



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Desarrollo de antivirales contra el coronavirus *SARS-CoV-2*

Development of antivirals against SARS-CoV-2

Autor/a: Adrián Martín Gutiérrez

Director/es: J. Navas /J. Ramos

Santander, junio 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN/ SUMMARY	5
2. INTRODUCCIÓN DEL <i>CORONAVIRUS SARS-COV-2</i>	
2.1. La enfermedad COVID-19:	
I. Epidemiología y etiología	6
II. Síntomas	6
2.2. <i>Coronavirus</i> :	
I. Clasificación. Antecedentes recientes	7
II. Características del <i>coronavirus SARS-CoV-2</i> . Ciclo viral	8
3. FÁRMACOS	
3.1. Evaluación de la actividad antiviral	11
3.2. Introducción a los antivirales	13
3.3. Fármacos contra el SARS-CoV-2	15
I. Dirigidos contra la polimerasa dependiente de RNA (RdRp)	15
II. Dirigidos contra 3CLpro/PLpro	19
III. Dirigidos contra el complejo ECA2-proteína S	21
i. Inhibidores de TMPRSS2	22
ii. Inhibidores de la vía endosomal y la cathepsina L. Lisosomotropismo	23
IV. Azitromicina, niclosamida, nitazoxanida	29
V. Dirigidos frente a la respuesta inmunitaria	32
VI. Dirigidos contra dianas específicas y todavía poco estudiados	35
VII. Otros compuestos	38
4. PROPIEDADES FARMACOCÍNETICAS. LIPINSKI-VEBER	40
5. BIOACTIVIDAD	43
6. NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD POTENCIAL CONTRA EL SARS-COV-2.	
I. Extractos del té	43
II. Anticuerpos contra el SARS-CoV-2	44
7. ENSAYO CLÍNICO SOLIDARITY REALIZADO POR LA OMS	46
8. CONCLUSIONES	48
9. ABREVIATURAS	49
10. BIBLIOGRAFÍA	51
11. AGRADECIMIENTOS	54

ÍNDICE DE IMÁGENES

1. **Ilustración 1.** Radiografía de tórax de un paciente con neumonía bilateral SARS-CoV-2. Condensaciones múltiples, simétricas, intersticiales en zona perihiliar y periférica.⁶
2. **Ilustración 2.** TC sin contraste de un paciente con neumonía bilateral SARS-CoV-2.⁷
3. **Ilustración 3.** Representación artística de la estructura del *coronavirus SARS-CoV-2*. Imagen diseñada por María José Calvo.
4. **Ilustración 4.** Ciclo viral del SARS-CoV-2.¹²
5. **Ilustración 5.** Fases secuenciales de los ensayos clínicos de nuevos fármacos.¹⁷
6. **Ilustración 6.** Mecanismo de acción de los principales antivirales del SARS-CoV-2.¹⁹
7. **Ilustración 7.** Mesilato de nafamostat inhibe la infección de SARS-CoV-2 en células pulmonares en rango nanomolar. Las células derivadas pulmonares Calu-3 fueron incubadas con las concentraciones indicadas de inhibidores de serin proteasa. (A) se midió la viabilidad celular o se inoculó a las células con partículas del virus de la estomatitis. La eficacia de la entrada viral se determinó a las 16 horas, midiendo la actividad luciferasa en lisados celulares. Paralelamente, las células expuestas a inhibidores de serina proteasa se infectaron con el virus de la estomatitis vesicular que codificaba una proteína fluorescente (B) o con SARS-CoV-2 (C) y se midió la eficiencia mediante un ensayo y midiendo las copias de genoma por RT-PCR, respectivamente.²⁶
8. **Ilustración 8.** Afinidades de cloroquina e hidroxiclороquina con las proteínas virales de SARS-CoV-2.²⁷
9. **Ilustración 9.** El efecto lisosomotrópico depende del compuesto activo, la dosis y la acumulación en los lisosomas. A menos que se indique lo contrario, las dosis diarias máximas se dividen en tres administraciones. La concentración lisosomal (efecto) con el efecto terapéutico in vivo (esperado) (++) ocurre en la dosis máxima diaria y es muy probable en bajas o dosis iniciales, (+) muy probable en la dosis máxima diaria y es posible en bajas y dosis iniciales, (o) posible a dosis máximas diarias y poco probable en dosis baja o inicial y (-) improbable incluso con dosis diarias máximas; * retirado del mercado (en la mayoría de países); **solo uso veterinario: #dosis única al día, #o dosis dependiente del tratamiento o la profilaxis (de la malaria); xin vitro anti SARS-CoV probado, xxin vitro anti SARS-CoV-2 probado. ***lisosomotropismo muy probable, pero aún no confirmado, concentración lisosomal del fármaco (efecto) dentro del margen terapéutico esperado; ## lisosomotropismo muy probable, pero aún no confirmado, sin concentración de fármaco lisosomal (efecto) dentro del margen esperado.¹¹

- 10. Ilustración 10.** Mecanismo de acción de los tres compuestos realizado a concentraciones superiores a la mitad del efecto inhibitorio máximo “IC₅₀” para conocer mejor el mecanismo de acción.¹⁸
- 11. Ilustración 11.** Estructura de la azitromicina acoplada periféricamente.¹⁸
- 12. Ilustración 12.** Nitazoxanida acoplada con formación de puente de H débil.¹⁸
- 13. Ilustración 13.** Niclosamida acoplada con formación de puente de H fuerte.¹⁸
- 14. Ilustración 14.** Actividades anti-SARS-CoV-2 y anti-MERS-CoV para azitromicina, niclosamida y nitazoxanida. (a) Actividad anti-SARS-CoV-2 para azitromicina, niclosamida y nitazoxanida, medida por ensayo de reducción de placa. (b) Actividad anti-MERS-CoV para azitromicina, niclosamida y nitazoxanida, medida en ensayo de reducción de placa.¹⁸
- 15. Ilustración 15.** Puntuación de bioactividad en fármacos con posible actividad anti-SARS-CoV-2.³
- 16. Ilustración 16.** Propiedades moleculares de fármacos candidatos anti-SARS-CoV-2.³
- 17. Ilustración 17.** Actividad inhibitoria de SARS 3CL^{pro} por productos naturales.²⁹
- 18. Ilustración 18.** Diseño del ensayo clínico SOLIDARIY.³⁰
- 19. Ilustración 19.** Efectos del remdesivir, hidroxiclороquina, lopinavir e interferón en la mortalidad hospitalaria por COVID-19.³⁰

1. RESUMEN

La pandemia causada por el *coronavirus SARS-CoV-2* ha afectado al ser humano en todos los aspectos de la vida de una forma inesperada, sin casi capacidad de respuesta. Las grandes empresas farmacéuticas y numerosos grupos de investigación están intentando encontrar tratamientos efectivos contra el *SARS-CoV-2*, sin embargo, no está siendo una tarea fácil. Numerosos ensayos clínicos están llevándose a cabo en multitud de lugares del mundo, trabajando de forma conjunta para obtener resultados positivos significativos lo más rápido posible. En esta revisión bibliográfica se recoge un resumen de los principales compuestos que han sido estudiados para combatir el *SARS-CoV-2*, así como los resultados obtenidos en los ensayos realizados. La revisión ha sido realizada hasta el día 1/05/21.

Palabras clave: *SARS-CoV-2*, COVID-19, antivirales, tratamiento.

SUMMARY

The pandemic caused by the *SARS-CoV-2 coronavirus* has affected humans in all aspects of life in an unexpected way, with almost no response capacity. Big pharmaceutical companies and research groups are trying to find effective treatments against *SARS-CoV-2*, however, it is not an easy task. Numerous clinical trials are taking place in many places around the world, working together to obtain significant positive results as quickly as possible. This bibliographic review includes a summary of the main compounds that have been studied to combat *SARS-CoV-2*, as well as the results obtained in the tests carried out. The review has been carried out until 5/1/21.

Key words: *SARS-CoV-2*, COVID-19, antivirals, treatment.

2. INTRODUCCIÓN DEL *CORONAVIRUS SARS-COV-2*.

2.1. LA ENFERMEDAD COVID-19: EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y SÍNTOMATOLOGÍA.

EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA:

COVID-19 es una nueva enfermedad por *coronavirus* identificada en diciembre de 2019. En ese momento, todos los casos estaban vinculados a la ciudad china de Wuhan. El 7 de enero de 2020 se identificó el agente causal a partir de un frotis faríngeo realizado por el Centro Chino para el Control y Prevención de Enfermedades (CCDC) y fue nombrado síndrome respiratorio agudo severo *coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) llamó a esta enfermedad COVID-19.¹ El 11 de marzo de 2020 fue oficialmente declarada **pandemia** por la Organización Mundial de la Salud (OMS).²

El 25 de mayo de 2020, se notificaron más de 5,43 millones de casos de COVID-19 y más de 345.000 muertes.¹

El 4 de junio de 2020 se habían producido ya más de 11 millones de casos en todo el mundo y 525.491 muertes atribuidas al *SARS-CoV-2* desde diciembre de 2019. Los estudios más recientes indican que el COVID-19 tiene una tasa de mortalidad de 3-5% (muy inferior a la del *SARS-CoV*, 9-15%; y la del *MERS-CoV*, 34-37%). Sin embargo, lo que ha hecho que esta enfermedad haya llegado a ser una enfermedad pandémica es su elevada transmisibilidad.³

El día 11 de mayo de 2021 se confirmaron 158.651.638 casos de COVID-19, incluyendo 3.299.764 muertes, según la OMS.⁴

SÍNTOMATOLOGÍA:

Esta enfermedad se caracteriza por una sintomatología respiratoria que incluye **tos no productiva, disnea, fiebre, astenia** y afectaciones neurológicas tales como **anosmia** y **disgeusia**. En los casos más severos, esta enfermedad se puede complicar, llegando a producir **neumonía bilateral, SDRA, insuficiencia renal** y llegando a producir la muerte en algunos pacientes.³ Sin embargo, un alto número de casos de COVID-19 permanecen asintomáticos. El periodo de incubación de esta enfermedad es de 2-14 días⁵.

Gracias a los antecedentes de *MERS-CoV* y de *SARS-CoV* en asociación con las características clínicas observadas en pacientes infectados con *SARS-CoV-2*, es posible identificar tres fases en la historia natural de la enfermedad COVID-19. La **primera fase** se inicia con el comienzo de la enfermedad y generalmente se caracteriza por el desarrollo de síntomas parecidos a la gripe. En esta fase, se puede detectar el *SARS-CoV-2* analizando muestras de exudados o saliva mediante la técnica de RT-PCR. La mayoría de los pacientes en esta fase son asintomáticos, pero pueden transmitir el virus a otras personas. Puede progresar a la fase dos dependiendo de unos factores aún no conocidos. En la **fase dos**, es posible detectar síntomas compatibles con neumonía, evidenciados como condensaciones en el pulmón en una radiografía de tórax (Ilustraciones 1 y 2) o imágenes en vidrio deslustrado en TAC.²

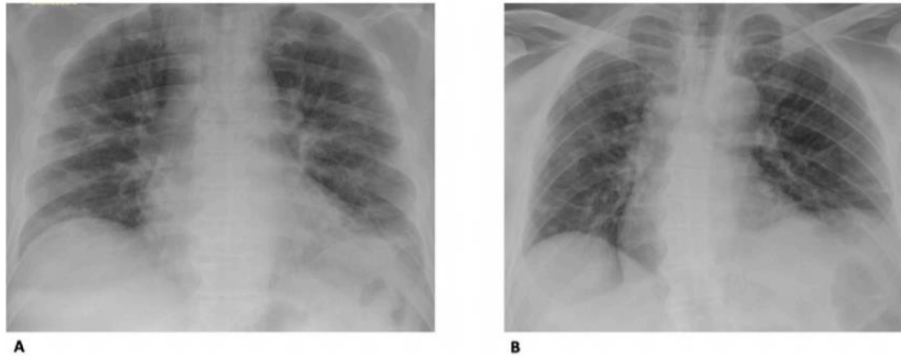


Ilustración 19. Radiografía de tórax de un paciente con neumonía bilateral SARS-CoV-2. Condensaciones múltiples, simétricas, intersticiales en zona perihiliar y periférica.⁶

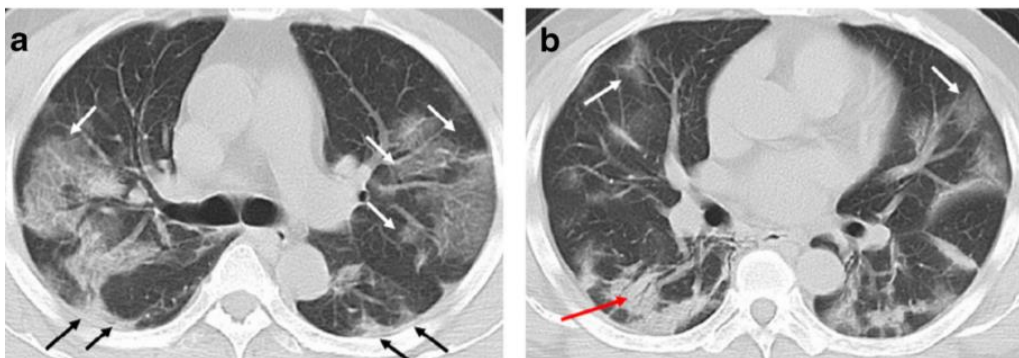


Ilustración 20. TAC sin contraste de un paciente con neumonía bilateral SARS-CoV-2.⁷

Se presenta severa hipoxemia, normalmente asociada con una compliance normal del sistema respiratorio. Los pacientes pueden mejorar o empeorar necesitando intubación y ventilación. Estos pacientes pasarían a la **fase 3**, la cual se caracteriza por hiper-inflamación y sepsis en los pulmones y necesidad de ser trasladados a la UCI, llegando a poder producir la muerte.²

2.2. **CORONAVIRUS: CLASIFICACIÓN; ANTECEDENTES RECIENTES. CARACTERÍSTICAS DEL CORONAVIRUS SARS-COV-2 (INCLUYENDO LAS DIFERENCIAS CON OTROS CORONAVIRUS) Y CICLO VIRAL.**

CLASIFICACIÓN; ANTECEDENTES RECIENTES.

El SARS-CoV-2 pertenece al orden de los **Nidovirales**, familia **Coronaviridae** y subfamilia **Orthocoronavirinae**. Los **coronavirus** son virus ARN monocatenarios con polaridad positiva. Dentro de los **coronavirus**, hay cuatro géneros (alfa, beta, gamma, delta). Los humanos son α -CoV (HCoV-229E y NL63) y β -CoV (MERS-CoV, SARS-CoV, HCoVOC43 y HCoV-HKU1, SARS-CoV-2). El SARS-CoV-2 se asemeja mucho al MERS-CoV y al SARS-CoV.⁸

El SARS- CoV se aisló por primera vez en noviembre de 2002 en China de un brote de neumonías atípicas. En 2003, se produjo un brote de 300 casos de SARS-CoV en la

provincia de Guangdong, exportándose diez días más tarde a Hong Kong. Unos meses después ya se había expandido hacia otros países. El total de casos registrados fueron 8.096 y el número de fallecidos fue 774. La OMS declaró el fin de la epidemia en julio de 2003. Este virus tiene como hospedador natural al murciélago.⁹

El primer caso de *MERS-CoV* se notificó en 2012 en Arabia Saudí. A partir de ese momento, se han producido numerosos brotes controlados en la zona. Desde 2012 hasta 2019, se reportaron 2.499 casos y 858 muertes. Este virus tiene como hospedador a los murciélagos y está asociada su transmisión con los dromedarios.⁹

CARACTERÍSTICAS DEL CORONAVIRUS SARS-COV-2 (INCLUYENDO LAS DIFERENCIAS CON OTROS CORONAVIRUS) Y CICLO VIRAL.

Los *coronavirus* poseen un genoma de 27 a 34 kb que codifica **16 proteínas no estructurales (NS)** y **4 proteínas estructurales: proteína spike (S), proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M), y una nucleoproteína (N).**¹⁰

En el genoma del *SARS-CoV-2* se encuentran once marcos de lectura (ORFs), situados en este orden: ORF1ab, ORF2 (proteína spike), v3, ORF4 (proteína E), ORF5, (proteína M), ORF6, v7a, ORF7b, ORF8, ORF9 (proteína N), y ORF10. **ORF1ab** codifica para una poliproteína (PP1a y PP1ab), la cual formará 16 proteínas no estructurales (NSPs). **NSP1**, se une a la subunidad 40S del ribosoma de la célula hospedadora para inactivar la traducción del mRNA. **NSP2**, se une a dos proteínas de la célula hospedadora (prohibitina 1 -PHB1- y prohibitina 2 -PHB2-) encargadas del ciclo celular, migración, diferenciación, apoptosis y biogénesis mitocondrial. **NSP3** contiene un dominio proteasa papain-like, cuya función es liberar NSP1, NSP2 y NSP3 de la región N-terminal de las poliproteínas 1a y 1ab. **NSP4** es una proteína que interactúa con NSP3 y es esencial para la replicación viral. **NSP5** es una proteasa 3C-like (3CLpro) homóloga de la proteasa del *MERS-CoV*. Su función es escindir en once sitios diferentes para conseguir proteínas no estructurales. **NSP6** se piensa que está involucrada en actividades relacionadas con el ensamblaje de proteínas replicasa y evitar la degradación de componentes virales. **NSP7** forma un complejo con v8 y NSP12 para producir una polimerasa RNA activa. **NSP9** interactúa con la “DEAD-box” helicasa del RNA 5, para la replicación. **NSP10** estimula a NSP14, que es una metiltransferasa adenosilmetionina dependiente. NSP10 también interactúa con NSP16, una 2'-O-metiltransferasa, aumentando su función. **NSP11**, cuya función es por ahora desconocida, tiene sus primeros nueve aminoácidos idénticos a los nueve primeros aminoácidos de **NSP12**, la cual es una polimerasa dependiente de RNA (RdRp) que copia el RNA viral. NSP12 forma un complejo con NSP7 y **NSP8** esencial para su actividad. **NSP13** es una helicasa que parece interactuar con NSP12 y tienen actividad 5'- trifosfato, importante para introducir un residuo 5'terminal en el mRNA viral durante su procesamiento junto con **NSP14**, el cual tiene actividad 3'-5' exorribonucleasa y N7-metil-transferasa. **NSP15** es una endorribonucleasa que escinde el RNA en regiones específicas. NSP15 previene el sistema inmune de la célula hospedadora. **NSP16** es un 2'- O-ribosa-metiltransferasa que metila el grupo 2'-hidroxi de las adeninas durante el procesamiento del ARN viral mediante el uso de S- adenosilmetionina.²

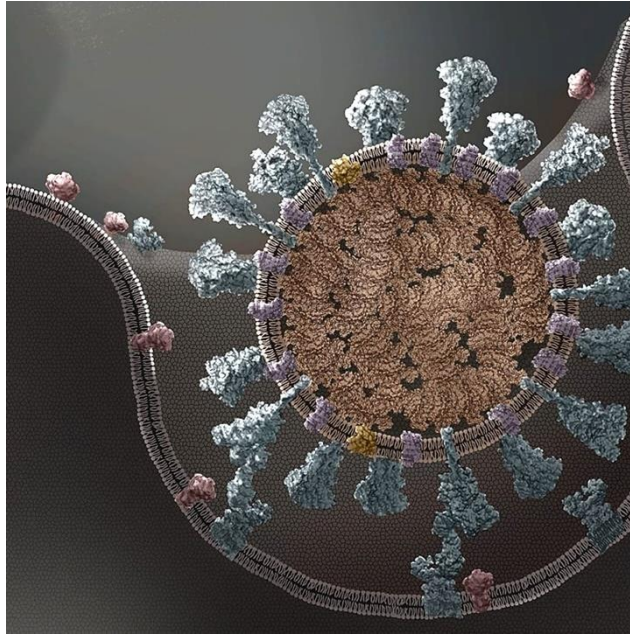


Ilustración 21. Representación artística de la estructura del coronavirus SARS-CoV-2. Imagen diseñada por María José Calvo.

