bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Posted 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional License.

El azul de metileno es un inhibidor inespecífico de la interacción proteína-proteína con potencial de reutilización como antiviral para COVID-19

Sung-Ting Chuang[1], Henrietta Papp[2,3], Anett Kuczmog[2,3], Rebecca Eells[4], Jose M. Cóndor Capcha[5,6], Lina A. Shehadeh[5,6], Ferenc Jakab[2,3] y Peter Buchwald*[1,7]

[1] Instituto de Investigación de la Diabetes, [5]División de Cardiología, [6] Instituto Interdisciplinario de Células Madre, y [7]Departamento de Farmacología Molecular y Celular, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, Florida, USA

[2 Laboratorio]Nacional de Virología y [3]Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Pécs, Pécs, Hungría

[4] Biología de la reacción, Malvern, PA, Estados Unidos

*Autor para correspondencia: Teléfono: 305 243-9657, pbuchwald@med.miami.edu, Diabetes Research Institute, Miller School of Medicine, Universidad de Miami, 1450 NW 10 Ave, Miami, FL 33136, Estados Unidos.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

ABSTRACTO

Hemos identificado previamente el azul de metileno, un colorante tricíclico de fenotiazina aprobado para uso clínico para el tratamiento de la metahemoglobinemia y utilizado para otras aplicaciones médicas, como un pequeño -inhibidor molecular de la interacción proteína-proteína (IBP) entre la proteína espiga del coronavirus SARS-CoV-2 y la ECA2, la primera crítica paso del apego y entrada de este coronavirus responsable de la pandemia del COVID19. Aquí, mostramos que la concentración de azul de metileno inhibe este IBP para la proteína espiga de la cepa original, así como para las de las variantes de preocupaciones como el mutante D614G y delta (B.1.617.2) con IC_{50} en el rango micromolar bajo (1-5 µM). El azul de metileno también mostró actividad promiscua e inhibió varios otros IBP de proteínas virales (por ejemplo, HCoV-NL63 – ACE2, virus de la hepatitis C E – CD81) así como otros (por ejemplo, IL-2 – IL-2R□) con potencia similar. A pesar de esta no especificidad, el azul de metileno inhibió la entrada de pseudovirus portadores de la proteína espiga del SARS.

CoV-2 en células huésped que expresan hACE2 tanto para la cepa original como para la variante delta. También bloqueó la replicación del virus SARSCoV-2 (B.1.5) en células Vero E6 con un IC_{50} en el rango micromolar bajo (1,7 µM) cuando se ensayó mediante PCR cuantitativa del ARN viral. Por lo tanto, mientras que parece ser un inhibidor promiscuo del IBP con baja actividad micromolar y tiene un índice terapéutico relativamente estrecho, el azul de metileno inhibe la entrada y replicación del SARS-CoV-2, incluyendo varias de sus variantes mutantes, y tiene potencial como posible económico, de amplio espectro, por vía oral antiviral bioactivo de molécula pequeña para la prevención y el tratamiento de covid-19.

Palabras clave: ACE2, coronavirus, COVID-19, variante delta (B.1.617.2), reposicionamiento de fármacos, azul de metileno, antiviral oral, proteína-proteína interacción, SARS-CoV-2, pico proteína.

INTRODUCCIÓN

El síndrome respiratorio agudo severo-coronavirus 2 (SARS-CoV-2), un betacoronavirus surgido a finales de 2019 y responsable de la actual pandemia de COVID-19 [1-4], es el agente más infeccioso en un siglo [5]. Entre los siete coronavirus (CoV) que actualmente se sabe que infectan a los humanos, que incluyen cuatro que causan solo resfriados comunes (HCoV 229E, OC43, NL63 y HKU1) y dos que causaron epidemias recientes anteriores de alta mortalidad (SARS-CoV-1 ~ 10% y MERS-CoV ~ 35%), SARS-CoV-2 causado por mucho la mayor salud y daños económicos a pesar de su menor mortalidad general en comparación con los dos últimos. A pesar del éxito del reciente programa de vacunación, todavía existe una considerable necesidad terapéutica de antivirales, como una parte significativa de la población no puede o no quiere vacunarse y las mutaciones están disminuyendo la eficacia de la vacuna , por lo que es probable que las infecciones por SARS-CoV-2 continuar en el futuro previsible . Los antivirales biodisponibles por vía oral son especialmente interesantes ya que los tratamientos orales se pueden tomar fácilmente después de los primeros síntomas. Si bien los esfuerzos para reutilizar los medicamentos aprobados para el SARS-CoV2 tuvieron un éxito muy limitado hasta ahora [6, 7], dos nuevos medicamentos con antivirales clásicos Los mecanismos (es decir, la inhibición de la actividad de la proteasa o la reproducción viral) han demostrado ser prometedores y han otorgado autorización de uso de emergencia por parte de los Estados Unidos Food y

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

Administración de Medicamentos (FDA) para el tratamiento de COVID-19: molnupiravir (Emory University, Ridgeback Biotherapeutics y Merck) [8] y nirmatrelvir (Pfizer; como parte de la combinación de nirmatrelvir/ritonavir Paxlovid) [9].

