores de nueva generación presentan mejoras farmacocinéticas y aportan alternativas en el caso de pacientes que no responden al tratamiento.

Los antecedentes con los inhibidores para el VIH fueron la piedra fundacional para el diseño de inhibidores contra otras proteasas virales, como la de Hepatitis C y SARS-Cov2 (16).

A la luz de estas evidencias, los inhibidores de proteasas virales deben diseñarse y re-diseñarse con frecuencia.

Esto se debe a la gran capacidad viral de mutar para generar variantes resistentes y a la emergencia de nuevos virus contra los cuales no existen tratamientos específicos disponibles.

En el caso de CHIKV, no hay actualmente inhibidores aprobados para su uso en humanos. Sin embargo, se encuentran en estudio una variedad de inhibidores peptídicos (17, 18), inhibidores basados en el reposicionamiento de fármacos ya aprobados para otras enfermedades (19, 20), e inhibidores identificados por técnicas computacionales (docking molecular) (21, 22).

Para la evaluación de inhibidores es crucial contar con métodos de medida in vitro de la actividad proteasa.

Los ensayos más ampliamente utilizados se basan en la técnica de Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (23), donde el sustrato es un péptido pequeño (10-15 aminoácidos) que contiene el sitio de corte, un fluoróforo en un extremo y un quencher en el otro.

Cuando estos péptidos marcados son clivados por la nsP2, se produce la disociación del par FRET con el consecuente aumento de la señal fluorescente.

Estos ensayos tienen la ventaja que permiten determinar la proteólisis en tiempo real. Sin embargo, por su tamaño reducido, es posible que las condiciones del clivaje estén alejadas de las condiciones fisiológicas, y los péptidos se acomoden en la estructura de la enzima sin demasiadas restricciones.

Por otra parte, podría producirse quenching intermolecular a altas concentraciones de péptido, lo cual podría dificultar la interpretación de los resultados.

Finalmente, el uso de péptidos FRET es costoso y poco versátil, ya que estas moléculas son comerciales y no se pueden modificar por mutagénesis dirigida.

Por lo expuesto, consideramos que el método de medida propuesto en este trabajo es una alternativa interesante para el estudio de moléculas potencialmente inhibidoras de proteasas, con ventajas en su costo y diseño experimental.

BIBLIOGRAFIA:

1. de Lima Cavalcanti TYV, Pereira MR, de Paula SO, Franca RFO. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses*. 2022;14(5).
2. Kril V, Aïqui-Reboul-Paviet O, Briant L, Amara A. New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. *Annu Rev Virol*. 2021;8(1):327-47.
3. Thaikruea L, Charearnsook O, Reanphumkamkit S, Dissomboon P, Phonjan R, Ratchbud S, et al. Chikungunya in Thailand: a re-emerging disease? *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28(2):359-64.
4. Sharif N, Sarkar MK, Ferdous RN, Ahmed SN, Billah MB, Talukder AA, et al. Molecular Epidemiology, Evolution and Reemergence of Chikungunya Virus in South Asia. *Front Microbiol*. 2021;12:689979.
5. Fredericks AC, Fernandez-Sesma A. The burden of dengue and chikungunya worldwide: implications for the southern United States and California. *Ann Glob Health*. 2014;80(6):466-75.
6. Lanciotti RS, Valadere AM. Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(8):1400-2.
7. Weaver SC. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2921.
8. PLISA. Cases of Chikungunya Virus Disease - Health Information Platform for the Americas 2024 [Disponible en: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/chikv-es.html>].
9. Tan YB, Chmielewski D, Law MCY, Zhang K, He Y, Chen M, et al. Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex. *Sci Adv*. 2022;8(48):eadd2536.
10. Tomar S, Aggarwal M. Chapter 5 - Structure and Function of Alphavirus Proteases. In: Gupta SP, editor. *Viral Proteases and Their Inhibitors*: Academic Press; 2017. p. 105-35.
11. Utt A, Das PK, Varjak M, Lulla V, Lulla A, Merits A. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. *J Virol*. 2015;89(6):3145-62.
12. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-9.
13. Russo AT, Malmstrom RD, White MA, Watowich SJ. Structural basis for substrate specificity of alphavirus nsP2 proteases. *J Mol Graph Model*. 2010;29(1):46-53.
14. Roberts NA, Martin JA, Kinchington D, Broadhurst AV, Craig JC, Duncan IB, et al. Rational Design of Peptide-Based HIV Proteinase Inhibitors. *Science*. 1990;248(4953):358-61.
15. van Heeswijk RP, Veldkamp A Fau - Mulder JW, Mulder Jw Fau - Meenhorst PL, Meenhorst PI Fau - Lange JM, Lange Jm Fau - Beijnen JH, Beijnen Jh Fau - Hoetelmans RM, et al. Combination of protease inhibitors for the treatment of HIV-1-infected patients: a review of pharmacokinetics and clinical experience. (1359-6535 (Print)).
16. Xiang R, Yu Z, Wang Y, Wang L, Huo S, Li Y, et al. Recent advances in developing small-molecule inhibitors against SARS-CoV-2. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2022;12(4):1591-623.
17. Singh H, Mudgal R, Narwal M, Kaur R, Singh VA, Malik A, et al. Chikungunya virus inhibition by peptidomimetic inhibitors targeting virus-specific cysteine protease. *Biochimie*. 2018;149:51-61.
18. Dhindwal S, Kesari P, Singh H, Kumar P, Tomar S. Conformer and pharmacophore based identification of peptidomimetic inhibitors of chikungunya virus nsP2 protease. *J Biomol Struct Dyn*. 2017;35(16):3522-39.
19. Tripathi PK, Soni A, Singh Yadav SP, Kumar A, Gaurav N, Raghavendhar S, et al. Evaluation of novobiocin and telmisartan for anti-CHIKV activity. *Virology*. 2020;548:250-60.
20. Albulescu IC, van Hoolwerff M, Wolters LA, Bottaro E, Nastruzzi C, Yang SC, et al. Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. *Antiviral Res*. 2015;121:39-46.
21. Das PK, Puusepp L, Varghese FS, Utt A, Ahola T, Kananovich DG, et al. Design and Validation of Novel Chikungunya Virus Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(12):7382-95.
22. Agarwal T, Asthana S, Bissoyi A. Molecular Modeling and Docking Study to Elucidate Novel Chikungunya Virus nsP2 Protease Inhibitors. *Indian J Pharm Sci*. 2015;77(4):453-60.
23. Saha A, Acharya BN, Priya R, Tripathi NK, Shrivastava A, Rao MK, et al. Development of nsP2 protease based cell free high throughput screening assay for evaluation of inhibitors against emerging Chikungunya virus. *Sci Rep*. 2018;8(1):10831.