Para entrar en la célula el SARS-CoV-2 se une al receptor de membrana de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), a través de su **proteína S**. Para que se produzca la liberación del genoma en el citoplasma, la proteína S tiene que escindirse, para su activación, en dos subunidades, **S1 y S2** ("priming"). Esto se produce por la acción de varias **proteasas (catepsina L o serina proteasa transmembrana 2, TMPRSS2)**. El virus puede entrar a la célula por dos mecanismos, o bien por endocitosis, o directamente por la fusión entre ambas membranas gracias a TMPRSS2, que escinde el complejo proteico ECA-S con la membrana celular, activando la proteína S. Por otro lado, también puede entrar siendo fagocitado en un endosoma. Para que se active la proteína S, el endosoma tiene que **acidificarse** y activar a la catepsina L para que fragmente el complejo ECA-S. Tras esto, el genoma se libera en el citoplasma y el ARN viral se traduce en dos poliproteínas AC precursoras, **pp1a y pp1ab**. Acto seguido, estos polipéptidos son escindidos por dos proteasas virales **3CLpro y PLpro**, para producir 16 NSPs (NSP1 a 16). Estas proteínas participan en la formación del complejo de replicación y transcripción para la producción de nuevos virus con la ayuda de **RdRp**. Finalmente, la proteína N se ensambla con genoma del virus nuevo y se une a la nucleocápside y otras proteínas estructurales para generar nuevos virones que son liberados mediante exocitosis. Por último, en una segunda fase, son reconocidos por las células dendríticas, que activan el sistema inmunitario produciendo una gran cascada inflamatoria.^{10,11}

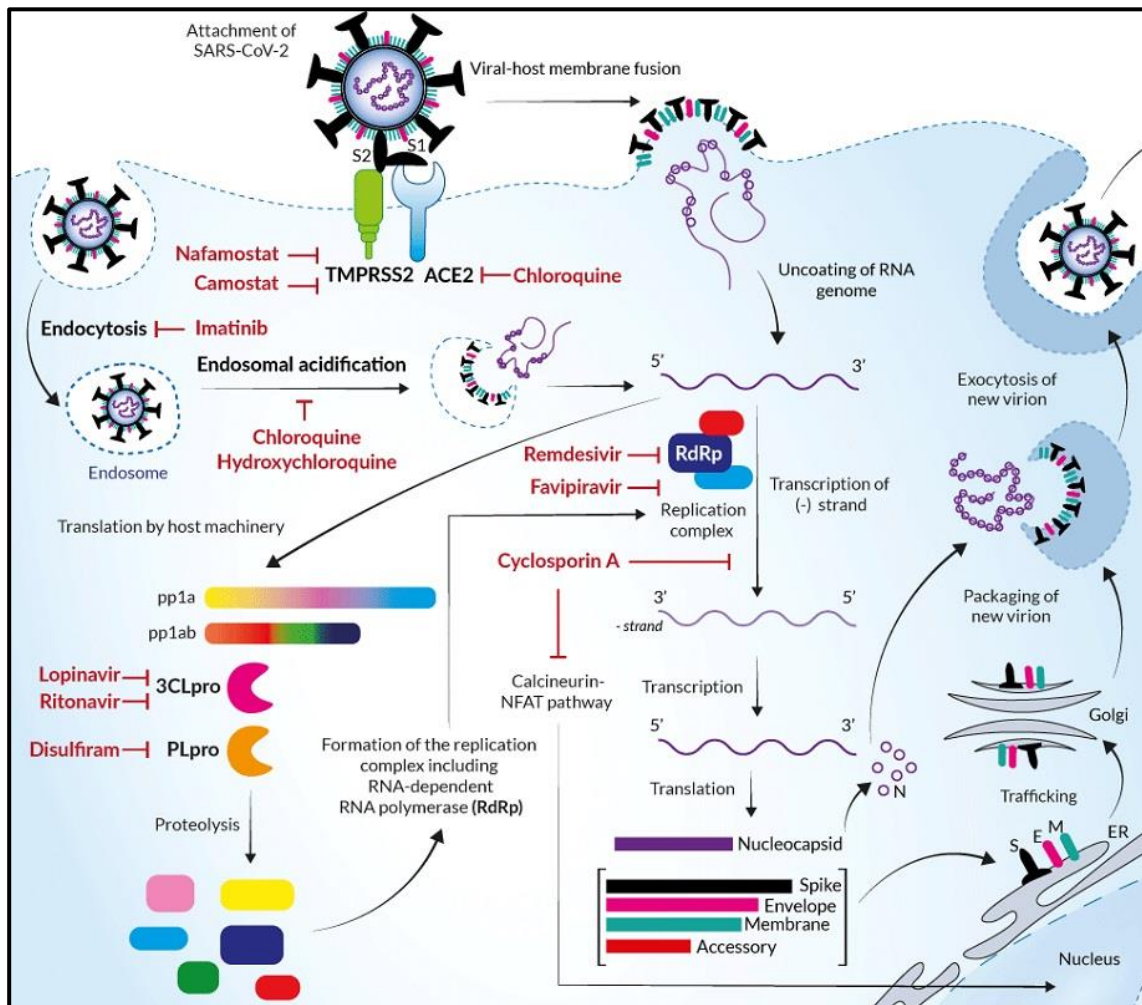


Ilustración 22. Ciclo viral del SARS-CoV-2.¹²

El **SARS-CoV-2** parece diferenciarse de los otros *coronavirus* en que su afinidad por ECA2 es mucho mayor (SARS-CoV-2, $KD=14.7 \mu M$; mientras que el **SARS-CoV** ($KD=325 \mu M$). Las medidas de afinidad se han realizado mediante crioelectromicroscopía, tecnología que combina técnicas de criogenización con la irradiación para evitar que se destruya la muestra al observarla por el microscopio electrónico. En un análisis de interfase, se demostró que 18 residuos del SARS-CoV-2 contactan con 20 del ECA2, mientras que solo 16 del SARS-CoV interactúan. Además, la superficie del SARS-CoV-2 es más polar que la del SARS-CoV. También, se diferencian en que el SARS-CoV-2 presentan un sitio de corte para la PPC en el límite S1/S2 de la proteína S, que parece que facilita la entrada a la célula hospedadora.¹³

Tanto el SARS-CoV-2 como el SARS-CoV usan la proteína spike S1 para unirse a la proteína ECA2 localizada en la superficie de la membrana de la célula hospedadora. Sin embargo, **MERS-CoV** se une al receptor de la dipeptidil-peptidasa 4 humana mediante su glicoproteína spike. Además, SARS-CoV y SARS-CoV-2 pueden unirse a la serina proteasa TMPRSS2 situada en la superficie de la célula hospedadora.³

3. FÁRMACOS.

3.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

Como los ciclos virales dependen de ciertos factores y vías celulares metabólicas y de señalización, el número de dianas antivirales es limitado. Sin embargo, casi todos los virus codifican proteínas y enzimas únicas que pueden servir como dianas específicas para terapias antivirales. El objetivo de los fármacos antivirales es inhibir específicamente dianas virales o celulares esenciales para la replicación viral.¹⁴

De todos los compuestos diseñados con la intención de inhibir las infecciones virales, solo unos pocos (menos de cien) han sido aprobados para uso clínico. Sin embargo, algunos fármacos llevan siendo eficaces durante décadas, como por ejemplo, la amantadina para el virus *influenza A*, aprobado en 1966. En 1982 se introdujo aciclovir como inhibidor de *herpesvirus*.¹⁴

Debido a la continua aparición de resistencias a los antivirales, necesitamos producir nuevos antivirales que actúen en diferentes etapas del ciclo viral. Para comprobar la eficacia de los antivirales, se llevan a cabo en primer lugar ensayos bioquímicos y en cultivos celulares.¹⁴

Se han desarrollado diferentes tipos de ensayos, como ensayos de fusión célula-célula, célula-virus, con partículas virales pseudotipadas y ensayos bioquímicos *in vitro*.¹⁴

Basado en un método de fusión célula-célula de *VIH-1* que utiliza un sistema de imagen digital controlada informáticamente para cuantificar automáticamente, se ha desarrollado un método modificado para detectar inhibidores dirigidos contra la proteína S del *MERS-CoV*. Para comprobar el potencial de fusión de los inhibidores, se usan células efectoras que expresan la proteína S de *MERS-CoV* y EGFP para mediar la fusión con células diana que expresan el receptor DPP4.¹⁴

Se desarrolló un método rápido celular para evaluar la acción de los fármacos inhibidores de la entrada *SARS-CoV* a la célula. Este ensayo de Pseudoviron de Envoltura Doble (DEP) emplea dos pseudovirus *VIH*: uno codifica una proteína de envoltura del virus diana y una luciferasa de luciérnaga y el segundo codifica una proteína de envoltura control no relacionada y una luciferasa de Renilla. La expresión del indicador se determina con el sistema de ensayo de Luciferasa Dual-Glo (Promega). La inclusión de la proteína de envoltura no relacionada redujo la tasa de falsos positivos.¹⁴

Si se obtienen buenos resultados en los estudios *in vitro*, comienzan a realizarse estudios preclínicos en animales (estudios *in vivo*). Existen 7 especies de animales que ofrecen la posibilidad de aplicar técnicas de análisis que no pueden ser empleadas en el ser humano por motivos éticos. Además, permiten ciertas investigaciones que no son posibles en técnicas *in vitro*, por ejemplo, la posibilidad de reproducir las interacciones de un sistema biológico completo. Además, permiten cuantificar la eficacia y la seguridad de un compuesto. El objetivo primario es la actividad biológica. Normalmente en estos estudios se utilizan dos o más especies de animales, para minimizar las diferencias entre especies. Estos estudios permiten conocer el comportamiento posible en humanos.¹⁵

Este tipo de estudios preclínicos *in vivo* nos permite conocer propiedades toxicológicas, farmacológicas y farmacodinámicas del compuesto. Los objetivos principales de seguridad son: seleccionar una dosis segura inicial, identificar órganos diana para la toxicidad y su reversibilidad, e identificar los parámetros de seguridad para la monitorización.¹⁵

Se han utilizado diferentes modelos de especies animales en los estudios preclínicos. Por ejemplo, se han utilizado conejos. Los conejos son susceptibles a la infección por *MERS-CoV*, pero no muestran cambios histológicos ni síntomas. En un estudio realizado en Nueva Zelanda con conejos expuestos al *SARS-CoV-2* se observó una diseminación a la nariz, faringe y recto después de 5, 11 y 15 días, respectivamente. Los conejos permanecieron asintomáticos con proliferación tisular linfóide bronquial e infiltración de macrófagos en el alveolo. Se necesitan más estudios para explicar la ausencia de síntomas en este modelo animal.¹⁶

Otra especie que se ha utilizado son los hurones. Los hurones son susceptibles a muchas enfermedades respiratorias humanas como la gripe, además, reproducen sus síntomas. ECA-2 se expresa principalmente en neumocitos tipo II y células epiteliales de las glándulas submucosas traqueobronquiales. El dominio de ECA-2 en hurones que se une a la proteína S del *SARS-CoV-2* difiere solo en dos aminoácidos del dominio humano. En un estudio, grupos de distintos hurones que fueron infectados intranasalmente con 10^5 TCID₅₀ cepas de *SARS-CoV-2* aisladas de pacientes coreanos, mostraron síntomas similares a los humanos. Se detectó RNA vírico de 4 a 8 días después de la infección en hisopos nasales y salivales. A parte de este estudio, otros han evidenciado también que los hurones son susceptibles a la infección *SARS-CoV-2*. Los hurones se han utilizado para pruebas con lopinavir, ritonavir, hidroxicloroquina y entricitabina-tenofovir, para estudiar su eficacia.¹⁶

Por último, otros animales empleados en ensayos clínicos son los primates. Dieron un resultado positivo tras la exposición al *SARS-CoV-2* y mostraron desde síntomas leves a graves. A pesar de similitudes significativas en los receptores ECA-2 entre humanos y primates, existen diferencias en la latencia viral y las características clínicas del COVID-19, que pueden deberse a variaciones inmunológicas y diferencias de niveles de ECA-2 entre las dos especies. Los primates (monos titi) se han utilizado tanto para estudiar la patogénesis viral como para demostrar la eficacia de ciertos fármacos, como remdesivir y lopinavir/ritonavir, contra el *SARS-CoV* y *MERS-CoV*, respectivamente. Por otro lado, una vacuna de ADN en desarrollo con expresión de varios inmunógenos de la proteína S ha sido probada en macacos Rhesus. La vacuna protegió contra el *SARS-CoV-2*, reduciendo la carga viral nasal y broncoalveolar.²⁴

Cuando un nuevo fármaco obtiene buenos resultados en los ensayos farmacológicos, toxicológicos y bioquímicos durante la investigación preclínica, el patrocinador del estudio presenta a las agencias reguladoras un documento que describe los resultados preclínicos.¹⁷

En el caso de ser aprobado, le adjudican al nuevo fármaco una autorización para realizar los estudios clínicos. Antes de que sea investigado en humanos, las leyes obligan a que el sujeto o sus tutores firmen un documento de consentimiento informado.¹⁷

La **fase I** de los ensayos clínicos consiste en la realización de estudios en un pequeño grupo de voluntarios sanos (generalmente, menor de 100). Los objetivos principales son: comprobar la seguridad y estudiar efectos adversos, la tolerabilidad al establecer límites probables de valores de dosis clínicas seguras y estudios de farmacocinética. En ocasiones, se realizan en voluntarios enfermos, sobre todo cuando se espera toxicidad del fármaco en cuestión.¹⁷

En la **fase II**, generalmente, los estudios son experimentales aleatorizados y su objetivo es estudiar la eficacia del fármaco. En esta fase, el tamaño muestral también es pequeño (menos de cien). Además del grupo que recibe el fármaco nuevo, se incluye otro, que recibe el fármaco de referencia actual (grupo control).¹⁷

En la **fase III**, se desarrollan ensayos clínicos controlados en un gran tamaño muestral, con el fin de estudiar la eficacia y la seguridad del nuevo fármaco. Cuando el patrocinador obtiene resultados que justifican la aprobación del fármaco, solicita una aplicación de un fármaco nuevo.¹⁷

En la **fase IV**, se produce la utilización del nuevo fármaco en una población abierta. Se debe seguir vigilando la eficacia y la seguridad del fármaco en las condiciones reales de uso.¹⁷

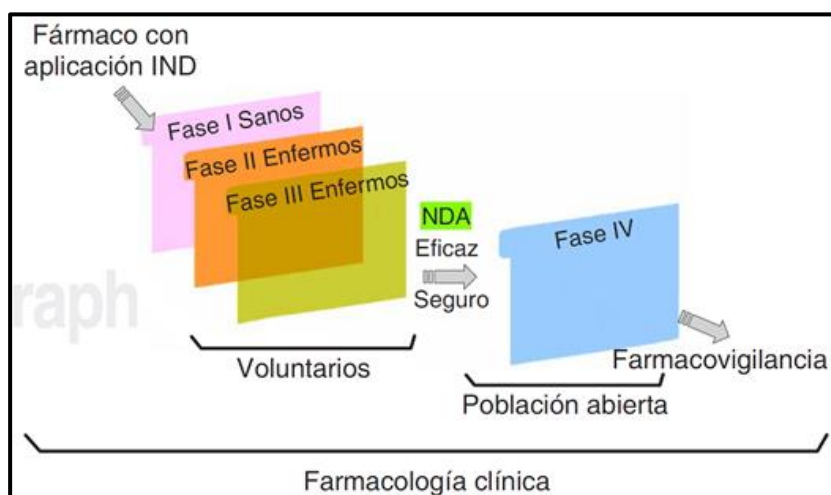


Ilustración 23. Fases secuenciales de los ensayos clínicos de nuevos fármacos.¹⁷

3.2. INTRODUCCIÓN A LOS ANTIVIRALES.

Debido a la grave situación que estamos viviendo, necesitamos tratamientos eficaces de forma rápida. Gracias a otros antecedentes de *coronavirus*, existen ya tratamientos que podrían servir para combatir el *SARS-CoV-2*. Además, nuevas sustancias no utilizadas previamente para otros microorganismos también están siendo estudiadas.⁵

Un grupo de fármacos con potencial para combatir el *SARS-CoV-2* son los análogos de nucleótidos, en concreto, el **remdesivir**, utilizado previamente contra el *virus del Ébola*, *Filovirus* y *Paramixovirus*. Ha demostrado su eficacia en *MERS-CoV* y *SARS-CoV*. Otro ejemplo, es la combinación de **lopinavir (LPV)** y **ritonavir (RTV)**, que ha

demostrado ser eficaz contra el *SARS-CoV*, sin embargo, contra *MERS-CoV* sigue siendo controvertida. Debido a que los *coronavirus* producen inflamación en el hospedador, se han observado mejorías en pacientes con *MERS-CoV* tratados con **interferón beta**. En un estudio experimental que comparaba remdesivir con **LPV/RTV-IFN-beta**, remdesivir mejoraba la función pulmonar, las cargas virales pulmonares y la patología pulmonar severa en ratones infectados con *MERS-CoV* humano transgénico mientras que, LPV/RTV- IFN-beta mejoró la función pulmonar, pero no redujo la replicación del virus o el pulmón afectado severamente.⁵

La **ribavirina**, un análogo de la guanosina, utilizada para tratar virus como el VSR y VHC; los datos obtenidos han sido contradictorios en pacientes con *MERS-CoV*, a pesar de que fueran buenos en macacos. Además, reduce las concentraciones de hemoglobina.⁵

Gracias al conocimiento adquirido con el *virus Influenza* (anticuerpo IgG1 MHAA4549A), se piensa que el uso de **anticuerpos monoclonales y policlonales** podría ser útil. Hasta la fecha, los estudios de anticuerpos monoclonales son contra el *MERS-CoV*, sin embargo, no han dado resultados muy alentadores.⁵

Por otro lado, como hemos comentado antes, existe un estado proinflamatorio en las enfermedades producidas por *MERS-CoV* e *Influenza*. Por lo tanto, **inmunosupresores** como los corticoides han sido utilizados en formas graves de la enfermedad. Sin embargo, podrían elevar por otro lado el riesgo de sobreinfección, replicación y muerte.⁵

La mayoría de los fármacos aprobados por la FDA son fármacos de venta libre en países en desarrollo, por lo que se pueden comprar sin receta. Por lo tanto, su consumo puede ser intensivo o ser utilizados para tratar enfermedades leves o moderadas.¹⁸

Para identificar las concentraciones adecuadas para definir la actividad antiviral de las drogas, se calcula la mitad de la concentración máxima citotóxica “CC₅₀” para cada fármaco individual. El cribado antiviral reveló que un gran número de drogas testadas por la FDA mostraban actividad *in vitro* contra *NRC-03-nhCoV* y tenían prometedoras actividades antivirales con un índice alto de selectividad (>100) para actividad antiviral relacionada con la toxicidad celular.¹⁸

3.3. FÁRMACOS CONTRA EL SARS-COV-2.

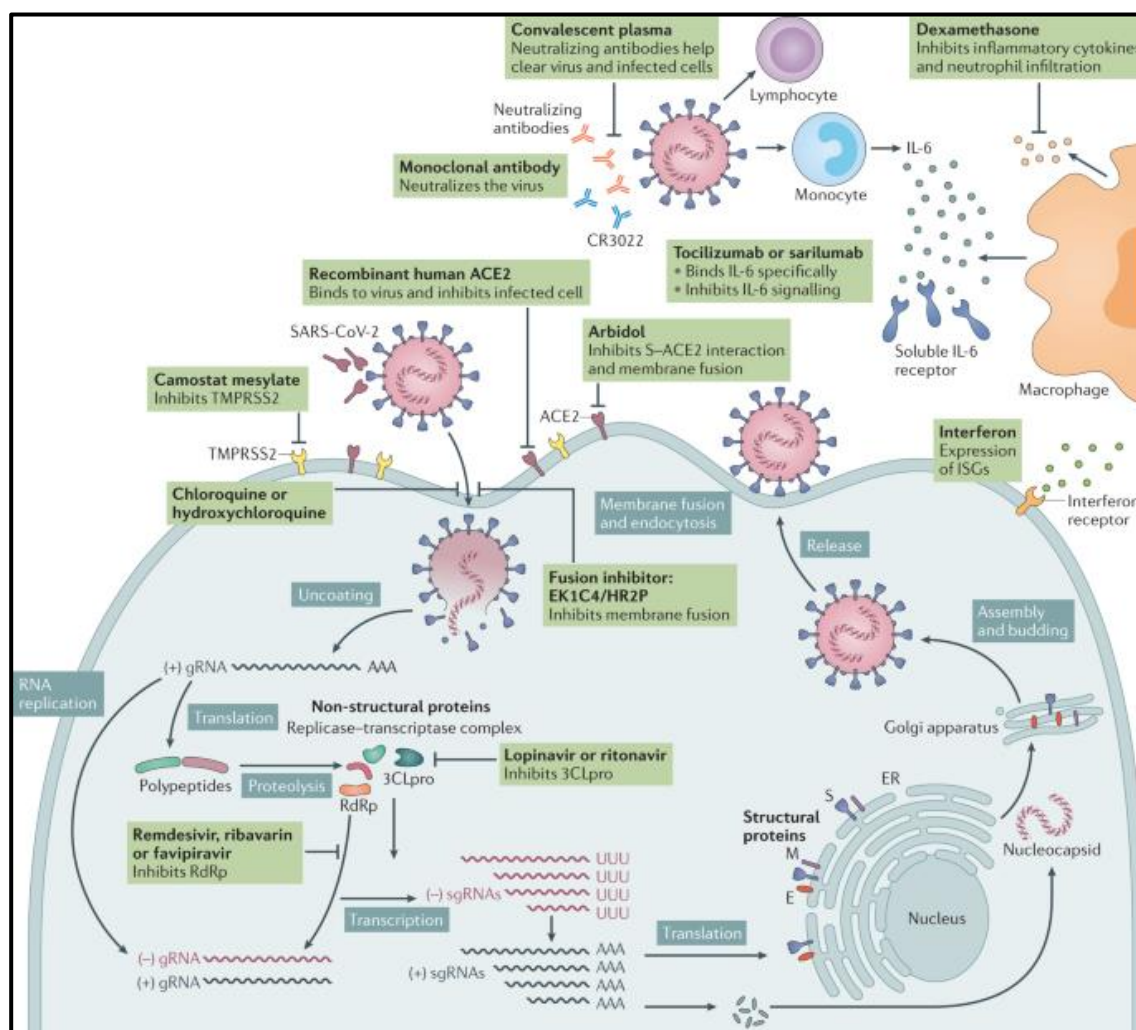


Ilustración 24. Mecanismo de acción de los principales antivirales del SARS-CoV-2.¹⁹

DIRIGIDOS CONTRA LA POLIMERSA DEPENDIENTE DE RNA (RDRP).