Debido a nuestro interés en los inhibidores de moléculas pequeñas (SMI) de las interacciones proteína-proteína (IBP) [10, 11], nos centramos en un objetivo alternativo y buscamos posibles inhibidores de los IBP entre las proteínas espiga de CoV (S) y sus receptores de superficie celular cognados necesarios para iniciar unión celular y entrada de virus (enzima convertidora de angiotensina 2 , ACE2, tanto para SARS-CoV-1 como para SARS-CoV-2) [12]. Si bien las SMI para IBP son más difíciles de identificar que los anticuerpos, se han logrado avances, y tres IMF de IBP ahora están aprobadas para uso clínico (venetoclax [13], lifitegrast [14] y fostemsavir [15]) [11, 16-18]. En particular, fostemsavir se dirige a la unión de gp120 a CD4 para bloquear la unión y entrada al VIH , validando aún más una estrategia inhibitoria del IBP para el descubrimiento de fármacos antivirales. Partiendo de esta premisa, iniciamos un cribado para identificar posibles SMIs de este IBP [12], durante el cual descubrimos que el azul de metileno (MeBlu), un colorante tricíclico de molécula pequeña, que está aprobado para el tratamiento de la metahemoglobinemia adquirida y algunos otros usos clínicos [19-22], inhibe el IBP sars-CoV-2 – hACE2 y la entrada de pseudovirus portadores de picos de SARS-CoV-2 en la expresión de ACE2 células [23]. Aquí, mostramos que MeBlu inhibe estos incluso para mutantes como D614G y variantes de preocupación (VoC) como delta (B.1.617.2; detectado por primera vez en la India, octubre de 2020) que han surgido desde entonces. La mutación D614G aumenta la infectividad, la tasa de transmisión y la eficiencia de la entrada celular para el SARS-CoV-2 [24] y está presente en todas las variantes posteriores de infectividad. Delta es un VoC que muestra una mayor transmisibilidad y reducción de la neutralización por sueros posteriores a la vacunación [25].

También mostramos que MeBlu inhibe la replicación de una cepa nativa/infecciosa de SARS-CoV-2 (B.1.5) en células Vero E6. Si bien encontramos que MeBlu tiene una aparente actividad inhibitoria promiscua del IBP y un índice terapéutico relativamente estrecho, este fármaco barato y clínicamente utilizado durante mucho tiempo aún podría ser de interés como tratamiento oral para la prevención y terapia de COVID-19, especialmente en naciones no industrializadas con acceso limitado a vacunas patentadas y antivirales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de unión

El azul de metileno y otros compuestos de prueba utilizados aquí se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y utilizado como tal. Las purezas (y números de catálogo) fueron las siguientes: azul de metileno >95% (M4159), cloroquina >98,5% (C6628), hidroxicloroquina >98% (H0915), nutol azul >99% (70490), y amarillo anaranjado FCF 90% (465224). Las proteínas utilizadas en los ensayos de unión se obtuvieron de Sino Biological (Wayne, PA, USA) de la siguiente manera: ACE2-Fc humano (10108-H05H), SARS-CoV-2 S1 (Su etiqueta, 40591-V08H), RBD (Su etiqueta, 40592-V08H), D614G S1 (Su etiqueta, 40591-V08H3), delta S1 (Su etiqueta, 40591V08H23), delta RBD (Su etiqueta, 40592-V08H90), y HCoV-NL63 S1 (Su etiqueta, 40600-V08H). HepCV E (Su etiqueta, 9146-HC) y CD81-Fc (9144-CD) eran de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); IL-2 (su etiqueta, IL2H52H8) e IL-2R α-Fc (ILA-H5251) eran de ACROBiosystems (Newark, DE, USA). Las mutaciones en la variante delta S1 (40591-V08H23) son T19R, G142D, E156G, deleción 157-158, L452R, T478K, D614G y P681R. Las mutaciones en la variante delta RBD (40592-V08H90) son L452R y T478K. Los ensayos de inhibición de unión se realizaron