La **RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp)** es una enzima conservada en varios *coronavirus*, por lo que, es una diana interesante para el tratamiento. Los **análogos de nucleósidos** son compuestos cuya diana es la RdRp.⁶ Los análogos de nucleótidos y nucleósidos bloquean la replicación del virus inhibiendo la actividad de RdRp. Actúan en tres niveles: en primer lugar, en la incorporación de análogos de nucleótidos por la polimerasa, induciendo terminación temprana. En segundo lugar: incorporación de nucleótidos durante la síntesis, produciendo errores. En tercer lugar: afectación de la RdRp por el desequilibrio entre los nucleótidos generado por el agotamiento de algún nucleótido. Sin embargo, los *coronavirus* poseen exonucleasas con actividad correctora. En estudios *in vitro*, la polimerasa de SARS-CoV puede incorporar **ribavirina**, pero es detectada a su vez por la exonucleasa NSP14, que la elimina. Esto explicaría el débil efecto de la ribavirina.¹⁰

Remdesivir es el antiviral más prometedor. Es un pronucleótido de adenosina que se administra de forma intravenosa. Se metaboliza a 1-ciano-nucleótido, lo que hace que sea más activo contra las RdRp que frente a las polimerasas humanas. Remdesivir ha demostrado actividad contra *SARS-CoV* y *MERS-CoV* *in vitro* e *in vivo* (animales).¹¹ Los ensayos iniciales realizados en cultivos de células Vero-E6 demostraron actividad antiviral del **remdesivir** en la fase post-entrada a la célula, con una EC₅₀ de 1,76 µM.²⁰

Por otro lado, remdesivir en primates infectados con *SARS-CoV*, mostró que su actividad depende del tiempo que tardemos en administrarlo tras la infección. Remdesivir se incorpora al ARN naciente por el complejo *SARS-CoV-2* RdRP. En varios ensayos clínicos (programa clínico europeo DISCOVERY), se evaluó la eficacia en pacientes hospitalizados con COVID-19. Los resultados mostraron una mejora clínica en el 68% de los pacientes tratados con remdesivir en una cohorte pequeña (n=53). Sin embargo, no eran estudios aleatorizados y no se informó del cambio de la carga viral tras el tratamiento. Algunos efectos secundarios fueron alteración de función hepática, diarrea, erupciones cutáneas, deterioro e hipotensión.¹⁰

En otro estudio, **remdesivir** se evaluó en pacientes con Ébola y COVID-19, comenzando con una dosis inicial de 200mg el día 1, seguida de una dosis diaria de 100 mg durante un periodo de 5-10 días. Sin embargo, los resultados preliminares de un estudio realizado con 237 pacientes en Hubei, China, no mostraron beneficios en la clínica, mortalidad y aclaramiento del virus en pacientes con COVID-19 frente al placebo. Sin embargo, los autores del estudio lo interpretan como una limitación por el pequeño tamaño de la muestra. Más recientemente, los resultados de un ensayo clínico multicéntrico de 1063 pacientes han demostrado que el remdesivir reduce significativamente el tiempo de recuperación, pero sin alteraciones significativas en la mortalidad. Además, no hay diferencias significativas entre tratar 5 o 10 días. En resumen, se puede afirmar que los resultados de ensayos recientes apoyan un beneficio limitado del remdesivir en el tratamiento de la infección por *SARS-CoV-2*, sobre todo, en pacientes con enfermedades severas que requieren oxígeno suplementario, ventilación mecánica o membrana extracorpórea de oxígeno.¹¹

Remdesivir ha demostrado ser un potente inhibidor de *SARS-CoV-2* en bajas concentraciones (EC₅₀ de 0,77 µM). Un estudio de un solo paciente con COVID-19 describió una mejora clínica después del uso intravenoso de remdesivir en los EE.UU. En otro ensayo, se observó mejoría clínica en 36 de los 53 pacientes tratados con remdesivir con una dosis de 200 mg intravenosa el día 1 más 100mg/día los siguientes 9 días. Sin embargo, la eficacia debe ser estudiada mejor en estudios aleatorizados. A pesar de los resultados, un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado, con 233 pacientes mostró que usar remdesivir no está asociado significativamente con beneficios clínicos, aunque tuvieron una reducción no significativa del tiempo de los síntomas comparado con el placebo.² En mayo de 2020 se autorizó como tratamiento de emergencia contra el *SARS-CoV-2*.¹⁰

En otro estudio aleatorizado, multicéntrico, con doble ciego el **remdesivir** demostró una mejoría en la reducción de la carga viral durante la infección, pero sin una considerable reducción de la tasa de mortalidad comparado con pacientes que recibieron placebo.²⁰

Gilead Sciences ha iniciado dos ensayos clínicos fase III para evaluar la eficacia de **remdesivir** en 1000 pacientes COVID-19 de todo el mundo. Este estudio analiza la eficacia y la seguridad en dos categorías, un primer régimen de 5 días y un segundo de 10 días de remdesivir. Se vio que el uso de remdesivir en pacientes con COVID-19 severo tenía un 68% de beneficio clínico, sin embargo, el 13% murieron. La elevación de enzimas hepáticas, diarrea, erupción cutánea, insuficiencia renal e hipotensión fueron los efectos adversos más comunes. Dado que esto se realizó en una pequeña muestra, se deben realizar más estudios para confirmar el beneficio en pacientes con COVID-19 severo.²¹

Un estudio multicéntrico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo se realizó en 10 hospitales diferentes, en el cual se incluyeron 237 pacientes con COVID-19 en abril de 2020²². Se les asignó en una proporción 2:1, o bien remdesivir i.v. (200mg de remdesivir en el primer día seguido de 100mg por día durante 10 días) o placebo con las mismas condiciones de administración. Los pacientes a los cuales se les administró remdesivir mostraron una mejoría más rápida,²¹ (sin embargo, no significativa).²² No obstante, el tratamiento con remdesivir se detuvo en el 12% de los casos por los efectos adversos (solo un 5% en placebo). A pesar de que los fármacos antivirales han mostrado más eficacia en estadios tempranos de infección, remdesivir ha demostrado ser un buen tratamiento en fases tardías de la COVID-19.²¹

Un informe de Beigel et al. mostró que el **remdesivir** reducía el tiempo de recuperación de 15 a 10 días de media en pacientes hospitalizados con SARS-CoV-2. Además, los pacientes tratados con remdesivir tuvieron casi la mitad de probabilidad de morir calculado por Kaplan-Meier. Incluso antes del informe final del estudio, la agencia que regula la Administración de Fármacos y Alimentos de EE.UU. (FDA) aprobó remdesivir para uso de emergencia. Se recomendó para uso en pacientes de 12 años o más y que pesasen al menos 50 kg, con una pauta de un ciclo de 5 días en infecciones leves a moderadas y un ciclo de 10 días en infecciones severas que requieran ventilación mecánica. Es importante destacar que el fabricante de remdesivir ha informado que usar de forma paralela remdesivir e **hidroxicloroquina** puede inhibir el efecto de remdesivir y reducir tanto la tasa como la probabilidad de recuperación en pacientes que reciben ambos fármacos, lo que ha causado mucha controversia.²³

Remdesivir fue el primer fármaco utilizado en EE.UU. , el 7 enero de 2020, en el estado de Washington, donde surgió el primer paciente con COVID-19. El paciente eliminó el virus del tracto respiratorio el día 12. El uso de forma compasiva en casos severos de COVID-19 mostró una mejoría clínica en el 68% de los pacientes. Un ensayo clínico aleatorizado con 1063 pacientes reveló resultados positivos con respecto al tiempo de recuperación en pacientes hospitalizados con COVID-19. Basado en estos datos, la FDA aprobó remdesivir para pacientes hospitalizados con COVID-19. El mayor beneficio del remdesivir parece estar en la duración de la enfermedad. Más recientemente, remdesivir fue uno de los medicamentos estudiados en base a la mortalidad en el hospital en un ensayo multicéntrico aleatorizado controlado (SOLIDARITY). En este estudio, remdesivir no mostró ningún beneficio en la mortalidad en el hospital. Esto ha provocado modificaciones en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que no recomienda el uso de remdesivir en pacientes hospitalizados.²²

El **análogo de citidina beta-d-N4-hidroxicitidina (NHC)** inhibe la replicación de *MERS-CoV*, *SARS-CoV* y *SARS-CoV-2 in vitro* en un rango micromolar de 0,09-0,3 μ M sin interferencia de la exonucleasa. Por otro lado, mejoró la función pulmonar y redujo el título de virus y la pérdida de peso corporal en ratones infectados con *SARS-CoV* y *MERS-CoV*.¹⁰

El **favipiravir**, análogo de la guanina, utilizado contra el virus de la gripe y otros virus como el Norovirus, Filovirus, o Ébola. En un estudio de favipiravir frente un grupo control, se vio que la eliminación viral era más rápida en el brazo con faviparivir. Este actúa combinándose con la terminación de la cadena ralentizando la síntesis de RNA e induciendo una mutagénesis letal. ⁵ En un estudio diseñado para evaluar la actividad contra *SARS-CoV-2* que incluía favipiravir *in vitro* en células Vero E6 infectadas con *SARS-CoV-2*, se demostró actividad a una EC₅₀ de 61,88 μ M y una semiconcentración tóxica por encima de 400 μ M. En contraste, Choy et al. mostró que concentraciones por debajo de 100 μ M no tenían efecto contra *SARS-CoV-2 in vitro*.¹

Recientemente, estudios preliminares han mostrado que, aunque favipiravir mejora el tiempo sintomático de fiebre y tos, no mejora la tasa de recuperación general en comparación con el umefenovir.²² Un estudio controlado, no aleatorizado y abierto examinó el efecto de **favipiravir y lopinavir/ritonavir** en 80 pacientes con COVID-19. El estudio estaba compuesto de dos brazos, uno con 35 pacientes tratados con favipiravir (día 1: 1600 mg dos veces al día y del día 2 al 14: 600mg dos veces al día, más 5 kU de IFN- α dos veces al día) y otro con lopinavir/ ritonavir como grupo control (día 1-14: 400mg/100mg dos veces al día más 5 kU de IFN- α dos veces al día). Favipiravir se asoció con un aclaramiento viral más rápido, mejoría significativa de las imágenes de tórax y menos efectos adversos.^{1,22} La conclusión, es que no hay resultados definitivos para usar este fármaco de rutina para tratar pacientes con COVID-19.²²

Entecavir es un análogo de la guanina que inhibe directamente la replicación del virus de la hepatitis B, bloqueando su transcriptasa reversa. Ha sido considerado como un posible inhibidor de RdRp y de la proteasa principal de *SARS-CoV* y *SARS-CoV-2*.²⁰

Ribavirina es un análogo de la guanina y puede inhibir la polimerasa RNA dependiente de RNA. Ha sido aprobada su actividad contra otros *coronavirus*. Existen resultados contradictorios respecto la infección COVID-19. Un estudio *in vitro* demostró que combinaciones de dosis altas de ribavirina (1,2-2,4 oral cada 8 horas) son necesarias para inhibir la replicación viral. De 30 ensayos clínicos de ribavirina, 26 mostraron ineffectividad en la infección por *SARS-CoV* y en 4, se observaron algunos efectos adversos incluyendo toxicidad hematológica y hepática. Con respecto al *MERS*, no se evidenció ninguna mejora clínica o en el aclaramiento viral.²⁴

Se evaluó la eficacia y seguridad de la combinación **interferón beta-1b, ritonavir/lopinavir y ribavirina** para tratamiento con COVID-19. Este estudio de fase II se llevó a cabo en seis hospitales en Hong Kong en pacientes con COVID-19. Fue un estudio multicéntrico, prospectivo, abierto y aleatorizado. Comparado con otros tratamientos, esta triple terapia fue efectiva, disminuyendo el periodo de hospitalización de pacientes agudos y en pacientes leves-moderados con COVID-19. Además, redujo los síntomas y la duración de la diseminación viral.²⁴

DIRIGIDOS CONTRA A 3CLpro/PLpro.

La replicación del *SARS-CoV-2* depende de la escisión de las poliproteínas en RdRp y helicasa gracias a la 3-quimiotripsina-like proteasa (3CLpro) y la papain-like proteasa (PLpro). De estas dos, **3CLpro** es la proteasa responsable del procesamiento, por lo que, de nuevo, varias sustancias podrían actuar inhibiéndola. **PLpro** es capaz de alterar la ubiquitina y el gen estimulado por el interferón 15 (ISG15) de la célula hospedadora, ayudando la evasión de los *coronavirus* de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, hasta la fecha, ningún compuesto que actúe por este mecanismo ha sido aprobado.¹¹

El **lopinavir** y el **ritonavir** son ambos inhibidores de aspartato proteasas empleados contra el VIH. Se emplean juntos, porque, ritonavir aumenta la vida media de lopinavir por inhibir el citocromo p450.¹⁰ Durante la epidemia de 2003 del síndrome respiratorio agudo severo (*SARS-CoV*), se probaron *in vitro* y mostraron actividad inhibitoria.² Dificultan la propagación del *SARS-CoV-2* en células y están siendo aprobados en varios ensayos clínicos.¹⁰

Se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos sobre lopinavir/ritonavir en pacientes con COVID-19. Los primeros pacientes estudiados fueron el 18 de enero de 2020. Inicialmente, los datos clínicos no expresaron ningún beneficio clínico, aunque, estudios publicados posteriormente demostraron un impacto inhibitor *in vitro*. Su eficacia clínica es bastante limitada, lo que hace recomendar no usarlos. En un estudio en el que se combinó con interferón beta-1b y ribavirina, demostró reducir la recuperación de doce a siete días, si tratamos de manera temprana a los pacientes tras la infección.¹¹

Una cohorte retrospectiva fue realizada por Chan et al para investigar posibles beneficios y efectos adversos de esta combinación (lopinavir/ritonavir) en el tratamiento del SARS con el protocolo estándar. Mostraron que, como tratamiento inicial, el protocolo usado hasta ahora reducía significativamente la muerte, y la tasa de incubación en comparación con otra cohorte que recibió solo tratamiento estándar. Otro estudio de 2004 sugirió que lopinavir/ritonavir comparado con el grupo control, que recibió ribavirina, reducía la carga viral y los resultados clínicos adversos en pacientes con SARS. Un estudio de un solo paciente, en fase inicial de brote de *SARS-CoV-2* en Corea, al que se le administró esta combinación, disminuyó la carga viral sin observarse pequeños títulos de *coronavirus* en el seguimiento.²

Sin embargo, en otro estudio aleatorizado, controlado, abierto, de 199 pacientes hospitalizados por *SARS-CoV-2*, la combinación de lopinavir/ritonavir no mostró beneficio alguno.² Según *Baden y al.* el beneficio de este fármaco podría no haberse visto en diversos estudios porque los pacientes tratados presentaban una infección en estadio avanzado y, por lo tanto, la concentración de fármaco necesaria para inhibir el virus en la circulación pulmonar podría ser mayor a los niveles séricos. Cuando ha sido estudiado en el ensayo clínico SOLIDARITY, no ha mostrado ningún beneficio en la mortalidad hospitalaria.²²

La **ivermectina** es un antiparasitario que también ha demostrado tener actividad antiviral frente al *virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)* y el *Dengue*. Se dirige a la sustancia de transporte nuclear del hospedador, el heterodímero importina alfa/beta1 encargado de la replicación y ensamblaje de nuevos viriones, sin embargo, no está claro aún que sea activa contra el *SARS-CoV-2*.² La ivermectina inhibe *SARS-CoV-2* con una reducción de 5000 veces del nivel de ARN viral después de 48 horas. Un estudio observacional constató el aumento de la supervivencia durante la hospitalización, pero sin aportar datos de carga viral. Además, se ha visto recientemente que la dosis empleada como antiparasitario no es eficaz contra el *SARS-CoV-2*.¹⁰

Este fármaco ha demostrado inhibir la replicación de *SARS-CoV-2 in vitro* durante un máximo de 48 horas a una concentración de 5 μM . La IC_{50} ha sido determinada como 2 μM , que es mucho más alta que la concentración máxima que se alcanza en plasma. En estudios con las dosis aprobadas por la FDA (200mg/kg), se vio que no alcanzaban la IC_{50} en los pulmones al administrarlo de forma oral y entonces la eficacia bajaba. Además, estudios con animales han mostrado niveles tres veces más altos en los pulmones que en el plasma una semana después de administrar la dosis. La conclusión es que son necesarios más estudios.²

Una cohorte retrospectiva observacional realizada por Rajter et al, en 2021 en cuatro hospitales de Florida, revisó las historias clínicas de pacientes con COVID-19 tratados con y sin **ivermectina**. El análisis mostró una mortalidad menor en el grupo de la ivermectina (15% contra 25%, OR=0,52, P=0,03) y fue menor en pacientes con enfermedad severa (38,8% contra 80,7%, p=0,001).²⁵

Se realizó un estudio realizado por Alam et al. con una combinación de ivermectina con doxiciclina para tratar pacientes con COVID-19. 100 pacientes (64 hombres y 36 mujeres) fueron incluidos en el estudio, y fueron analizados a los días 4 y 18 de empezar la medicación. Basados en los resultados obtenidos por RT-PCR y otros métodos de screening, la combinación de ivermectina y doxiciclina demostró mejor aclaramiento viral en pacientes con COVID-19 con síntomas leves y moderados. Otro estudio, realizado por Rahman et al., donde se comparó el aclaramiento viral entre las combinaciones ivermectina/doxiciclina e hidroxiclороquina/azitromicina en pacientes con COVID-19 dio como resultado que se producía una mayor reducción de la carga viral, determinada por RT-PCR, con la primera combinación.²⁴

GC376 es la sal de un dipéptido usada en ensayos contra el *picornavirus* con acción sobre la proteasa viral. En un estudio en gatos infectados gravemente de *coronavirus*, se vio que reducía significativamente la carga viral y los síntomas. Disminuyó los niveles de RNA viral en macrófagos de gatos, y también hizo que los individuos volvieran a su estado clínico basal. Además, se ha demostrado que es capaz de bloquear proteasa 3C-like del *PEDV* en células Vero. En este caso, los estudios confirmaron una IC_{50} de 1,11+/- 1,13 μM . Recientemente, este inhibidor ha sido testado contra *SARS-CoV-2* en estudios con FRET basados en ensayos de screening dirigidos contra la enzima M_{pro} con confirmación de acoplamiento molecular, así como comprobación de efectos antivirales en células Vero E6 con EC_{50} de 0,91 +/- 0,03 μM . Otros estudios han demostrado que tiene un potente efecto inhibidor de la proteasa 3C-like comparado con otras drogas. **PF-00835231** es una cetona diseñada para inhibir el

virus SARS-CoV. Recientemente, dos estudios revelaron que es un potente inhibidor, el cual ha sido testado en un ensayo por FRET y con actividad antiviral en Vero E6 con una IC_{50} 0,00027 +/- 0,0001 μ M para proteasa 3C-like. Ha demostrado ser más potente que remdesivir en ensayos con células infectadas con SARS-CoV-2 A549^{+ECA2} con una EC_{50} de 0,221 μ M a las 24h y 0,158 μ M a las 48h sin detectarse citotoxicidad.²⁰

Darunavir es un inhibidor de proteasa de VIH indicado en pacientes con historia previa de terapia antirretroviral. En estudios *in silico*, se ha visto que este fármaco puede actuar como inhibidor de proteasas e interactuar con la proteinasa 3C-like. Además, darunavir puede también, unirse a proteínas de SARS-CoV-2 del complejo de replicación. *In vitro*, ha mostrado potencial inhibidor para SARS-CoV-2. Sin embargo, todavía no ha mostrado actividad antiviral contra SARS-CoV-2 en concentraciones clínicas.²⁰

Doxiciclina y otras tetraciclinas han demostrado propiedades antiinflamatorias para diversas enfermedades inflamatorias de la vía aérea. Doxiciclina parece ser una correcta alternativa para la azitromicina. De hecho, *in vitro* ha mostrado efectos antiinflamatorios a bajas dosis (220-40mg/día) y a altas dosis (100 o 200 mg/día) con acción inhibitoria de metalo-proteasas, en particular de MMP-9, necesaria para la entrada viral en la célula. Doxiciclina también modula las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- α . Además, bajas dosis de doxiciclina han demostrado inhibir la expresión de CD147/EMMPRIN, necesario para la entrada de SARS-CoV-2 en linfocitos T. Los análisis estructurales informaron que la doxiciclina tiene el potencial de inhibir PLpro y 3CLpro. Debido a los riesgos de la hidroxicloroquina y la azitromicina en combinación, la doxiciclina podría ser una mejor alternativa a la azitromicina. Paul A et al. publicaron series de cuatro pacientes con infección por COVID-19 y enfermedad pulmonar conocida, los cuales fueron tratados con dosis de doxiciclina de 5 a 14 días. Se administró una dosis estándar de 100mg dos veces al día o diariamente. Esta serie de casos fue la primera relación entre la administración de doxiciclina y la posible reducción de la gravedad de los síntomas en pacientes con COVID-19. A pesar de la seguridad de la doxiciclina, el uso generalizado de este medicamento no se recomienda para el tratamiento de pacientes con COVID-19, a menos que esté bajo la dirección y supervisión de un médico.²⁴

DIRIGIDOS CONTRA EL COMPLEJO ECA2-PROTEINA S.