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

en un formato libre de células de 96 pocillos como se describió anteriormente [12, 23]. Brevemente, placas de microtitulación (Nunc F Maxisorp, 96-pozo; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) se recubrieron durante la noche a 4 °C con 100 µL/pocillo de proteínas receptoras conjugadas fc diluidas en PBS pH 7.2. Esto fue seguido por el bloqueo con 200 µL / pozo del 2% BSA (A7030, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron dos veces con solución de lavado (PBS pH 7.4, 0.05% Tween-20) y se secaron antes de la adición del ligando marcado. proteínas y compuestos de prueba diluidos en tampón de unión (20 mM HEPES, pH 7.2) para dar un volumen total de 100 µL/pozo. Después de 1 h de incubación, se realizaron tres lavados , y otra incubación de 1 h con conjugado anti-His HRP (652504; BioLegend, San Diego, CA, USA) diluido (1:20000) en BSA al 2% se utilizó para detectar el ligando unido his-marcado. Las placas se lavaron cuatro veces antes de la adición de 100 µL/pocillo de sustrato HRP TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y se mantuvieron en la oscuridad para arriba a 15 min. La reacción se detuvo utilizando 20 ?L de 1M H_2SO_4; los valores de absorbancia se leyeron a 450 nm. Las concentraciones chapadas de proteínas receptoras conjugadas fc fueron de 1,0 ?g/mL ACE2 para SARSCoV-2 RBD y D614G S1 variante, 0,5 ?g/mL ACE2 para delta RBD y delta S1, 2,0 ?g/mL ACE2 para HCoVNL63, 1,0 ?g/mL IL-2Rα para IL-2 y 2,0 ? g/mL CD81 para HepCV E. Las concentraciones de los ligandos utilizados en los ensayos inhibitorios fueron de 0,5 µg/ml para RBD, 1,0 ?g/ml para la variante D614G S1 y delta S1, 0,5 ?g/mL para delta RBD, 20 ?g/mL para HCoV-NL63, 0,03 ?g/mL para IL-2 y 2,0 ? g/mL para HepCV E. Estos valores se seleccionaron después de pruebas preliminares para optimizar la respuesta (es decir, para producir una señal lo suficientemente alta en condiciones cercanas a la mitad máxima). respuesta, CE_{50}). Para todos los compuestos, se utilizaron soluciones de stock de 10 mM en DMSO.

Ensayos de pseudovirus sars-CoV-2

Para los ensayos basados en BacMam, biosensores fluorescentes de Montana Molecular (C1100R y C1110G, C1123G; Bozeman, MT, USA) se utilizaron según las instrucciones del fabricante con modificaciones menores como se describió anteriormente [12, 23]. Las mutaciones en la variante delta (C1123G) son T19R, V70F, T95I, G142D, E156-, F157-, R158G, A222V, W258L, K417N, L452R, T478K, D614G, P681R y D950N. Brevemente, células HEK293T (CRL-3216; ATCC, Manassas, VA, USA) se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pozo en medio completo de 100 ?L (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino). Se añadió una mezcla de transducción que contenía el virus ACE2 BacMam Red-Reporter ($1,8\times10^8$ VG/mL) y 2 mM de butirato de sodio preparado en medio completo (50 ? L por pozo) e incubado durante 24 h a 37°C y 5% CO_2. El medio se eliminó, se lavó una vez con PBS y se reemplazó con un medio fresco de 100 ?L que contenía compuesto de prueba a concentraciones seleccionadas, pre- incubando durante 30 min a 37°C y 5% CO_2. Una mezcla de transducción que contiene pseudo SARS-CoV-2 Green-Reporter pseudovirus o Pseudo SARS-CoV-2 Spike Delta Variant Green- Se añadió pseudovirus receptor ($3,3\times10^8$ VG/mL) y butirato de sodio de 2 mM preparado en medio completo (50 ?L por pocillo) y incubado durante 48 h a 37°C y 5% CO_2. El medio se eliminó, se lavó una vez con PBS, se reemplazó con un medio fresco de 150 ?L y se incubaron células durante 48 h adicionales a 37 ° C y 5% CO_2. La fluorescencia celular se detectó utilizando un microscopio EVOS FL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se cuantificó en ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [26] utilizando la herramienta Analizar partículas después del umbral para los colores correspondientes.