La unión de la proteína S con el ECA2 es un paso fundamental para la invasión celular del virus. Tras este paso, la proteína S debe activarse mediante la escisión del complejo ECA2-S. Este proceso puede llevarse a cabo de forma inmediata por la TMPRSS2 en la superficie celular o tras la entrada en la célula por vía endosomal y la cathepsina L.¹¹ Un estudio *in vivo*, ha mostrado que la inhibición de la vía renina/angiotensina produce sobreexpresión de ECA2, aumentando la susceptibilidad.¹⁰

A continuación, vamos a explicar diferentes tipos de fármacos que actúan frente el complejo ECA2-S de forma directa o indirecta. Para ello, los vamos a dividir en dos, aquellos que actúan sobre la vía **TMPRSS2** y los que actúan sobre la vía de entrada endosomal y la **cathepsina L**.

INHIBIDORES DE TMPRSS2:

Mesilato de camostat es un inhibidor de serina-proteasa que actúa frente a TMPRSS2 y se emplea en el tratamiento de pancreatitis en Japón. Inhibe el SARS-CoV-2 en células del pulmón humano.²⁶ Se administra de forma oral. El mesilato de camostat inhibe numerosas proteasas como la tripsina, calicreína plasmática, trombina, plasmina y esterasas C1r y C1. Sin embargo, este compuesto no es tan eficaz *in vivo* como *in vitro*, pudiendo no ser suficiente la dosis utilizada *in vitro*.¹¹ Está siendo estudiado en numerosos ensayos clínicos y no se sabe que concentraciones son suficientes para inhibir la propagación viral. Se ha probado también con mesilato de gabexato y mesilato de nafamostat.²⁶

Mesilato de nafamostat es un inhibidor de proteasa aprobado en la inhibición de proteasas como factor VIIa, XIIa, trombina, complemento y tripsina para tratar la CID.¹¹ La infección severa del COVID-19 está asociada con alteraciones en la coagulación y podrían beneficiarse del tratamiento con mesilato de nafamostat. Debe administrarse por vía intravenosa por su baja biodisponibilidad.¹¹

Todos estos compuestos han sido aprobados para uso humano en Japón. Un estudio que comparaba las acciones antivirales de los tres compuestos reveló que ninguno interfería en la viabilidad celular o en la entrada a la célula hospedadora mediante glicoproteínas del *virus de la estomatitis* o *Machupo virus*, que sirvieron como controles negativos. **Mesilato de gabexato** inhibió ligeramente la entrada a la célula hospedadora del SARS-CoV-2, mientras que mesilato de camostat suprimió su entrada fuertemente. **Mesilato de nafamostat**, el cual ha sido aprobado por la FDA para indicaciones distintas al *coronavirus*, inhibe la entrada del SARS-CoV-2 en las células hospedadoras con una eficacia 15 veces superior al **mesilato de camostat**, con una EC₅₀ en rango nanomolar. Además, mesilato de nafamostat bloqueó SARS-CoV-2 en células pulmonares humanas con mayor eficacia que el mesilato de camostat, mientras que ninguno fue activo frente la infección por el virus de la estomatitis vesicular.²⁶ Sin embargo, en células Vero6 infectadas por SARS-CoV-2 es menos eficaz, debido a que otras proteasas como la furina o la catepsina L están implicadas en la activación de la proteína S del SARS-Cov-2 en esta línea celular.²⁶

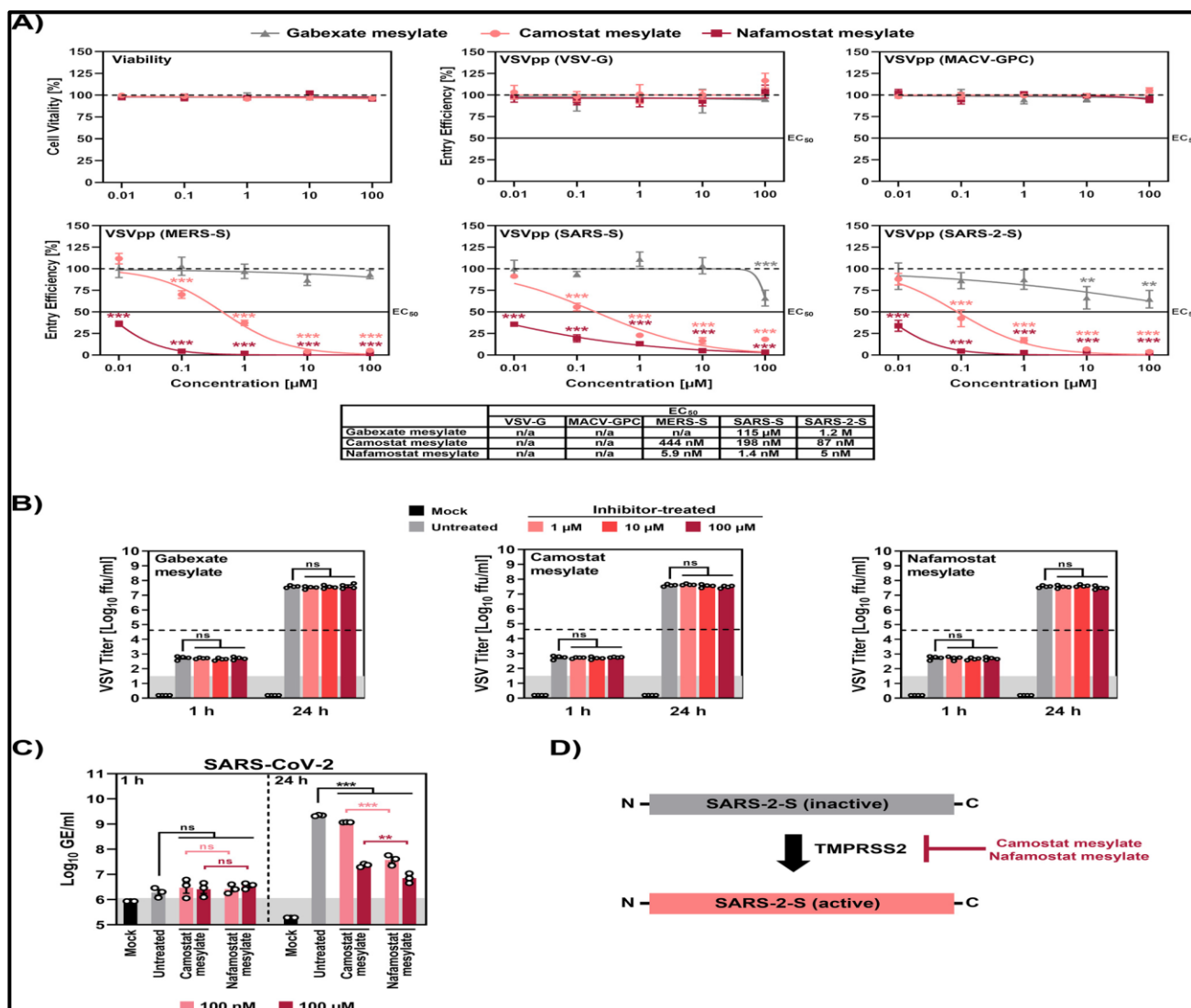


Ilustración 25. Mesilato de nafamostat inhibe la infección de SARS-CoV-2 en células pulmonares en rango nanomolar. Las células derivadas pulmonares Calu-3 fueron incubadas con las concentraciones indicadas de inhibidores de serin proteasa. (A) se midió la viabilidad celular o se inoculó a las células con partículas del virus de la estomatitis. La eficacia de la entrada viral se determinó a las 16 horas, midiendo la actividad luciferasa en lisados celulares. Paralelamente, las células expuestas a inhibidores de serina proteasa se infectaron con el virus de la estomatitis vesicular que codificaba una proteína fluorescente (B) o con SARS-CoV-2 (C) y se midió la eficiencia mediante un ensayo y midiendo las copias de genoma por RT-PCR, respectivamente.²⁶

INHIBIDORES DE LA VÍA ENDOSOMAL Y LA CATEPSINA L. LISOSOMOTROPISMO.

Hasta la fecha, ningún inhibidor de la catepsina L ha sido aprobado. No obstante, algunos compuestos parecen inhibir la catepsina L como la clofazimina, y la rifampicina. Se han realizado experimentos con antibióticos glucopéptidos (teicoplanina, dalbavancina) que muestran que son inhibidores de la catepsina L.¹¹

En estudios con células Vero E6 en las cuales la entrada del virus puede ser tanto por implicación de la Catepsina L como de TMPRSS2, el tratamiento con inhibidores de

la cathepsina L como E-64d o con camostat no es suficiente. Sin embargo, si los combinamos, se inhibe fuertemente su entrada en la célula hospedadora. Por otro lado, el tratamiento con cloruro de amonio lisosomotrópico (eleva el pH) fue eficiente para prevenir SARS-CoV-2 en células con independencia de TMPRSS2. Estudios con mesilato de nafomostat indicaron que en células con expresión de TMPRSS2 es muy eficaz, sin embargo, en células con baja expresión casi no lo es. Por lo tanto, estos estudios demostraron que los inhibidores de TMPRSS2 son únicamente eficaces en infecciones por SARS-CoV-2 si la entrada a las células infectadas únicamente está mediada por TMPRSS2. Además, la eficacia de los inhibidores de TMPRSS2 son muy dependientes del momento en el que se aplique durante la enfermedad. En células que expresaban TMPRSS2, la EC₅₀ fue 500 veces menor en células pretratadas que en no tratadas previamente. Si la TMPRSS2 no se expresaba, EC₅₀ era 3000 veces más alto.¹¹

Umifenovir (arbidol) es un derivado ácido carboxílico usado para el tratamiento de la profilaxis e infecciones asociadas con *HQNQA* y *B arbovirus*. Actúa bloqueando la fusión del virus con la membrana celular y con el endosoma, a través de la incorporación a las membranas celulares y la interferencia con los fosfolípidos. Esta molécula ha mostrado actividad contra SARS-CoV. La combinación con lopinavir/ritonavir muestra incremento de la tasa de conversión negativa del SARS-CoV-2 y mejora los resultados de la TAC de tórax. Sin embargo, comparados con favipiravir, demostraron una menor recuperación de los síntomas. Por otro lado, otro estudio evaluó los efectos antivirales de lopinavir/ritonavir y arbidol en 50 pacientes con COVID-19. Fueron divididos en dos grupos: un grupo de 34 casos con lopinavir/ritonavir y un grupo de arbidol de 16 casos. El arbidol se administró en dosis de 0,2g tres veces al día. En los pacientes de este último grupo se observó mayor decaimiento de los niveles de RNA viral en comparación con el otro grupo.²

Umifenovir (arbidol) ha demostrado que puede reducir las incidencias de neumonía en población hospitalizada de alto riesgo. Además, el arbidol podría estar asociado con un descenso de la infección en personas con COVID-19. *In silico*, muestra actividad contra varias dianas de SARS-CoV-2, Mpro y la proteína S.²⁰ Los estudios de Zhen Zhu et al. han mostrado que arbidol en monoterapia es más efectivo que lopinavir/ritonavir para tratar pacientes con COVID-19. Sin embargo, de forma contraria, Deng informó que la eficacia de la combinación con lopinavir/ritonavir es mayor que si se añade además arbidol.³⁰

El **lisosomotropismo** es una característica biológica de pequeñas moléculas que les permite acumularse en lisosomas interfiriendo con la vía endosomal. Normalmente, son moléculas con carácter de base débil. Las concentraciones intralisosomales pueden llegar a ser cien veces mayores que las citoplasmáticas. El lisosomotropismo es una característica biológica independiente de los efectos farmacológicos. Como se acumulan en los lisosomas pueden incrementar el pH de 4,5-5 a 6-6,5, debido al carácter básico. Como hemos comentado anteriormente, la ruta endosomal es muy importante para la entrada del SARS-CoV-2 en la célula, así como la correcta acidificación lisosomal para activar la cathepsina L. Para que sean efectivos deben tener un IC₅₀ de desplazamiento de 10 µM. Además, estos compuestos poseen una actividad inhibitoria frente al síndrome de tormenta de citocinas. En un estudio *in vitro*, la **tripsina** demostró que puede anular la escisión provocada por la cathepsina L, haciendo que el virus entre en la célula por la

otra vía en la que está implicada la TMPRSS2. Además, células con bajo nivel de ATP no pueden proporcionar catepsina L activa.¹¹

La **cloroquina** ha sido investigada en estudios con SARS-CoV. La cloroquina tiene efectos antivirales pre y post-infección.¹¹ Se han propuesto tres mecanismos en los que actúan la **hidroxicloroquina** y la **cloroquina**: el primero interfiere en la glicosilación terminal del receptor celular ECA2 previendo su unión al virus. En segundo lugar, aumentan el pH de los lisosomas, lo que dificulta la endocitosis y liberación. Tercero, pueden perturbar el proceso de ensamblaje y de síntesis de proteínas.² Sin embargo, los niveles de ECA2 no se modifican en la superficie. Esta actividad puede afectar la entrada por la vía endosomal, la replicación y ensamblaje. En 1984, se estudió la cloroquina en células infectadas con *Sindbis virus*. Cuando se administraba al principio de la patogenia, se vio que inhibía la síntesis de RNA. En 2005, en estudios *in vitro*, se encontró que inhibía la infección de SARS-CoV en células Vero E6 siendo dosis dependiente, empezando en 0.1µM hasta 10 µM que lo inhibía completamente. A partir de 2019, se ha empezado a experimentar con el SARS-CoV-2.¹¹

En un estudio por Braz et al. (2020), cloroquina e hidroxicloroquina se acoplaron usando Autodock Vina con diferentes estructuras del SARS-CoV-2:²⁷

Sl. no	Entry	Binding affinities (kcal/mol)			
		M ^{pro}	CTSL	ACE2	RBD
1.	CQ	-7.9	-5.4	-4.2	-4.2
2.	HCQ	-6.5	-5.2	-8.5	-6.5

Ilustración 26. Afinidades de cloroquina e hidroxicloroquina con las proteínas virales de SARS-CoV-2.²⁷

La primera indicación de efecto sobre el SARS-CoV-2 de la cloroquina viene de un estudio durante el brote en China. En este estudio, los resultados de más de 100 pacientes demostraron que la cloroquina inhibía la exacerbación de neumonía, mejoraba las imágenes pulmonares, promovía la conversión a virus negativo y acortaba el curso de la enfermedad. La hidroxicloroquina es un derivado que ha mostrado menos IC₅₀ para inhibir a SARS-CoV-2 *in vitro*.² Ensayos recientes han demostrado que la hidroxicloroquina oral (600mg/día) se asocia significativamente con una reducción/desaparición de la carga viral de forma significativa en pacientes con SARS-CoV-2. Por otro lado, la **cloroquina** es capaz de suprimir la tormenta de citocinas y atenuar la transición hacia una enfermedad severa. Modula la expresión génica de mensajeros inflamatorios como IL-1B IL-23A, CCL4, CCL20 e IL-6 y tiene efectos beneficiosos en infecciones en las que están presentes endotoxinas bacterianas, como LPS, al actuar sobre el receptor TLR4 (implicado en la tormenta de citocinas) en la sepsis. La hidroxicloroquina tiene efecto inhibitorio en el procesamiento de los antígenos y presentación de MHC clase II, interfiriendo con TLR e inhibiendo la producción de TNFα, IFNα, IL-6 y CCL4. La **cloroquina** tiene muchísimos efectos secundarios tales como arritmias, y hay que tener mucho cuidado cuando lo administramos con otros

medicamentos como la azitromicina porque pueden prolongar el QT.¹¹ En un estudio sobre la prolongación del QT, se observó que los pacientes tratados con cloroquina/hidroxiclороquina, el QT basal no difería de los pacientes tratados con cloroquina/hidroxiclороquina y azitromicina. Sin embargo, estos últimos, sí que tenía un QT máximo significativamente más alto. Siete pacientes necesitaron finalización de su tratamiento, no obstante, sin producirse ninguna muerte por arritmias.² La **hidroxiclороquina** se tolera mejor, aunque comparte efectos secundarios: desarrollo de rash, prurito y retinopatía. Además, ambos tienen una vida de eliminación media de 30-60 días y es variable de una persona a otra. El estrés oxidativo generado de la infección del SARS-CoV-2 puede provocar efectos adversos graves en pacientes que padecen G6PD (déficit de glucosas-6-fosfato) si son tratados con cloroquina, por lo que en esta población están contraindicados.¹¹

En un estudio chino que fue retirado posteriormente tras detectarse errores experimentales y sesgos de publicación, se vieron algunos beneficios en la duración de la fiebre y tos (un día menos), la progresión de la enfermedad y moderada o significativa mejora en la TAC de tórax.¹¹

Un estudio con 36 pacientes con COVID-19 en Francia, afirmó que había una asociación significativa entre hidroxiclороquina y la reducción y desaparición de la carga viral y se veía reforzado con azitromicina. Este estudio incluía pacientes asintomáticos y con neumonía, ninguno de ellos estaba severamente enfermo. Los resultados fueron cuestionados por la ISAC, la cual declaró que debido a los criterios de inclusión de los pacientes que aseguran la seguridad de los pacientes, no cumplían con el estándar esperado de esta organización.²

Se realizó un estudio que incluía pacientes de 671 hospitales hospitalizados desde 20 diciembre 2019 hasta el 14 de abril 2020. Los pacientes fueron incluidos en cinco grupos: tratados solo con cloroquina, cloroquina y macrólidos, hidroxiclороquina, hidroxiclороquina y macrólido y grupo control sin ningún tratamiento. De los 96032 pacientes, 14888 estaban en los grupos con tratamiento y 81144 en el control. Después, de analizar los factores de confusión, se vio que no era posible confirmar el beneficio de la hidroxiclороquina y cloroquina, cuando se usaba sola o con un macrólido en pacientes con COVID-19. Además, mostró una disminución de la supervivencia en hospital y un incremento de las arritmias ventriculares. Este estudio fue creado con pacientes hospitalizados, la mayoría de ellos asociados a comorbilidades. Fue recientemente retirado por datos defectuosos y cuestiones éticas sobre la metodología usada.²

Pruebas *in vitro* en células Vero E6 mostraron inhibición viral prometedora, donde tanto cloroquina como hidroxiclороquina prevenían el transporte del virus a endolisosomas. Sin embargo, estudios retrospectivos y estudios clínicos no han sido concluyentes, sin mostrar evidencia sobre el efecto de estos fármacos contra la COVID-19. Un estudio aleatorizado internacional, doble ciego, controlado con placebo mostró que hidroxiclороquina no producía una disminución de la presencia de síntomas y/o su severidad en un periodo de 14 días. Además, los informes preliminares de un estudio observacional controlado, aleatorizado, multicéntrico mostraron que la hidroxiclороquina no disminuía significativamente la tasa de intubación o la mortalidad. La NIH no recomienda su uso para tratar la COVID-19.²³

Según información aportada de primera mano por clínicos, la hidroxiclороquina no solo no ha sido beneficiosa en sus pacientes, sino que ha llegado a ser perjudicial.

Amodiaquina es un fármaco antimalárico, el cual ha sido usado en otros estudios antivirales como inhibidor de proteasas, como el *DENV2* y el *virus del Nilo Occidental* y el *virus del Ébola*. Presenta un efecto sinérgico contra la replicación del SARS-CoV-2 en células Vero E6 cuando se combina con **nelfinavir**. Además, tiene un índice sinérgico mayor cuando actúa junto a otro antimalárico como la cloroquina, hidroxiclороquina, quinaracina y mefloquina. Un estudio publicado en el repositorio de preprints Chemrxiv, refuerza una posible acción contra el SARS-CoV-2 virus bloqueando su principal proteasa con un teórico K_i de $0,073\mu\text{M}$.²⁰

Teicoplanina y **dalbavancina** son compuestos que se administran de forma intravenosa. Muestran un gran efecto inhibitorio contra el SARS-CoV en células HEK293T (IC_{50} teicoplanina: $3.76 \pm 1.1 \mu\text{M}$; dalbavancina; $9.64 \pm 1.3 \mu\text{M}$), pero no contra la cathepsina L de forma libre. Esta discrepancia indica las propiedades lisosomotrópicas. Además, producen prurito, urticaria y rash como efectos secundarios.¹¹

Existen por otro lado un amplio rango de pequeñas moléculas que han sido aprobadas en las que se ha demostrado características lisosomotrópicas o efecto contra el SARS-CoV-2 en células Vero E6. La mayoría de ellos tiene una influencia en la neurotransmisión. Todos estos compuestos, comparten uno o más nitrógenos alifáticos protonable(s), endocíclico(s) o exocíclico(s) que es el responsable de su lisosomotropismo.¹¹

Como hemos mencionado anteriormente, se ha demostrado de forma profiláctica que el remdesivir previene el *MERS-CoV* en macacos Rhesus y probablemente del SARS-CoV-2 también. Es evidente que la pronta administración del **remdesivir** y la **teicoplanina**, **dalbavancina**, **oritavancina**, o **telavancina** podría prevenir la infección de SARS-CoV-2.¹¹

La **clorpromacina** tiene un efecto antiviral *in vivo* y efecto protector en COVID-19 en pacientes de psiquiatría comparado con los trabajadores de la planta. En consecuencia, ensayos clínicos se han puesto en marcha en relación con la clorpromacina y el SARS-CoV-2. La fluoxetina es otro compuesto que ha sido testada su eficacia en SARS-CoV-2. Ambos compuestos, tienen una semivida de eliminación más corta (de 1-3 días tras administración aguda y de 4-6 tras administración crónica) que la cloroquina y la hidroxiclороquina y son menos tóxicos. No obstante, en personas sin enfermedad mental, se produjo una terminación prematura de los ensayos clínicos por los efectos adversos.¹¹ Estudios recientes demostraron que los **inhibidores de la bomba de protones** reducen la infección de células por SARS-CoV-2.¹⁰ Se están realizando ensayos clínicos sobre la combinación de dos compuestos lisosomotrópicos, hidroxiclороquina (200mg dos veces al día) y **famotidina** (360 mg/d intravenoso) en pacientes COVID-19.¹¹

Entonces, para todos los compuestos lisosomotrópicos con intención de ser usados con finalidad antiviral, se debe prestar atención a los efectos farmacológicos de

sus indicaciones comunes y si es necesario, la administración debería cambiarse a local (inhalación).¹¹

Drug Class	Lysosomotropic Drug	
Antidepressants (tricyclic)	Amitriptyline (++)	Nortriptyline (++)
	Imipramine (++)	Desipramine (++)
	Trimipramine (++)	Doxepine (++)
	Maprotiline (++)	Protriptyline (+)
	Clomipramine # x/***	
Antidepressants (SSRI)	Fluoxetine (+)	Norfluoxetine (+)
	Setraline (++)	Paroxetine (+)
Antimycotics	Terbinafine # (++)	
Antipsychotics	Chlorpromazine x/xx (++)	Levomepromazine (++)
	Promazine (++)	Promethazine x (+)
Neuroleptics	Chlorprothixene (++)	Perazine (++)
	Thioridazine (++)	Triflupromazine x/**
	Thiothixene x/***	Fluspirilene x/##
	Imatinib #x/***	Dasatinib # x/***
Tyrosine kinase inhibitors		
Calcium channel blockers	Amlodipine (-)	
Antirheumatics (antiprotozoals)	Chloroquine x/xx (++)	Hydroxychloroquine x/xx (++)
	Mefloquine #ox/***	
Ovulation inducers	Clomiphene (++)	
Estrogen Receptor Antagonist	Toremifene #x/***	
H ₁ -antihistaminics	Astemizole x *	Terfenadine (++)
Anticholinergics (H ₁ -antihistaminics)	Benzatropine x (-),	
Antibiotics (glycopeptides)	Teicoplanin x/***	Dalbavancin x/***
	Oritavancin x/***	Telavancin x/***

Ilustración 27. El efecto lisosomotrópico depende del compuesto activo, la dosis y la acumulación en los lisosomas. A menos que se indique lo contrario, las dosis diarias máximas se dividen en tres administraciones. La concentración lisosomal (efecto) con el efecto terapéutico in vivo (esperado) (++) ocurre en la dosis máxima diaria y es muy probable en bajas o dosis iniciales, (+) muy probable en la dosis máxima diaria y es posible en bajas y dosis iniciales, (o) posible a dosis máximas diarias y poco probable en dosis baja o inicial y (-) improbable incluso con dosis diarias máximas; * retirado del mercado (en la mayoría de países); ** solo uso veterinario; # dosis única al día; # o dosis dependiente del tratamiento o la profilaxis (de la malaria); xin vitro anti SARS-CoV probado; xxin vitro anti SARS-CoV-2 probado. *** lisosomotropismo muy probable, pero aún no confirmado, concentración lisosomal del fármaco (efecto) dentro del margen terapéutico esperado; ## lisosomotropismo muy probable, pero aún no confirmado, sin concentración de fármaco lisosomal (efecto) dentro del margen esperado.¹¹

Bamlanivimab es un anticuerpo monoclonal IgG1K neutralizador que se une al dominio de unión de la proteína S de ECA2 previniendo su unión. El ensayo clínico ACTIV-3 que estudió la coadministración de remdesivir y de bamlanivimab se detuvo de forma temprana, ya que no mostró ninguna mejora clínica en el día 5 comparado con el placebo. No obstante, los resultados de otros ensayos clínicos sugieren que bamlanivimab podría tener mejor eficacia en el curso temprano de la enfermedad. En el ensayo clínico BLAZE-I, compuesto por 452 pacientes que recibieron tres dosis diferentes de bamlanivimab o placebo (Chen et al, 2021), se vio que los pacientes que habían recibido la dosis intermedia tuvieron una disminución rápida de la carga viral en el día 11 y menor tasa de hospitalización. La compañía farmacéutica Eli Lilly emitió un informe informando que bamlanivimab reducía el riesgo de contraer COVID-19, demostrado en un ensayo clínico aleatorizado controlado compuesto por residentes y profesionales de una residencia (Lilly,2021). Entre los residentes (299) se observó una

menor frecuencia de COVID-19 sintomático en aquellos que habían recibido bamlanivimab (OR=0,2 P= 0,00026).²⁵

AZITROMCINA, NICLOSAMIDA, NITAZOXANIDA.

Estos tres compuestos tienen diferentes modos de acción, pueden actuar sobre la adsorción viral, la replicación y tener un efecto viricida sobre el SARS-CoV-2. **Azitromicina** tiene hasta un 51% de efecto viricida, lo cual le permite actuar directamente contra el virón e inactivarlo. Además, tiene un 31% a 1,3 µM de actividad inhibitoria de la adsorción viral y un efecto casi insignificante en la replicación. **Niclosamida** tiene un efecto viricida del 37%, así como un 70% de efecto inhibitorio contra la replicación del virus, sin embargo, contra la adsorción viral no se detecta actividad. **Nitazoxanida** muestra un efecto inhibitorio en las tres fases, pero su principal actividad es viricida.¹⁸

Name of Compound	Conc. (µM)	Mode of Action *		
		Viral Adsorption	Viral Replication	Virucidal
Azithromycin	1.3	31%	4%	51%
	0.64	27%	2%	51%
	0.322	2%	0%	34%
	0.16	0%	0%	12%
	10.4	0%	70%	37%
Niclosamide	5.2	0%	68%	21%
	2.6	0%	55%	21%
	1.302	0%	23%	16%
	10.4	11%	Toxic	78%
Nitazoxanide	5.2	11%	Toxic	75%
	2.6	1%	40%	61%
	1.302	0%	35%	39%

Ilustración 28. Mecanismo de acción de los tres compuestos realizado a concentraciones superiores a la mitad del efecto inhibitorio máximo “IC₅₀” para conocer mejor el mecanismo de acción.¹⁸

Se estudió la unión de la azitromicina, niclosamida y nitazoxanida con la proteína Mpro del SARS-CoV-2. Estos fármacos mostraron correlación entre su actividad y su interacción con Mpro. La azitromicina forma dos puentes de hidrógeno con glu-166 y gln-189, ocupando completamente el dominio del receptor. La niclosamina no forma puentes de hidrógeno, pero el resto fenólico se orienta profundamente en el dominio. La nitazoxanida, tampoco forma puentes de hidrógeno, pero el resto salicílico se orienta profundamente en el dominio. Esta disposición podría explicar la alta actividad de la niclosamida. Con respecto a la unión con la proteína S, la azitromicina forma un puente de hidrógeno con lys-417, sin embargo, adopta una posición lejana de los dos residuos clave gln-493 y tyr-495. Nitazoxanida se une fuertemente formando puentes de hidrógeno con asn-422 a través del grupo NH amídico de aminotiazol, mientras que niclosamida forma un enlace de hidrogeno con el resto peptídico que incluye la gln-493 a través del grupo OH fenólico. Este diferente modo de unión afecta al metabolismo y la actividad de los fármacos contra el SARS-CoV-2.¹⁸

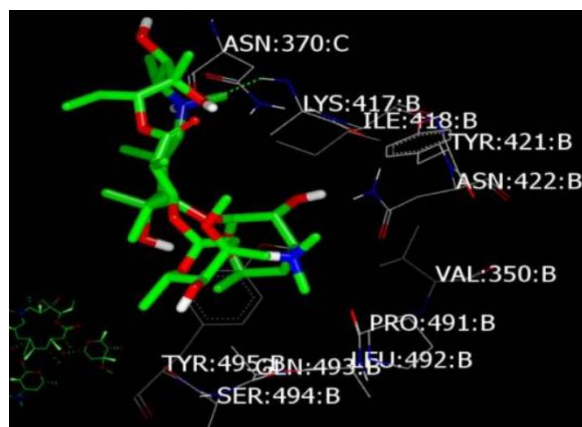


Ilustración 29. Estructura de la azitromicina acoplada periféricamente.¹⁸

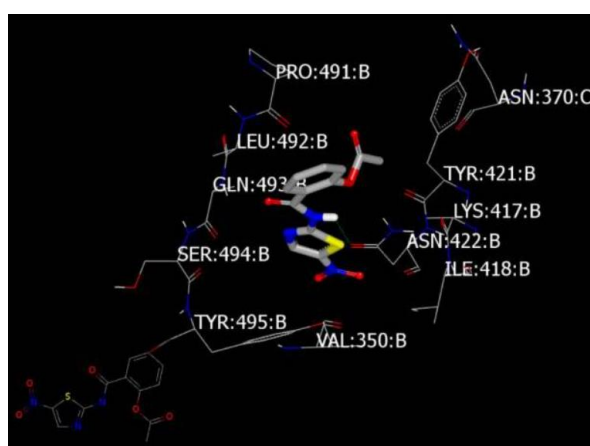


Ilustración 30. Nitazoxanida acoplada con formación de puente de H débil.¹⁸

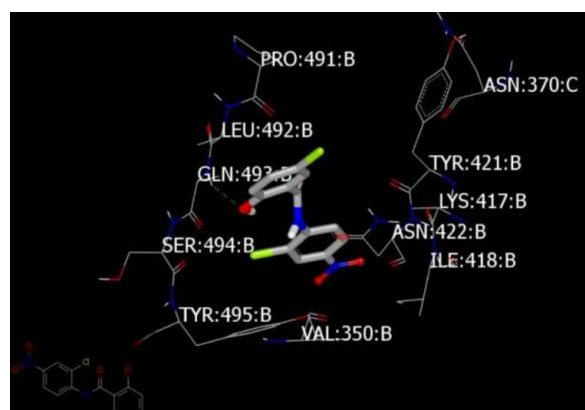


Ilustración 31. Niclosamida acoplada con formación de puente de H fuerte.¹⁸

Se realizó un estudio para comprobar si estos tres compuestos aprobados por la FDA para el SARS-CoV-2 son solo selectivos para el SARS-CoV-2 o también son activos para otros *coronavirus* como el MERS-CoV. Para ello, se trató con las mismas concentraciones de estos tres fármacos a SARS-CoV-2 y a MERS-CoV *in vitro*. Azitromicina a concentración 5 μ M a 10 μ M mostró un efecto inhibitor prometedor contra SARS-CoV-2 (aproximadamente de 80%- 90%), comparado con MERS-CoV

(inhibición viral de 20%- 30%). Sin embargo, nitazoxanida y niclosamida son igual de efectivos para *SARS-CoV-2* y *MERS-CoV*.¹⁸

Azitromicina, también, se ha visto que inhibe la actividad inflamatoria. Induce la producción de interferón tipo I (α , β) y tipo III en células de pacientes con enfermedad obstructiva crónica y disminuye la carga viral del *rinovirus-16* en células bronquiales. *In vitro*, se ha visto que la concentración EC_{50} de azitromicina contra el *SARS-CoV-2* es de 2.12 μ M tras 72 horas de la infección. En combinación con otras sustancias, ha presentado cierta evidencia de influencia en el curso de la carga viral y en los síntomas. No obstante, todavía hay contradicciones en la combinación con **hidroxicloroquina** en COVID-19. Un estudio francés mostró un 100% de reducción de la carga viral en seis pacientes tratados con azitromicina e hidroxicloroquina, por el contrario, solo el 57,1% en los pacientes tratados solo con hidroxicloroquina.² Otro estudio, sin embargo, no mostró eficacia en ningún caso de los once pacientes tratados con la misma combinación. Por lo que se necesitan más ensayos para estudiar mejor su efecto.²

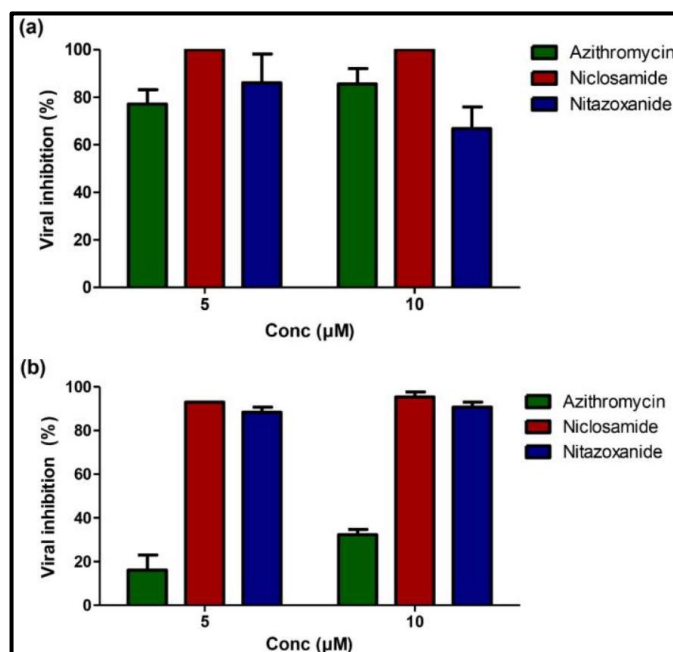


Ilustración 32. Actividades anti-SARS-CoV-2 y anti-MERS-CoV para azitromicina, niclosamida y nitazoxanida. (a) Actividad anti-SARS-CoV-2 para azitromicina, niclosamida y nitazoxanida medida por ensayo de reducción de placa. (b) Actividad anti-MERS-CoV para azitromicina, niclosamida y nitazoxanida medida en ensayo de reducción de placa.¹⁸

En otro estudio, **nitazoxanida** ha demostrado tener una actividad antiviral contra el *SARS-CoV-2* con IC_{50} de 2,12 μ M. Por lo tanto, se ha sugerido que este fármaco puede ser beneficioso como una terapia contra el COVID-19, considerando no solo el efecto antiviral de la nitazoxanida, sino también su acción inhibitoria contra las citocinas pro-inflamatorias y además con efecto broncodilatador. De forma similar, **niclosamida** ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio contra una amplia gama de virus como el *virus de la encefalitis japonesa*, *MERS-CoV*, *virus del Zika*, *VHC*, *Ébola*, *Chikungunya* y *rinovirus humano*. **Azitromicina** tiene actividades contra muchos virus como *SARS-CoV-*

2, Zika, Ébola, los resultados publicados de IC₅₀ de azitromicina contra el SARS-CoV-2 fueron de 2,12 µM.¹⁸

Según un estudio realizado por Stellari et al., el tratamiento con azitromicina de pacientes con COVID-19 puede disminuir significativamente la bioluminiscencia inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el pulmón, la infiltración de células en vía aérea y además reduce la concentración de citocinas proinflamatorias en el lavado broncoalveolar e inhibe la traslocación nuclear NF-κB.^{24,28}

DIRIGIDOS FRENTE A LA RESPUESTA INMUNITARIA.

IL-6 tiene un papel central como mediador de la toxicidad en la tormenta de citocinas que está asociado con casos graves de COVID-19. La COVID-19 en general, está asociada con un aumento de los niveles de IL-6, el cual está relacionado con un aumento de la mortalidad. Se ha demostrado que IL-6 se une a IL-6R y gp130 para inducir la homodimerización de gp130. Esta homodimerización fosforila residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de gp130. La gp30 activada induce la fosforilación de JAK1, JAK2 y Tyk2 resultando la activación de STAT1 y STAT3. Esta fosforilación de residuos mediada por JAK activa dos cascadas de señalización JAK/STAT y ERK/MAPK. Además, la forma soluble de IL-6R también se une al IL-6R y forma un complejo receptor con gp130 para activar aún más estas vías. IL-6 también juega un papel fundamental en la diferenciación de los linfocitos T helper regulando el balance entre IL-17 y las células reguladores T.²⁵ Numerosos ensayos clínicos están siendo realizados actualmente sobre el **tocilizumab** y **sarilumab** (anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6) y **siltuximab** (anticuerpo anti-IL-6) en COVID-19. Un pequeño ensayo con 20 pacientes demostró la eficacia clínica de anticuerpos contra el receptor IL-6 en casos severos. **Tocilizumab** mejora eficazmente los síntomas clínicos, reduciendo la temperatura corporal a un nivel normal en un día, disminuye la carga viral detectada por PCR significativamente tras 5 días y disminuye el deterioro de los pacientes con COVID-19 severo.¹¹ Numerosos informes reportan casos en los que tocilizumab mejoraba la oxigenación y reducía los marcadores de inflamación en pacientes hospitalizados con COVID-19. También, se ha reportado una mejoría de la linfopenia asociada a la COVID-19. Un metaanálisis de casos reportados también demostró una reducción de la mortalidad del 12% entre los pacientes tratados con tocilizumab. Sin embargo, el 27 de agosto de 2020, el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NIH) desaconsejó el uso extendido de tocilizumab tras informes contradictorios publicados y la falta de datos de ensayos clínicos diseñados de forma correcta. Un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en pacientes hospitalizados con COVID-19 severo mostró que tocilizumab era inefectivo reduciendo la mortalidad o la tasa de intubación. Además, la necesidad de oxígeno suplementario y el empeoramiento clínico tampoco se reducían en comparación con el placebo.²³

El ensayo clínico controlado aleatorizado REMAP-CAP realizado por Gordon et al en 2021 ha aportado datos sobre el efecto de tocilizumab y sarilumab en las 24 horas de ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos. 353 pacientes recibieron tocilizumab y 8 sarilumab. Se encontró un descenso significativo en días de hospitalización en pacientes sin soporte de órganos en las tres primeras semanas en el grupo del tocilizumab (mediana de 10 contra 0 en el grupo placebo). La mortalidad hospitalaria también disminuyó (28% contra 36%, p=0,03). Los resultados de un ensayo clínico

controlado aleatorizado con 2022 pacientes que recibieron tocilizumab han sido publicados por los investigadores de RECOVERY (Horby et al, 2021). La mortalidad en 28 días disminuyó significativamente en el grupo con tocilizumab (29% contra 33%, $p=0,007$). Entre los pacientes que no recibían ventilación invasiva al inicio del ensayo, tocilizumab redujo el riesgo de progreso a la intubación o la muerte de un 38% a un 33%.²⁵

Se están estudiando tratamientos con IFN en varios ensayos clínicos en las primeras etapas de la enfermedad. No obstante, IFN puede causar efectos no esperados. En general, los IFN son inductores de la expresión de ECA2, por lo que favorecerían la diseminación del SARS-CoV-2.¹⁰

Apilimod es un inhibidor de la interleukina 13/23 mediante la inhibición de la enzima fosfatidilinositol-3-fosfato-5-quinasa. El apilimod ha bloqueado la replicación del *virus Zaire Ébola* y SARS-CoV-2 en ensayos *in vitro* actuando en la mencionada quinasa y reduciendo el tráfico intracelular de partículas virales, además de la entrada del virus en células Vero E6 con IC₅₀ de 10nM. También, en un estudio con células neumocitos-like derivadas de células pluripotentes, se encontró que apilimod bloqueaba la replicación viral en con un IC₅₀ de 0,088-0,012μM. Otro estudio con Vero E6 indicó que disminuía potencialmente la cantidad de RNA de SARS-CoV-2 en cultivos celulares con un IC₅₀ de 12mM y con baja toxicidad celular.²⁰

La **metilprednisolona** es un inmunodepresor muy usado para retrasar y parar la progresión de la neumonía y se ha demostrado que actúa eficazmente en el tratamiento de síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Pacientes con neumonía por COVID-19 severo desarrollan rápidamente un fracaso respiratorio agudo. En una cohorte retrospectiva con 201 pacientes con COVID-19 que desarrollaron SDRA, la administración de 1-2 mg/kg/día intravenoso durante 5-7 días aparentemente redujo el riesgo de muerte, aunque, aun así, el 42% de los pacientes que recibieron este fármaco murieron en comparación con el 61,8% que no lo recibieron. En otro estudio con 46 pacientes con enfermedad severa con COVID-19, mejoró clínicamente los síntomas y se acortó la enfermedad con dosis bajas y poco tiempo de administración de metilprednisolona. También, se han realizado estudios con **dexametasona**. El 17 de junio de 2020 se publicaron los resultados de un estudio aleatorizado realizado en Oxford para examinar el beneficio de tratar con dexametasona pacientes COVID-19. Consistió en 2104 pacientes que recibieron 6mg de dexametasona una vez al día durante 10 días y 4321 pacientes que recibieron cuidados normales. La dexametasona redujo las muertes en un tercio de los entre los pacientes ventilados y una quinta parte entre los que recibían oxígeno. Este beneficio no se observó en pacientes que no requirieron soporte respiratorio.²