Para el ensayo basado en VSV-?G, se utilizó el pseudovirus portador de SARS-CoV-2 S generado internamente como se describió anteriormente [12, 27]. Células Vero-E6 (células epiteliales renales del mono verde africano; Gato ATCC. No. CRL1586) Diseñados para sobreexpresar hACE2/Furin se sembraron en placas de 24 pocillos para obtener una confluencia del 80%. El medio fue reemplazado por 250 ?L de medio de cultivo celular

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

(DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 2%, penicilina/estreptomicina/glutamina al 1% y los compuestos de interés durante 30 min a 37°C. Las células fueron inoculadas con la proteína espiga del SARS-CoV-2 pseudotipada VSV-□G (multiplicidad de infección = 0,05) añadiendo completa Para llevar el volumen final a 400 □L, y 20 h después de la infección, las placas se escanearon con un objetivo de 10× utilizando el Incucyte Sistema de imágenes ZOOM (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA).

Los valores normalizados de expresión GFP (GCU) por imagen se obtuvieron dividiendo la Intensidad Total De Objetos Verdes Integrados [Unidades Calibradas Verdes (GCU) × □m 2/imagen] valores de cada imagen por su correspondiente área de fase total (□m^2/imagen) como se describió anteriormente [12, 27].

Ensayo de citotoxicidad

Para el ensayo MTT, las células HEK293T se sembraron en 96 pocillos con una densidad de 5,0x10^4 células por pozo. Las células se trataron con MeBlu durante 48 h y luego se reemplazaron con medio fresco durante 48 h adicionales. Después de eso, las células se incubaron con el reactivo MTT a 37 ° C durante 2 h. Retire el medio y se agregó dimetilsulfóxido. La viabilidad celular se evaluó utilizando un lector de microplacas a 570 nm de absorbancia (SpectraMax iD3, Molecular DEVICES, San José, California, EE. UU.).

Resistencia de plasmón superficial

La SPR se realizó en Reaction Biology (Malvern, PA) utilizando cinética de ciclo único y múltiple para evaluar la unión al pico RBD del SARS-CoV-2 (His- etiquetado, Arg319-Ph541; RayBiotech) y determinar la cinética/afinidad. Las mediciones se realizaron en un Biacore 8K (Cytiva) con un chip sensor de la serie S CM5 (Cytiva). Spike RBD se inmovilizó a través del acoplamiento de amina a pH 5.5 a niveles de inmovilización de ~ 15002300 RU (ciclo único) y ~ 2500 RU (ciclo múltiple). Se utilizó un tampón en funcionamiento de PBS-p+ (tampón de fosfato de 20 mM con KCl de 2,7 mM, NaCl de 137 mM y tensioactivo al 0,05% tween20) con DMSO al 1% . Todos los datos se corrigieron con disolvente, se restó la referencia y se restó en blanco utilizando el software de evaluación Biacore Insight. Para tratar de obtener parámetros cinéticos/de afinidad, los datos se evaluaron utilizando un modelo de unión cinética 1:1. Sin embargo, el comportamiento de enlace parece ser más complejo de lo que se puede aproximar utilizando un modelo de enlace 1:1, lo que impide un análisis cuantitativo. de los datos vinculantes del SPR .

***Ensayo* antiviral in vitro del SARS-CoV-2**

El ensayo se realizó en condiciones BSL-4 [28, 29]. Brevemente, las células Vero E6 (Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados) se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^4 células por pozo en 100 µL de medios de cultivo celular que consistieron en DMEM (Lonza, Basilea, Suiza), penicilina-estreptomicina al 1% (Lonza, Basilea, Suiza) y 2% de calor -suero fetal bovino inactivado (Gibco, Waltham, MA, USA) el día antes del experimento. Al día siguiente, los clientes fueron tratados con el compuesto de ensayo (MeBlu) a concentraciones predefinidas (14, 12, 8, 6, 4, 2, 1 y 0,5 □ M) obtenido diluyendo soluciones madre dmSO con el medio de cultivo celular. Inmediatamente después del tratamiento, las células se infectaron con SARS-CoV-2 (hCoV19/Hungary/SRC_isolate_2/2020, GISAID ID: EPI_ISL_483637) en MOI: 0.01. Las células se incubaron durante 30 min a 37 ° C, luego el sobrenadante se reemplazó con medios de mantenimiento frescos complementados con los compuestos en el momento apropiado. concentración. La extracción de ácido nucleico se realizó a partir del sobrenadante utilizando un sistema de aislamiento de ácido nucleico basado en perlas magnéticas (Zybio, Chongqing, China; EXM 3000 Sistema de aislamiento de ácido nucleico) 48 h después de la infección. El número de copias virales se determinó utilizando cebadores

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

y sondas específicos del gen RdRp del SARS-CoV-2 (ver [28]) y PCR digital de gotas (Bio- Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, Estados Unidos; Sistema de PCR Digital QX200 Droplet). Los números de copias se normalizaron a la media de los pozos infectados no tratados, *n* = 3 réplicas biológicas. Los valores de IC_{50} se determinaron mediante análisis de regresión no lineal (modelo logístico de cuatro parámetros; GraphPad Prisma 8).