Ruxolitinib fue el primer inhibidor de las quinasas Janus (JAK) aprobado. El amplio espectro de citocinas inflamatorias involucradas en la COVID-19 sugieren la activación de JAK-STAT. Al igual que el tocilizumab, ha mostrado mejorar los síntomas de la COVID-19. Es bien tolerado en pacientes y asociado con pocos efectos adversos. Un análisis retrospectivo mostró que en los pacientes que recibían ruxolitinib se reducían significativamente los niveles de inflamación de COVID-19, lo cual, se reflejaba en una mejoría clínica de los pacientes con evidencia de síndrome de citocinas. Hay

ensayos clínicos en marcha de otros inhibidores de JAK aprobados por la FDA en pacientes COVID-19 (tofacitinib y baracitinib). Hay indicaciones de que la combinación de inhibidores de JAK (concretamente, baracitinib) con remdesivir puede reducir la recuperación en pacientes hospitalizados con COVID-19.²³

Baracitinib es un inhibidor específico de JAK 1 y 2 usado en el tratamiento de la artritis reumatoide. Richardson et al (2020) propusieron su uso contra el COVID-19 debido a que muchas citocinas utilizan la vía de señalización JAK-STAT. También, afirmaron que podría afectar a la entrada celular de SARS-CoV-2 debido a su efecto inhibitorio de la proteína quinasa asociada a AP-2.²⁵ Una de las vías de entrada del SARS-CoV-2 en la célula es por endocitosis. Dos importantes factores promotores de la endocitosis son la proteína quinasa asociada a AP-2 (AAK-1) y la quinasa asociada a la ciclina G (GAK).²⁴ El ensayo clínico ACTT-2 evaluó baricitinib más remdesivir contra placebo en 1033 pacientes hospitalizados (Kalil et al, 2021). Se observó un efecto bajo en la mejora del tiempo de recuperación, el cual era más pronunciado en pacientes con oxígeno a alto flujo o ventilación no-invasiva (10 días contra 18 días). Baricitinib también redujo la necesidad de ventilación invasiva (10% contra 15%). El ensayo de RECOVERY añadió baricitinib como un tratamiento en enero de 2021.²⁵ Algunos estudios han demostrado que baricitinib no debería ser usado en pacientes con números de neutrófilos y linfocitos menores de 1×10^9 células/L y $0,5 \times 10^9$ células/L, respectivamente. Además, se ha observado el desarrollo de anemia en varios pacientes. Existen datos adquiridos de estudios realizados por Zhou et al, donde la mortalidad fue mayor en pacientes ancianos. Otro de los riesgos del uso de baracitinib es la reactivación de infecciones latentes, como la VVZ, VHS o el *virus del Epstein-Barr*. Zhoe et al. comprobaron que aproximadamente el 50% de los pacientes con COVID-19 también sufrieron una infección secundaria.²⁴

La **aspirina** tiene actividad antiinflamatoria, analgésica, antipirética, y antitrombótica, lo que le hace presumir actividad antiviral contra el SARS-CoV-2. Esto se ha demostrado en distintos estudios donde mostró actividad antiviral contra diferentes virus respiratorios como el *virus de la gripe*, *rinovirus*, *CoV 229E humano* y *MERS-CoV in vitro*. La actividad de la aspirina probablemente se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos de forma irreversible inhibiendo la ciclooxigenasa-1 y la ciclooxigenasa-2. Además, modula el potenciador de cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas, regula negativamente la expresión y actividad de la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS), inhibe el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa e incrementa la permeabilidad mitocondrial de membrana. De forma semejante, Piroxicam es un potente agente no esteroideo, antipirético y antiinflamatorio que tiene actividad frente al *NRC-03-nhCoV*. También, ha mostrado actividad frente al *virus herpes simple* tipo 1 *in vitro*.²

Recientemente, el **malato de clorfeniramina**, un antagonista competitivo del receptor H1 histamínico mostró una potente actividad antiviral contra un amplio espectro de virus con IC₅₀ de 3,56 y 11,84 μM. Malato de clorfeniramina afecta al *NRC-03-nhCoV* con IC₅₀ de 3,6 μM. Recientemente se ha visto que un aerosol nasal con este compuesto ha mostrado gran efecto viricida.²

Fingolimod es un análogo de la esfingosina y un modulador del receptor de la esfingosina 1-P. Es el primer fármaco aprobado por la FDA para la esclerosis múltiple. Ha sido considerado como un fármaco potencial contra SARS-CoV-2. Los *coronavirus* pueden propagarse al SNC y fingolimod es capaz de prevenir la penetración de células T en el SNC y regular la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que no hay correlación entre la infección de SARS-CoV-2 y los niveles de linfocitos en los casos tratados con fingolimod.²¹

La **colchicina** interrumpe procesos inflamatorios relacionados con procesos celulares como la activación del inflamósoma, quimiotaxis celular, producción de leucotrienos, producción de citocinas y fagocitosis. Además, inhibe la polimerización de la tubulina y microtúbulos. Como estas vías están involucradas en muchas enfermedades, la colchicina puede ser un candidato para ser investigado, debido a que inhibe la tormenta de citocinas en pacientes con COVID-19.²¹

Icatibant es un antagonista competitivo altamente específico del receptor de bradiquinina tipo 2 (B2). Está compuesto por 10 aminoácidos, cinco de los cuales son resistentes a la degradación de ECA2. Estos aminoácidos son necesarios para inactivar el ligando del receptor tipo 1 (B1). El problema del edema pulmonar de los pacientes con COVID-19 puede ser debido a la activación de los receptores B1 y B2 en los pulmones. ECA2 inactiva los ligandos de B1 y esto provoca que sea propenso a generar angioedema. Estudios *in vitro*, han confirmado que icatibant es un antagonista competitivo altamente específico del receptor de bradiquinina tipo 2. Además, *in vivo* bloquea las funciones vasculares de la bradiquinina. La bradiquinina tiene un papel importante en el desarrollo del edema pulmonar en pacientes COVID-19, por lo que icatibant podría ser un tratamiento para tener en cuenta.²¹

Hesperidin es un fármaco antiinflamatorio. Estudios de acoplamiento molecular no publicados indican que hesperidin puede unirse a múltiples regiones del SARS-CoV-2. Al igual que hesperidin, **biorobin** se une a múltiples regiones del SARS-CoV-2.²¹

DIRIGIDOS CONTRA DIANAS ESPECÍFICAS Y TODAVÍA POCO ESTUDIADOS.

La **amantadina** es un inhibidor de la proteína de la membrana viral M2, la cual es necesaria para la liberación eficaz del genoma en la entrada del virus. Este fármaco ha sido usado como tratamiento de la gripe A, pero también tiene propiedades antiparkinsonianas. Se cree que puede interferir con la expresión de la catepsina L proteasa en SARS-CoV-2.²⁰

Amprenavir es un inhibidor de la proteasa de *HIV* que actúa en la prevención de la escisión de la poliproteína gag-pol y como resultado produce formas inmaduras y no infecciosas. En estudios *in vitro* ha demostrado que tiene un alto grado de inhibición contra SARS-CoV-2.²⁰

Baloxavir marboxyl es un antiviral de la gripe A y B, el cual inhibe la endonucleasa cap-dependiente necesaria para la replicación viral. Baloxavir está bajo investigación en

el ensayo clínico NCT04327791 desde marzo 2020 y ha sido usado en terapia combinada con **oseltamivir 1** en pacientes hospitalizados con gripe.²⁰

Faldaprevir, es un inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C. *In silico*, indica un posible mecanismo de acción inhibidora de enzimas del nuevo *coronavirus*. **Galdesevir** es un análogo de la adenosina que actúa inhibiendo el mecanismo de la RNA polimerasa. Se incorpora al RNA actuando como antivírico, además, es sustrato de la RNA polimerasa bloqueando la replicación de RNA. **Nelfinavir** es un inhibidor antirretroviral de proteasas con actividad contra la proteasa 3CL SARS-CoV *in vitro*; e *in silico/in vitro*, actividad contra la replicación del SARS-CoV. *In silico*, ha demostrado ser inhibidor de SARS-CoV-2 Mpro, que puede actuar en combinación con **ceparantina** en el control de la progresión y la transmisión de la enfermedad. *In vitro*, la ceparantina reduce la entrada de *coronavirus* a la célula. Además, nelfinavir muestra buenas características farmacocinéticas en humanos. **Oseltamivir** es un fármaco aprobado contra la gripe A y B que inhibe la neuroaminidasa, la cual disminuye la liberación de partículas virales en la célula y reduce la diseminación viral en el tracto respiratorio. Fue usada en los primeros meses del brote de COVID-19 combinada o no con antibióticos y corticoesteroides, y combinaciones con cloroquina y favipiravir en ensayos clínicos. Concentraciones menores de 100µM no mostraron efecto antiviral *in vitro* contra SARS-CoV-2. En un ensayo clínico, los autores indicaron que este fármaco no es efectivo inhibiendo SARS-CoV-2 incluso en concentraciones altas. Sin embargo, no mostraron los detalles del ensayo.²⁰

Otros fármacos están mostrando resultados prometedores *in silico* o *in vitro*. **Indinavir** es un inhibidor de la proteasa antirretroviral usada contra la infección por HIV1. *In silico*, ha demostrado que puede ser usado como inhibidor de la proteína Mpro de SARS-CoV-2.²⁰ **Pleconaril** es un fármaco usado para la prevención del asma, así como de los síntomas de resfriado común en asmáticos expuestos a infecciones respiratorias. *In silico*, experimentos moleculares han probado que podría ser un bloqueante de la proteína S de SARS-CoV-2.²⁰ **Sofosbuvir** es un análogo de nucleósido usado contra infecciones de VHC.¹¹ Actúa inhibiendo la polimerasa RNA dependiente viral e *in silico* ha demostrado actividad frente a la polimerasa RNA de SARS-CoV-2 y otras enzimas. **Tenofovir** es un análogo de nucleótido, se ha usado este fármaco en estudios clínicos con pacientes infectados con HIV y SARS-CoV-2.²⁰ **Tipranavir** es un inhibidor no peptídico de la proteasa de HIV indicada en tratamiento antirretroviral combinado. Este fármaco, *in silico*, ha mostrado actividad contra proteasas 3CL del SARS-CoV-2.¹¹ **Zanamivir** es un fármaco inhibidor de la neuraminidasa de la gripe A y B. *In silico*, se ha visto que interactúa con proteasas de transcripción virales de SARS-CoV-2.²⁰

Se realizó un estudio a larga escala de 1000 fármacos aprobados por la FDA y 2100 moléculas similares con actividad farmacológica validada de Selleckchem con el objetivo de realizar un cribado antiviral usando células Calu-3, Vero E6 y Huh7,5. Inicialmente, se encontró que **remdesivir** e **hidroxicloroquina** eran activos en células Vero E6 infectadas con IC₅₀ de 0,46 y 1,32µ respectivamente. También, el compuesto natural **nanchangmicina**, con IC₅₀ de 0,02 µM. Además, estudios en células Huh7,5 demostraron que 33 fármacos eran activos con un IC₅₀ por debajo de 0,5µM, incluyendo **remdesivir**, **hidroxicloroquina** y **nanchangmicina**. No obstante, desde que remdesivir fue activo en células Calu-3 infectadas, hidroxicloroquina y sus derivados no presentaron

ninguna actividad. Esto sugiere que hay un mecanismo diferente de acidificación endosomal en este tipo de células que bloquea el mecanismo de la hidroxiclороquina y sus derivados. Los autores del estudio sugirieron que podía ser por la acción de TMPRSS2, que permitiría la entrada a las células Calu-3 por parte de SARS-CoV-2 y propusieron una inhibición específica por parte del **camostat** de IC₅₀ de 0,35 μM, pero sin acción en células Vero E6 y Huh7,5. Este mecanismo fue también demostrado en otro estudio usando células epiteliales bronquiales, células epiteliales alveolares primarias tipo II y células Calu-3 de virus para el virus Influenza A y B. Por el otro lado, estudios clínicos recientes con **hidroxiclороquina** indicaron una falta de eficacia en pacientes hospitalizados con COVID-19 agudos, algunos de los cuales sufrieron además efectos colaterales que afectaban a la función cardíaca, que podían llegar al fallecimiento por fallo cardíaco. Por estos motivos, solo se puede recomendar como agente profiláctico y en casos no severos. Además, resultados similares se consiguieron para el **remdesivir**, **lopinavir**, y la combinación **lopinavir** y **ritonavir**. Esto sugiere que estos fármacos pueden usarse tanto de forma profiláctica como en estadios tempranos de la infección por COVID-19 en pacientes no hospitalizados. A parte de los mencionados anteriormente, otros nueve fármacos presentaron un índice antiviral selectivo contra SARS-CoV-2 mayor de 2: salinomicina, Y-320, AZD8055, bemcentinib, dacomitinib, WYE-125132, ebastina, Dp44mT y ciclosporina.²⁰

Emetine es un fármaco usado tradicionalmente como emético y expectorante. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la síntesis ribosomal. Inhibe la reacción de transferencia de aminoacil-tRNAs, previniendo su incorporación a los enlaces polipeptídicos. Debido a las propiedades antivirales contra otros virus como *Ébola* y *CMV*, es considerado como uno de los candidatos contra COVID-19. Emetine inhibe la replicación del SARS-CoV-2 *in vitro* con una EC₅₀ de 0,46 μM y también tiene una buena sinergia con remdesivir.²¹

Valrubicina es un derivado de N-trifluoroacetil 14-valerato derivado de doxorrubicina (antraciclina). Su mecanismo es la pérdida de histonas, por lo que se interrumpe la reparación del ADN. Ha demostrado que puede inhibir SARS-CoV-2 Mpro y sus proteasas.²¹

Perphenazine es un antipsicótico. Se une a la proteína fosfatasa 2A, una serina/treonina fosfatasa e induce la desfosforilación de ERK1/2 y Akt, como resultado de ello se produce la apoptosis. Además, es un fármaco que podría unirse a aminoácidos del SARS-CoV-2 y modificar su función.²¹

HHT es un alcaloide extraído de la *Cephalotaxus harringtonina*. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la traducción de proteínas a través de la unión e interacción con el sitio-A de la peptidil-transferasa del ribosoma. Ha demostrado inhibir la replicación del SARS-CoV-2 *in vitro*.²¹

Famotidine es un antagonista competitivo del receptor de histamina H2. Ha mostrado mejorar resultados de pacientes COVID-19.²¹

Almitrina es fármaco que inhibe selectivamente el canal de K⁺ dependiente de Ca²⁺. *In vivo*, los resultados han mostrado que la almitrina podría mejorar la

vasoconstricción pulmonar hipóxica y mejorar la relación de ventilación/perfusión. Se ha hipotetizado que podría reducir la necesidad de ventiladores en pacientes con neumonía COVID-19.²¹

Cromolyn sódico es un fármaco inhibidor de GSK-3 β . Puede ser efectivo por la disminución de la inflamación y la tormenta de citocinas en pacientes COVID-19.²¹

Fostamatinib es un inhibidor de la tirosina quinasa del bazo (SYK), una enzima conocida por su papel en la señalización del receptor inmunitario innato, la adhesión celular, el reconocimiento de la inmunidad innata y la función plaquetaria; ha sido utilizado como tratamiento de enfermedades inmunitarias como la artritis reumatoide y la trombocitopenia inmune (TPI). Además, el amplio número de vías inmunitarias que incluyen SYK, se ha comprobado que juega un papel en la respuesta inflamatoria causada por IgG anti-proteína S del SARS-CoV-2. En particular, R406, un componente activo del fostamatinib, bloquea SYK y su cascada de señalización y sugiere eficacia en el tratamiento de la COVID-19. Ha sido aprobado por la FDA. Fostamatinib ha sido acelerado a estudios de fase dos en pacientes con COVID-19.²³

Baricitinib es un inhibidor de la JAK. Ha sido estudiado como tratamiento potencial del COVID-19 previniendo la infectividad vía inhibición de la endocitosis mediada por clatrina. En un ensayo clínico aleatorizado y controlado, realizado para comparar los resultados de tratar con remdesivir más baricitinib a los pacientes sometidos a cuidados intensivos con los no tratados, se observó que se reducía el tiempo de recuperación de los pacientes sometidos a alto flujo de oxígeno y ventilación no invasiva.²³

OTROS COMPUESTOS

METABOLISMO CELULAR

Los virus ARN como el SARS-CoV-2 alteran el metabolismo de la célula hospedadora vía post-transcripcional. Los últimos estudios indican que reducen el metabolismo del **colesterol**, aumentan el metabolismo del espliceosoma, ácido nucleico y glicerofosfolípido y alteran el perfil de ácidos grasos. Por lo tanto, los sueros de los pacientes COVID-19 mostraban niveles más bajos de HDL, FA, triptófano, colina y más altos de hormonas esteroideas y ácidos biliares. La suplementación con **ácido linoleico** o **araquidónico** fue capaz de inhibir HCoV-229E y MERS-CoV *in vitro*, pudiendo llegar a ser terapias potenciales para el SARS-CoV-2.¹¹

Además, la inhibición de la glucólisis, el espliceosoma, la elongación de la translación, y el receptor scavenger tipo 1 entre HDL y células, inhibió la infección de SARS-CoV-2 *in vitro*. Otro ejemplo es el uso de **estatinas** combinadas con **clopidogrel** o **rivaroxabán** para reducir los niveles de colesterol y también el uso de **ácidos grasos Ω 3** (ácido linoleico) para aumentar los antioxidantes.¹¹

ANTICOAGULANTES

En numerosos estudios, se ha visto que pacientes con enfermedad severa COVID-19 presentan complicaciones de coagulopatía. La coagulación intravascular diseminada

es frecuente en muchas de las muertes causadas por SARS-CoV-2. Tang et al. ha realizado un estudio retrospectivo donde se comparan la mortalidad en los 28 primeros días entre un grupo de pacientes con COVID-19 que recibían **heparina** y un grupo que no recibía heparina. Sin embargo, ninguna diferencia significativa en la mortalidad en los 28 primeros días fue observada entre ambos grupos (30,3% frente 29,7% con una $p=0,91$). No obstante, en un grupo de pacientes que presentaban coagulopatía inducida por una sepsis con puntuación mayor de 4, los que recibían heparina mostraron una menor mortalidad en los 28 primeros días frente aquellos que no (40% frente 64,2% $p=0,029$). Por otro lado, Negri et al, informaron que en un estudio no revisado de 27 pacientes severos con COVID-19 del hospital de Sao Paulo, Brasil, tratados con heparina en dosis terapéuticas, mejoraban el cociente de presión arterial parcial de oxígeno y fracción inspirado de oxígeno (PaO_2/FiO_2). Además, la heparina produce efecto arrítmico.²

VITAMINA C

La **vitamina C** es una vitamina con propiedades antioxidantes muy importante para el sistema inmunitario. Algunos estudios han mostrado que infusiones intravenosas de altas dosis de vitamina C (200mg/kg peso/día dividido en 4 dosis) acorta la estancia en la UCI en un 7,8% y se acompaña de una reducción significativa en la mortalidad en el tratamiento de sepsis severas y shock séptico. Además, la vitamina C también ha demostrado actividad antiviral. Los *coronavirus* aumentan el estrés oxidativo que puede resultar en fallo orgánico en última instancia. Se piensa que una alta dosis de vitamina C intravenosa puede ser efectiva inhibiendo la producción de citocinas causadas por el COVID-19. Este tratamiento fue utilizado con éxito en 50 pacientes en China con COVID-19 de moderado a grave. El intervalo de dosis varía entre 10g y 20g por día, administradas durante 8-10 horas. El índice de oxigenación mejoró y todos los pacientes fueron dados de alta.²

VITAMINA D

La **vitamina D** puede estimular la inmunidad innata y modular la inmunidad adquirida. Sin embargo, aunque hay resultados contradictorios de la vitamina D en infecciones agudas, podría tener un efecto beneficioso en el COVID-19.²

Un metaanálisis ha demostrado que la suplementación con vitamina D podría proteger contra las infecciones respiratorias agudas. Este beneficio ha sido observado en pacientes que han recibido dosis en bolos y este efecto ha sido más evidente en individuos que tenían un déficit previo de vitamina D. En un estudio realizado por UK BioBank en 449 individuos, se observó asociación negativa entre concentraciones bajas de vitamina D e infección por SARS-CoV-2.²

ZINC

El **zinc** inhibe la polimerasa RNA de *coronavirus* y *retrovirus* y se ha visto que *in vitro*, los ionóforos de zinc inhiben la replicación del virus. Además, el zinc también ha demostrado ser un agente antiinflamatorio en animales con neumonía, limitando el daño tisular y los efectos a nivel sistémico. También, estudios preCOVID19 mostraron que la cloroquina es un ionóforo que incrementa la entrada de Zn^{2+} a la célula. Entonces,

se ha considerado al zinc como tratamiento de apoyo en el tratamiento de pacientes con COVID19. Cuatro pacientes con COVID19 y síntomas tomaron pastillas con alto contenido en sales de zinc, lo que mejoró los síntomas. El tratamiento durante un día con altas dosis produjo una mejoría en la sintomatología, reflejada en la disminución de la fiebre y mejoría de niveles de presión de O₂. No obstante, no se ha establecido una dosis estándar de suplementación con zinc para el COVID-19.²

4. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS. LIPINSKI-VEBER.

Para que un medicamento se absorba, penetre a través de las membranas y consiga llegar al sitio correcto, es importante el equilibrio entre la solubilidad y las propiedades polares. Según distintos análisis, la mayoría de las pequeñas moléculas mencionadas anteriormente podrían unirse a cuatro sitios específicos del virus: la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), proteasa quimiotripsina-like (3CLpro), proteasa papain-like (PLpro) y la proteína spike S1. También, podríamos incluir el receptor ECA2 o moléculas incluidas en la respuesta inmunitaria.³

Comp.	GPCR ligand	Ion channel modulator	Kinase inhibitor	Nuclear receptor ligand	Protease inhibitor	Enzyme inhibitor
1	0.17	-0.55	0.05	-0.57	0.54	0.22
2	0.04	-0.78	-0.55	-0.66	0.42	-0.37
3	0.04	-1.24	-0.82	-1.25	0.42	-0.51
4	-0.43	0.42	-0.35	-1.14	-0.58	-0.18
5	0.32	0.32	0.38	-0.19	0.05	0.11
6	0.35	0.30	0.44	-0.12	0.12	0.15
7	-0.19	-0.44	-0.39	-0.34	-0.46	-0.07
8	0.64	-0.06	0.19	-0.76	0.28	0.82
9	0.31	0.21	-0.21	-1.46	-0.20	0.71
10	0.49	0.10	0.91	-0.67	-0.13	0.24
11	0.46	0.31	-0.20	-1.05	0.33	0.59
12	-0.68	-1.59	-1.45	-1.41	-0.27	-0.73
13a	-2.50	-2.89	-3.21	-2.94	-1.91	-2.53
13b	-2.31	-2.79	-3.08	-2.80	-1.72	-2.41
14	-0.05	-1.35	-1.06	-1.15	0.72	-0.49

^a Items marked in bold parameters indicate strong drug-target interaction.

Ilustración 33. Puntuación de bioactividad en fármacos con posible actividad anti-SARS-CoV-2.³

Por lo tanto, sería interesante comparar las propiedades y los scores de bioactividad de las sustancias para identificar patrones similares y características peculiares. Podría ser útil para que la aplicación de fármacos antivirales sea óptima y crear posibles combinaciones y moléculas híbridas llamadas moléculas quiméricas. Estas propiedades fisicoquímicas forman “la regla de los cinco de Lipinski” (RO5) y la regla de Veber. La regla de los cinco de Lipinski (peso molecular (MW) <500, cLogP < 5, número de aceptores de enlaces de hidrogeno HBA <10 y número de donantes de enlaces de hidrogeno HBD <5) se asocia con la solubilidad del fármaco y la permeabilidad en las barreras celulares. Sin embargo, esta regla no siempre se cumple, se conoce que algunos compuestos que cumplen con RO5 no tienen una alta afinidad con las dianas farmacológicas. Además, según la **regla de Veber**, una buena biodisponibilidad es más probable en compuestos con 10 o menos enlaces rotados (ROTB), una suma de HBA más HBD menor de 12 y el área de la superficie polar topológica (TPSA) menor de 140 Å². Esto expresa que a medida que aumenta el número de enlaces rotados, la molécula se convierte en más flexible y adaptada para una interacción eficaz; el TPSA se correlaciona bien con el transporte pasivo molecular a través de membranas y puede predecir las propiedades de transporte a través de membranas en el intestino y de la barrera

hematoencefálica. Un TPSA menor de 140 Å² se asocia con buena permeabilidad de la membrana celular.³

Considerando las últimas afirmaciones, podemos calcular las principales características moleculares de los fármacos. Los compuestos que vamos a analizar son los siguientes: **remdesivir** (1), **lopinavir** (2), **ritonavir** (3), **favipiravir** (4), **cloroquina** (5), **hidroxicloroquina** (6), **umefenovir** (7), **EIDD-2801** (8), **ribavarina** (9), **ruxolotinib** (10), **ingarvirin** (11), **azitromicina** (12), **ivermectina** (13), **danoprevir** (14). De estas 14 sustancias, siete de ellas tienen un peso molecular < 500 Da, cumpliendo con el RO5 para administración oral y la otra mitad peso molecular > 600 Da, por lo que no cumplen con RO5, fallando en dos o tres criterios. La cloroquina tenía un peso molecular pequeño, pero falla en uno de los criterios. Sin embargo, no es algo excepcional, el 16% de los fármacos, principalmente antiparasitarios, anticancerígenos, antivirales que tienen una buena biodisponibilidad oral, fallan en un criterio, y el 6% fallan en 2 o más.³

Como hemos comentado antes, uno de los criterios es la función cLogP, que hace referencia a uno de los parámetros más importantes como es la lipofilia. Casi todos los fármacos tienen un cLogP apropiado, menor a 5, salvo el liponavir y ritonavir, los cuales son moléculas con valores de 5,69 y 7,14 respectivamente, siendo moléculas muy lipofílicas. Por el contrario, favipiravir, EIDD-2801, ribavirin, ruxolitinib y ingavirin son moléculas muy hidrofílicas, con rango de cLogP entre 2,27 y 1,83. Estas moléculas son altamente solubles en medios acuosos, pero con poca capacidad de transporte a través de membranas. Sin embargo, son capaces de ser transportadas por ciertas proteínas de membrana. Curiosamente, tres de los fármacos muestran unas propiedades lipofílicas adecuadas: azitromicina, ivermectina y danoprevir. Son menos lipofílicos que liponavir y ritonavir, que poseen un péptido alicíclico. Los últimos compuestos mencionados son los que tienen mayor peso molecular. Si comparamos cloroquina e hidroxicloroquina, aunque tienen los mismos volúmenes moleculares, la hidroxicloroquina es más polar, menos lipofílica y difunde peor a través de las membranas celulares.³

Remdesivir tiene un peso molecular de 616 Da, el mayor valor de TPSA (203,57 Å²) y tiene un buen cLogP (2,12), pero su absorción es la peor de las drogas, con solo un 38%. Este análogo de nucleótido, el cual inhibe la RNA polimerasa, se administra solo por vía endovenosa, en pacientes hospitalizados.³

Comp.	Key target	MW ^a	pK _a ^b	LogS ^c	% Abs. ^d	cLogP ^e	HBA ^f	HBD ^g	ROTB ^h	TPSA ⁱ	MV ^j	n violations ^k
1	RdRp	616.61	15.98	-4.96	38.77	2.12	14	5	15	203.57	539.85	2
2	3CLpro/PLpro	628.81	13.59	-7.14	67.60	5.69	9	4	15	119.99	607.96	2
3	3CLpro/PLpro	706.93	13.63	-6.49	58.71	7.14	11	4	17	145.78	646.30	3
4	RdRp	157.10	N/A	-1.84	78.26	-0.52	5	3	1	89.11	118.95	0
5	ACE2	319.88	10.06	-4.53	99.28	5.00	3	1	8	28.16	313.12	1
6	ACE2	335.87	9.22	-3.77	92.31	4.00	4	2	9	48.38	321.38	0
7	S protein/ACE2	477.42	5.24	-6.04	90.13	4.86	5	1	8	54.70	386.24	0
8	RdRp	329.31	12.15	-1.28	59.61	-0.26	10	4	6	143.15	280.87	0
9	RdRp	244.21	14.81	0.60	59.41	-2.77	9	5	3	143.73	197.68	0
10	JAK1/JAK2 ^l	306.37	N/A	-4.14	80.30	1.83	6	1	4	83.19	281.01	0
11	RdRp	225.25	4.55	-0.11	76.20	-0.26	6	3	7	95.08	207.27	0
12	UN ^m	749.00	8.63	-4.08	46.87	3.10	14	5	7	180.09	736.45	2
13a	3CLpro/PLpro	873.09	15.44	-5.47	50.32	2.61	14	3	8	170.09	825.84	2
13b	3CLpro/PLpro	859.06	15.24	-5.06	50.32	2.11	14	2	7	170.09	809.04	2
14	3CLpro/PLpro	731.84	N/A	-7.67	46.72	4.65	14	3	8	180.52	637.73	2

Bold items indicate violations of the Lipinski's rule.

^a Molecular weight (g/mol).

^b pK_a calculated using commercially available ChemDraw 15.0 program.

^c Aqueous solubility.

^d Percentage of absorption calculated by % Absorption = 109-(0.345 × TPSA).

^e Logarithm of the partition coefficient between n-octanol and water.

^f Number of hydrogen-bond acceptors.

^g Number of hydrogen-bond donors.

^h Number of rotatable bonds.

ⁱ Total molecular polar surface area (Å²).

^j Molecular volume.

^k Violations of the Lipinski's rule and did not include the violations of Veber's rule.

^l JAK, Janus kinases play a central role in signal transduction in hematopoietic cells as well as in cells of the immune system.

^m UN, unknown detailed anti-influenza virus mechanism; azithromycin does not affect attachment of viruses onto the cell surface but blocks internalization into host cells during the early phase of infection (in mice).

Ilustración 34. Propiedades moleculares de fármacos candidatos anti-SARS-CoV-2.³

Según los resultados, la mejor absorción, con un 92-99%, fue por parte de la cloroquina y la hidroxiclороquina. Otras pequeñas moléculas con nitrógeno en su estructura, como el favipiravir, umifenovir, ruxolitinib y ingavirin, también demuestran buena absorción (76-90%). Esto es consecuencia de sus valores del TPSA, que van desde el 28,16 al 95,08 Å², que también indica buena permeabilidad celular. La presencia de 3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)-tetrahydrofurano-2-il en el anillo heterocíclico eleva el TPSA de las sustancias EIDD-2801, riabavirin y remdesivir. Elevados TPSA también se observan en las moléculas macrocíclicas como azitromicina, ivermectina y danoprevir. De estos tres fármacos, la ivermectina es la molécula más hidrófila, absorbiéndose bien por vía oral. Sin embargo, al ser una molécula de gran tamaño, su paso al cerebro está disminuido, no puede pasar por difusión pasiva, pero si en presencia de bombas de flujo. Además, estos fármacos tienen buena flexibilidad, según la regla de Veber (ROTB de 7-8). Cloroquina e hidroxiclороquina muestran la misma capacidad, y remdesivir, lopinavir, ritonavir, son moléculas más flexibles (ROTB= 15-17).³

Con respecto al pK_a, siete de las catorce moléculas no presentan propiedades ácidas en el agua (pK_a > 12) y son bases conjugadas fuertes (1,2,3,8,9,13,14). Tres de ellos (5,6,12) tienen pK_a 8-12 y umifenovir e ingavirin son ácidos débiles (pK_a 5,24 y 4,55 respectivamente). Los fármacos administrados por vía oral van pasando por diferentes medios con distintos pH, por lo que pueden interferir con el pK_a de la sustancia, modificando la absorción. Según los datos, hay una buena correlación entre pK_a y el porcentaje del fármaco absorbido. Fármacos básicos (pK_a entre 12-15) presentan por lo general una absorción moderada en el intestino, el cual tiene un pH alcalino (absorción menor del 67,60%, compuestos 1,2,3,8,9,13 y 14) a excepción de la azitromicina, que muestra un pK_a = 8,63, y su absorción es pobre (absorción del 46,87%), como la del remdesivir.³

La **cloroquina** y la **hidroxicloroquina** tienen la mejor absorción intestinal, con pK_a de 10,06 y 9,22, respectivamente. Estas dos moléculas tienen un área de superficie polar molecular inferior a $60 \text{ \AA}^2$ que las permiten atravesar la barrera hematoencefálica. Umifenovir es menos ácido ($pK_a = 5,24$) y menos soluble en agua que la cloroquina y la hidroxicloroquina ($\text{LogS} = -60,4$; $\text{LogS} = -4,53$ y $3,77$ respectivamente).³

5. BIOACTIVIDAD.

Gracias a la herramienta **Molinspiration** podemos predecir la bioactividad de las sustancias como: (i) ligando del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) y al receptor nuclear, (ii) como un ion modulador de canal y (iii) como inhibidor de enzimas. Sabiendo esto, podemos conocer la habilidad inhibitoria que tendrá con respecto a las proteínas vitales y enzimas del cuerpo humano. Los resultados obtenidos se pueden utilizar para estimar como de dañinas son las moléculas antivirales para el organismo.³

Solo hay tres fármacos con diferentes estructuras químicas y modos de acción, que no alteran virtualmente ninguna proteína vital: **umifenovir**, **azitromicina** e **ivermectina**. **Remdesivir**, **lopinavir**, **ritonavir**, **daniprevir** se unen solo a una diana, a proteasas, mientras que **favipiravir** puede actuar como modulador de canal de ion similar a otras drogas (5,6,8,9,10,11). Sin embargo, estos últimos pueden cambiar a otras dos o tres dianas humanas. Los fármacos 2,3 y 14 son anti 3CLpro/PLpro, pueden también alterar proteasas humanas. **Remdesivir** y **favipiravir**, como están implicados en la inhibición de RdRp, puede actuar sobre proteasas humanas y canales iónicos, respectivamente. Parece que el **umifenovir** es una molécula esperanzadora, puesto que no infringe ni las reglas de Lipinski-Verber ni los criterios de score de bioactividad.³

6. NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD POTENCIAL CONTRA EL SARS-COV-2.

EXTRACTOS DEL TÉ.

Se realizó un estudio para demostrar las propiedades de una serie de compuestos derivados del té como el **ácido tánico** ($IC_{50} 3M$), **3-isoteaflavina-3-galato (TF2B)**, ($IC_{50} 7M$). Estos dos compuestos pertenecen a un grupo de polifenoles naturales del té. Además, se examinaron en crudo las propiedades de diferentes tipos de té: **té verde**, **té oolong**, **té puer** y **té negro**. También, la **cafeína**, la **epigallocatequina (EGCg)**, **epicatequina (EC)**, **teofilina (TP)**, **catequina (C)**, **galato de epicatequina (ECg)**, **epigallocatequina (EGC)**, **teaflavin- 3,3-digalato (TF3)** y **teaflavina (TF1)**. Para estudiar sus propiedades contra el SARS-CoV, se extrajo un RNA de un paciente con SARS. A través, de RT-PCR se sintetizó el cDNA de SARS-3CLpro. Este se expresó en una *Escherichia coli* como una proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST). Finalmente, se consiguió purificar el sitio de autólisis de SARS-3CLpro. Los compuestos ácido tánico y TF2B fueron activos contra 3CLpro. El ácido tánico es un polifenol soluble en agua que está presente en plantas como el té, vino tinto, cerveza o frutos secos. Los polifenoles del té y muchos componentes tánicos se cree que son anticancerígenos. Se estudiaron además extractos puros de tés. Los extractos del té negro y puer inhibían 3CLpro, mientras que aquellos del verde u oolong no lo hacían. Se comprobó, además, la posible implicación de ingredientes conocidos de los tés como son la cafeína, la teofilina, catequina, la epigallocatequina (EGCg), epicatequina (EC), galato de epicatequina (ECg)

y epigallocatequina (EGC), TF1, TF2, TF2B, ácido tánico y TF3. Los resultados mostraron que cafeína y teofilina no tenían actividad contra 3CLpro. Catequinas (C, EC, ECg, EGC, EGCg) presentes en el té verde y oolong tampoco inhibieron la actividad del 3CLpro. Sin embargo, el ácido tánico, TF2B y TF3 si demostraron actividad inhibitoria. TF2A no se pudo testar. El TF3 contiene dos grupos galato en las posiciones 3 y 3'; TF2A y TF2B, solo tiene un galato o en 3 o en 3'. TF1 no tiene ninguno. Es interesante reseñar que el grupo galato en la posición 3' podría ser importante para TF2B y TF3, en la interacción con 3CLpro. En un estudio se vio que TF3 era la teaflavina más abundante en el té negro (1,05%), seguida de TF2A, TF2 y TF1. Con respecto al ácido tánico, la medida de los niveles en el té negro o verde es difícil, porque constituye una amplia gama de polímeros de 500-300 Da.²⁹

En resumen, el **ácido tánico** y **TF2B** mostraron una inhibición del 50% de la actividad de 3CLpro a concentraciones de 10 µM. Ambos, pertenecen a polifenoles de los tés. Las metilxantinas (cafeína y teofilina) y las catequinas no pudieron inhibir la 3CLpro a concentraciones de 100µM. Sin embargo, **TF1, TF2, TF3** fueron inhibidores más potentes que las cataquinas del té verde. Por lo tanto, se identificaron tres compuestos efectivos: **TF2B, TF3 y ácido tánico**, que han sido capaces de neutralizar *coronavirus* bovino e infecciones por *rotavirus*. Podrían ser útiles en la prevención de la infección entérica de los *coronavirus*.²⁹

Compound library	IC ₅₀ (µM)
3-Isotheaflavin-3-gallate (TF2B)	7
Tannic acid	3
Tea extract	IC ₅₀ (µg/ml)
Oolong tea	125
Green tea	125
Black tea	70
Puer tea	25
Other compositions in green tea	IC ₅₀ (µM)
Caffeine	100
Theophylline	100
Catechin (C)	100
Epigallocatechin (EGC)	100
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg)	100
Epicatechin (EC)	100
Epicatechin gallate (ECg)	100
Theaflavin composition in black tea	IC ₅₀ (µM)
Theaflavin (TF1)	56
Theaflavin-3-gallate, TF-2a and	43
Theaflavin-3'-gallate, TF-2b mixture (TF2)	
Theaflavin-3,3'-digallate (TF3)	9.5

Ilustración 35. Actividad inhibitoria de SARS 3CL^{pro} por productos naturales.²⁹

ANTICUERPOS ANTI-SARS-CoV-2.

Los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 son anticuerpos contra la glicoproteína S del SARS-CoV-2, los cuales se unen al virón y previene la entrada celular. La rápida tasa de mutación de SARS-CoV-2 aumenta la posibilidad de que escapen de los anticuerpos y se creen resistencias a ellos. Por lo tanto, un cóctel de diferentes variantes contra la

proteína S ha sido creado y se administran juntos. El primer conjunto de anticuerpos sintéticos para uso clínico fue desarrollado por Regeneron. El cóctel de anticuerpos REGN-COV2 está en estudios clínicos como parte del grupo de ensayos colaborativos RECOVERY. Han mostrado resultados prometedores en primates y hámsteres.¹⁶ En un ensayo clínico de 275 pacientes en fase 1-3 ha demostrado que reduce la carga viral con mayor eficacia en aquellos pacientes con alta carga viral o aquellos que aún no han desarrollado la inmunidad. Ha sido aprobado por la FDA para pacientes COVID-19 no hospitalizados.²²

7. ENSAYO CLÍNICO SOLIDARITY REALIZADO POR LA OMS.

Los expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han iniciado ensayos clínicos para analizar la mortalidad con cuatro medicamentos antivirales reutilizados: **remdesivir**, **hidroxicloroquina**, **lopinavir** e **interferón beta-1a** en pacientes hospitalizados con COVID-19.³⁰

Han asignado al azar pacientes hospitalizados con COVID-19 entre los regímenes farmacológicos propuestos (cuatro fármacos y el cuidado estándar). Se realizó con la intención a tratar por pares de cada fármaco y su control. Las tasas de mortalidad se calcularon de forma estratificada según la edad y la ventilación mecánica al ingreso en el ensayo.³⁰

Se realizó en 405 hospitales de 30 países diferentes y 11330 adultos fueron estudiados: 2750 fueron asignados a **remdesivir**, 954 a **hidroxicloroquina**, 1411 a **lopinavir**, 2063 a **interferón** (incluyendo 651 de interferón más lopinavir), y 4088 fueron controles. La adherencia fue de 94% a 96% a mitad del tratamiento con un 2-6% de cambio. En total, ocurrieron 1253 muertes (la mediana del día de muerte fue el día 8). Según el análisis de Kaplan-Meier, la mortalidad al día 28 fue del 11,8%.³⁰

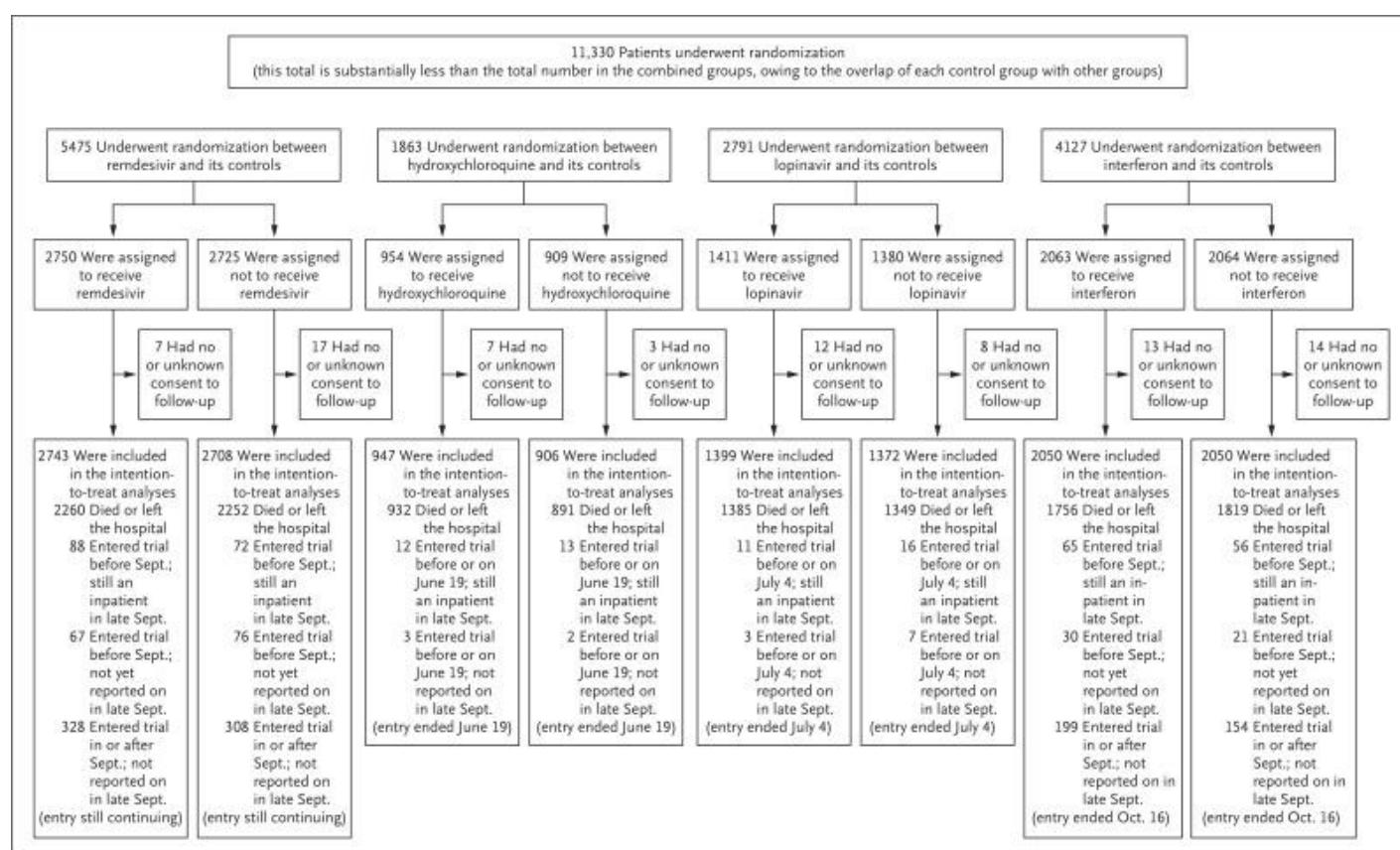


Ilustración 36. Diseño del ensayo clínico SOLIDARITY.³⁰

301 de los 2743 pacientes con **remdesivir** murieron respecto a 303 de los 2078 de su control (RR 0,95; IC 95% 0,81 a 1,11; P= 0,50). 104 de los 947 pacientes que recibieron **hidroxicloroquina** y 84 de los 906 de su control fallecieron (RR 1,19; IC 95% 0, 89 a 1,59; P= 0,23). 148 de los 1399 pacientes que recibieron **lopinavir** y 146 de los

1372 de su control (RR 1,00; 95% IC 0,79 a 1,25; P=0,97). 243 de los 2050 pacientes que recibieron **interferón** y 216 de los 2050 de su control murieron (RR 1,16; IC 95% 0,96 a 1,39; P= 0,11). Ningún fármaco redujo significativamente la mortalidad, en general o en algún subgrupo, ni la duración del tratamiento con ventilación en el hospital.³⁰

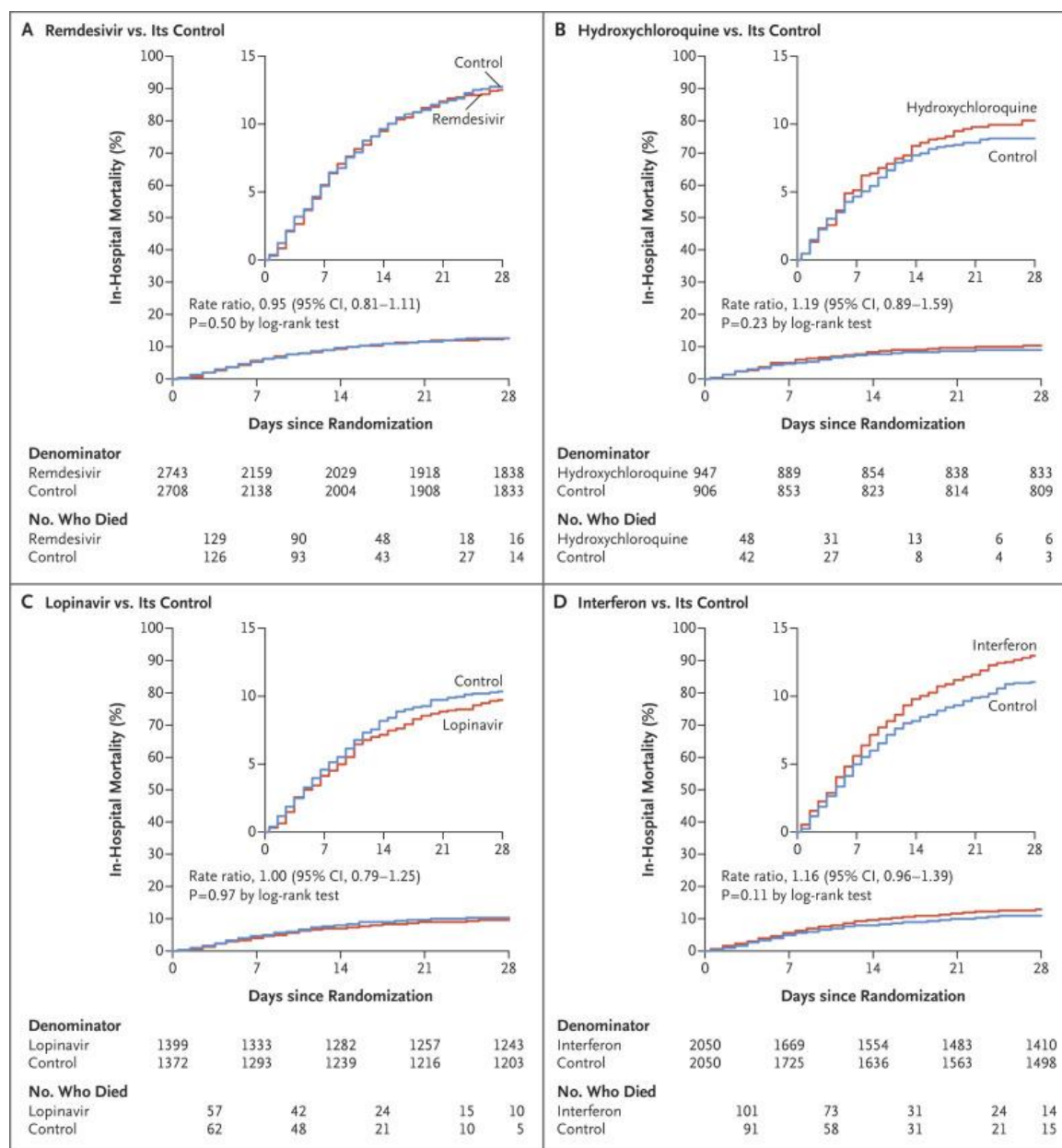


Ilustración 19. Efectos del remdesivir, hidroxicloroquina, lopinavir e interferón en la mortalidad hospitalaria por COVID-19.³⁰

8. CONCLUSIONES.

La enfermedad producida por el *coronavirus SARS-CoV-2*, llamada COVID-19, apareció en diciembre de 2019 en China. Rápidamente, se fue extendiendo por los demás países, convirtiéndose en una enfermedad de carácter pandémico. Todos los sectores se han visto severamente afectados, principalmente la sanidad, la economía y la sociedad en general.

Multitud de estudios han sido y están siendo llevados a cabo por diferentes empresas farmacéuticas e instituciones científicas para intentar encontrar una solución contra la COVID-19. Numerosos compuestos están siendo estudiados, desde fármacos antivirales ya utilizados contra otros virus, hasta fármacos utilizados en otras enfermedades cuyo mecanismo de acción sobre el *SARS-CoV-2* es diferente al habitual. Hasta la fecha, existen pocos resultados que demuestran mejora significativa en la reducción de la mortalidad o en el curso de la enfermedad.

Inicialmente, remdesivir era el fármaco más prometedor para tratar la COVID-19. Algunos ensayos clínicos demostraron que disminuía la estancia hospitalaria y la mortalidad, tanto es así que fue aprobado por la FDA para uso de emergencia en pacientes hospitalizados. No obstante, recientemente, debido a los resultados obtenidos en el estudio SOLIDARITY, la OMS ha desaconsejado su uso.

Por otro lado, sí que hay evidencias significativas de que la dexametasona reduce la mortalidad en aquellos pacientes con COVID-19 con soporte ventilatorio, sin embargo, no produce modificaciones en los que no lo necesitan.

Nuevos compuestos como los anticuerpos anti-*SARS-CoV-2* están siendo diseñados de forma exclusiva para dicha enfermedad. Han sido ya testados en pacientes con COVID-19, reduciendo la carga viral, sobre todo en pacientes con alta carga viral o en los que aún no han desarrollado la inmunidad, por lo que, han sido aprobados por la FDA para pacientes COVID-19 no hospitalizados.

A pesar de que todavía no existen muchos resultados de verdadera significación estadística *in vivo*, multitud de fármacos están obteniendo resultados prometedores *in vitro*, por lo que, actualmente, nuevos fármacos están siendo ya estudiados en ensayos clínicos.

El *SARS-CoV-2* se ha convertido en la primera preocupación a nivel mundial, por lo que se espera obtener nuevos resultados en un futuro más cercano.

9. ABREVIATURAS.

- **3CLpro/PLpro:** proteasa tipo 3C/proteasa tipo papaína.
- **AAK-1:** proteína quinasa asociada a AP-2 (AAK-1).
- **CC₅₀:** concentración máxima citotóxica.
- **CCDC:** Centro Chino para el Control y Prevención de Enfermedades.
- **CoV:** *Coronavirus*.
- **COVID-19:** enfermedad por *coronavirus* 2019.
- **EC₅₀:** concentración requerida de un fármaco para producir el 50% del efecto máximo de dicho compuesto.
- **ECA2:** enzima convertidora de la angiotensina 2.
- **FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU.
- **GAK:** quinasa asociada a la ciclina G (GAK).
- **GLN:** glutamina.
- **Gp:** glucoproteína.
- **GPCR:** ligando del receptor acoplado a proteínas G.
- **IC₅₀:** concentración a la que un fármaco es capaz de inhibir un proceso biológico concreto en un 50%.
- **IFN:** interferón.
- **IL:** interleuquina.
- **iNOS:** sintetasa inducible de óxido nítrico.
- **JAK:** quinasa Janus.
- **KD:** constante de disociación.
- **LPS:** lipopolisacárido bacteriano.
- **LPV:** lopinavir.
- **LYS:** lisina.
- **MERS-CoV:** *coronavirus* del síndrome respiratorio de Oriente Medio.
- **MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad.
- **NIH:** Instituto Nacional de Salud de EE.UU.
- **NSP:** proteína no estructural.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **OR:** Odds ratio.
- **ORF:** Open Reading Frame (marco de lectura abierta).
- **pK_a:** logaritmo negativo de la constante de disociación ácida Ka.
- **pp:** poliproteínas.
- **Proteína S:** proteína spike.
- **RdRp:** polimerasa dependiente de RNA.
- **RTV:** ritonavir.
- **SARS-CoV:** Síndrome respiratorio agudo severo *coronavirus*.
- **SARS-CoV-2:** Síndrome respiratorio agudo severo *coronavirus* 2.
- **SDRA:** Síndrome de distrés respiratorio agudo.
- **SNC:** sistema nervioso central.
- **STAT:** transductor de señal y el activador de la transcripción.
- **TAC:** Tomografía axial computarizada.
- **TLR:** receptores tipo Toll.
- **TMPRSS2:** serina proteasa transmembrana 2.
- **TPSA:** área de la superficie polar topológica.

- **TYR:** tirosina.
- **UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.
- **VHC:** *Virus de la hepatitis C.*
- **VIH:** *Virus de la inmunodeficiencia humana.*
- **VSR:** *Virus respiratorio sincitial.*
- **Zn:** Zinc.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Kivrak A, Ulaş B, Kivrak H. A comparative analysis for anti-viral drugs: Their efficiency against SARS-CoV-2. *Int Immunopharmacol*. 2021 Jan;90:107232. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107232. Epub 2020 Nov 30.
2. Dos Santos WG. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110493. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110493.
3. Kouznetsov VV. COVID-19 treatment: Much research and testing, but far, few magic bullets against SARS-CoV-2 coronavirus. *Eur J Med Chem*. 2020 Oct 1;203:112647. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112647. Epub 2020 Jul 15.
4. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. Covid19.who.int. 2021 [11 May 2021]. <https://covid19.who.int/>.
5. Martinez MA. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Apr 21;64(5):e00399-20. doi: 10.1128/AAC.00399-20.
6. Ippolito D, Maino C, Pecorelli A, Allegranza P, Cangiotti C, Capodaglio C, Mariani I, Giandola T, Gandola D, Bianco I, Ragusi M, Franzesi CT, Corso R, Sironi S. Chest X-ray features of SARS-CoV-2 in the emergency department: a multicenter experience from northern Italian hospitals. *Respir Med*. 2020 Aug-Sep;170:106036. doi: 10.1016/j.rmed.2020.106036. Epub 2020 May 22.
7. Xu X, Yu C, Qu J, Zhang L, Jiang S, Huang D, Chen B, Zhang Z, Guan W, Ling Z, Jiang R, Hu T, Ding Y, Lin L, Gan Q, Luo L, Tang X, Liu J. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020 May;47(5):1275-1280. doi: 10.1007/s00259-020-04735-9. Epub 2020 Feb 28.
8. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol*. 2020 Apr;42(1):3-11. PMID: 32342926.
9. Velázquez-Silva RI. Historia de las infecciones por coronavirus y epidemiología de la infección por SARS-CoV-2. *Rev Mex Traspl*. 2020;9(Suppl: 2):149-159. doi:10.35366/94504.
10. Valle C, Martin B, Touret F, Shannon A, Canard B, Guillemot JC, Coutard B, Decroly E. Drugs against SARS-CoV-2: What do we know about their mode of action? *Rev Med Virol*. 2020 Nov;30(6):1-10. doi: 10.1002/rmv.2143. Epub 2020 Aug 11.
11. Blaess M, Kaiser L, Sauer M, Csuk R, Deigner HP. COVID-19/SARS-CoV-2 Infection: Lysosomes and Lysosomotropism Implicate New Treatment Strategies and Personal Risks. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 13;21(14):4953. doi: 10.3390/ijms21144953.
12. COVID-19 reutilizar medicamentos ya aprobados - IBIAN Technologies [Internet]. IBIAN Technologies. 2021 [cited 15 May 2021]. Available from: <https://www.ibiantech.com/covid-19-reutilizar-medicamentos-ya-aprobados/>
13. Isasi, S. C., & Muiño, J. C. (2020). SARS NCOV-19 Y ECA2: Cumbres borrascosas. una relación intensa, estrecha, escondida o devastadora, pero siempre profunda SARS nCoV-19 and ECA2: Wuthering Heights. An intense, close, hidden or devastating relationship, but always deep. *Archivos de alergia e inmunología clínica*, 51(2), 69-82.

14. Rumlová M, Ruml T. In vitro methods for testing antiviral drugs. *Biotechnol Adv.* 2018 May-Jun;36(3):557-576. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.016. Epub 2017 Dec 29.
15. Ramos, T. I. (2016). Contexto actual de los estudios preclínicos. *Bionatura*, 1(3), 103-105.
16. Munshi I, Khandvilkar A, Chavan SM, Sachdeva G, Mahale SD, Chaudhari UK. An overview of preclinical animal models for SARS-CoV-2 pathogenicity. *Indian J Med Res.* 2021 Jan & Feb;153(1 & 2):17-25. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_3215_20.
17. Magos G.A; Lorenzana-jiménez M. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*, 2009, vol. 52, no 6.
18. Mostafa A, Kandeil A, A M M Elshaier Y, Kutkat O, Moatasim Y, Rashad AA, Shehata M, Gomaa MR, Mahrous N, Mahmoud SH, GabAllah M, Abbas H, Taweel AE, Kayed AE, Kamel MN, Sayes ME, Mahmoud DB, El-Shesheny R, Kayali G, Ali MA. FDA-Approved Drugs with Potent *In Vitro* Antiviral Activity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Dec 4;13(12):E443. doi: 10.3390/ph13120443.
19. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7. Epub 2020 Oct 6.
20. Andrade, B. S., FdeS, R., Santos, N. O., AdosS, F., WRdeA, S., Siqueira, S., ... & VAdeC, A. (2020). Repurposing Approved Drugs for Guiding COVID-19 Prophylaxis: A Systematic Review. *Front. Pharmacol.* 11: 590598. doi: 10.3389/fphar. 2020.590598. *Frontiers in Pharmacology* | www.frontiersin.org, 11.w
21. Yousefi H, Mashouri L, Okpechi SC, Alahari N, Alahari SK. Repurposing existing drugs for the treatment of COVID-19/SARS-CoV-2 infection: A review describing drug mechanisms of action. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jan;183:114296. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114296. Epub 2020 Oct 22.
22. Golamari R, Kapoor N, Devaraj T, Sahu N, Kramer C, Jain R. Experimental therapies under investigation for COVID-19. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2021 Mar 23;11(2):187-193. doi: 10.1080/20009666.2021.1874093.
23. Izda V, Jeffries MA, Sawalha AH. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. *Clin Immunol.* 2021 Jan;222:108634. doi: 10.1016/j.clim.2020.108634. Epub 2020 Nov 17.
24. Mirtaleb MS, Mirtaleb AH, Nosrati H, Heshmatnia J, Falak R, Zolfaghari Emameh R. Potential therapeutic agents to COVID-19: An update review on antiviral therapy, immunotherapy, and cell therapy. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jun;138:111518. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111518. Epub 2021 Mar 16.
25. Quek E, Tahir H, Kumar P, Hastings R, Jha R. Treatment of COVID-19: a review of current and prospective pharmacotherapies. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2021 Mar 2;82(3):1-9. doi: 10.12968/hmed.2021.0112. Epub 2021 Mar 12.
26. Hoffmann M, Schroeder S, Kleine-Weber H, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 May 21;64(6):e00754-20. doi: 10.1128/AAC.00754-20.
27. Das S, Ramachandran AK, Birangal SR, Akbar S, Ahmed B, Joseph A. The controversial therapeutic journey of chloroquine and hydroxychloroquine in the

- battle against SARS-CoV-2: A comprehensive review. *Med Drug Discov.* 2021 Jun;10:100085. doi: 10.1016/j.medidd.2021.100085. Epub 2021 Mar 10.
28. Stellari FF, Sala A, Donofrio G, Ruscitti F, Caruso P, Topini TM, Francis KP, Li X, Carnini C, Civelli M, Villetti G. Azithromycin inhibits nuclear factor- κ B activation during lung inflammation: an in vivo imaging study. *Pharmacol Res Perspect.* 2014 Oct;2(5):e00058. doi: 10.1002/prp2.58. Epub 2014 Jul 2.
 29. Chen CN, Lin CP, Huang KK, Chen WC, Hsieh HP, Liang PH, Hsu JT. Inhibition of SARS-CoV 3C-like Protease Activity by Theaflavin-3,3'-digallate (TF3). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005 Jun;2(2):209-215. doi: 10.1093/ecam/neh081. Epub 2005 Apr 7.
 30. WHO Solidarity Trial Consortium, Pan H, Peto R, Henao-Restrepo AM, Preziosi MP, Sathiyamoorthy V, Abdool Karim Q, Alejandria MM, Hernández García C, Kieny MP, Malekzadeh R, Murthy S, Reddy KS, Roses Periago M, Abi Hanna P, Ader F, Al-Bader AM, Alhasawi A, Allum E, Alotaibi A, Alvarez-Moreno CA, Appadoo S, Asiri A, Aukrust P, Barratt-Due A, Bellani S, Branca M, Cappel-Porter HBC, Cerrato N, Chow TS, Como N, Eustace J, García PJ, Godbole S, Gotuzzo E, Griskevicius L, Hamra R, Hassan M, Hassany M, Hutton D, Irmansyah I, Jancoriene L, Kirwan J, Kumar S, Lennon P, Lopardo G, Lydon P, Magrini N, Maguire T, Manevska S, Manuel O, McGinty S, Medina MT, Mesa Rubio ML, Miranda-Montoya MC, Nel J, Nunes EP, Perola M, Portolés A, Rasmin MR, Raza A, Rees H, Reges PPS, Rogers CA, Salami K, Salvadori MI, Sinani N, Sterne JAC, Stevanovikj M, Tacconelli E, Tikkinen KAO, Trelle S, Zaid H, Røttingen JA, Swaminathan S. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 - Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med.* 2021 Feb 11;384(6):497-511. doi: 10.1056/NEJMoa2023184. Epub 2020 Dec 2.

11. AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis directores del TFG, Jesús Navas Méndez y José Ramos Vivas, por la disponibilidad e implicación mostrada en todo momento, este trabajo ha estado guiado en todo momento por vuestros consejos y directrices. En estos tiempos de pandemia, la comunicación a veces es más difícil y gracias a vuestra ayuda, no ha sido así. También, agradecer a María José Calvo por su diseño del *coronavirus*.

Además, gracias a todas aquellas personas que me han ayudado durante estos años de carrera. Gracias a mi hermano, mis padres, mi novia, mis amigos, y en especial, me gustaría dar gracias a mis abuelos. Este último año no ha sido fácil para nadie, pero, sobre todo para las personas más mayores, sois unos luchadores. También, gracias a muchos otros más de los que no me quisiera olvidar. Estos últimos años sin vosotros no hubiera sido lo mismo.