Estadísticas y ajuste de datos

La inhibición de la unión y los ensayos celulares se realizaron por duplicado por placas, y los ensayos se realizaron como al menos dos o tres experimentos independientes. Al igual que antes [12, 23], los datos de unión se convirtieron en porcentaje de inhibición y se ajustaron con inhibidor de registro estándar vs. modelos de respuesta normalizada [30] utilizando regresión no lineal en GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA) para establecer concentraciones inhibitorias medio máximas (IC_{50}).

RESULTADOS

Inhibición del pico de SARS-CoV-2 – IBP hACE2

Hemos identificado MeBlu como un inhibidor de la proteína SARS-CoV-2 S – ACE2 PPI, un PPI PPI para la unión viral y la entrada de este nuevo coronavirus altamente infeccioso [23]. En nuestro ensayo de tipo ELISA, MeBlu inhibió la interacción entre el dominio de unión al receptor (RBD) del pico SARS-CoV-2 de la cepa original. y hACE2 de manera típica sensible a la concentración con un IC_{50} de 3,03 □M (IC del 95%: 2,54 – 3,61 □M), mientras que otros dos colorantes se incluyeron como control, amarillo atardecer FCF (FD&C amarillo #6; SY) y el negro azul naftólico (NBlBk), así como la cloroquina no mostraron tal actividad (IC_{50} > 500 □M; Figura 1A). En general de acuerdo con esto, las mediciones de resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando cinética de un solo ciclo y multiciclo indicaron que MeBlu se une a la El pico de RBD del SARS-CoV-2 en el rango micromolar bajo (Información complementaria, Figura S1). Sin embargo, el comportamiento de enlace parece ser más complejo de lo que puede ser descrito por un estándar de interacciones de enlace 1:1, y dado que fue No está claro a partir de los datos de SPR por sí solos qué modelo describiría mejor este comportamiento, no se han determinado los valores de kinetics/afinidad. La cinética de un solo ciclo indicó que MeBlu también se une a hACE2 en el rango micromolar bajo, nuevamente, de una manera que no pudo ser descrita bien por un estándar de interacciones de enlace 1:1 (datos no mostrados).

En particular, especialmente a la luz de la aparición de varios mutantes del SARS-CoV-2 y variantes de preocupaciones (VoCs) [31], MeBlu también inhibió la unión de mutantes. proteínas espiga a hACE2 con actividades muy similares. Por ejemplo, MeBlu inhibió la unión de la proteína espiga mutante D614G (porción S1) con un IC_{50} de 0,76 □M (IC del 95%: 0,65 – 0,90; Figura 1B). La actividad inhibitoria se mantuvo aproximadamente igual para el delta (B.1.617.2) variante de preocupación ensayada aquí como la proteína S1 o como su RBD solamente: IC_{50}s de 1.88 □M (IC 95%: 1.47 – 2.39) y 2.42 □M (95% IC: 1,77 – 3,30), respectivamente (Figura 2) indicando potencial de actividad de amplio espectro.

Inhibición de otros IBP

Sin embargo, hay que señalar que, según nuestros ensayos, MeBlu parece ser un PPI promiscuo.inhibidor con baja actividad micromolar. Inhibió varios IBP que exploramos; de hecho, tuvo una actividad ligeramente mejor (IC_{50} más bajo) en varios de ellos que la que tuvo para el pico de SARS-CoV-2 – iBP hACE2 . Por ejemplo, en

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

comparación con los IBP 3,03 y 2,42 μM para inhibir los IBP RBD y delta RBD – hACE2, respectivamente, obtuvimos IC_{50}s de 1,93 μM (IC del 95%: 1,35 – 2,78) para HCoV-NL63 S1 – hACE2, un IBP importante para la fijación y entrada de este otro coronavirus humano (HCoV- NL63) que utiliza ACE2 como su receptor, y 0,80 μM (IC del 95%: 0,61 – 1,07) para el VHC E – CD81, un IBP utilizado por el virus de la hepatitis C (Figura 3). Además, MeBlu también inhibió los IBP de la superfamilia TNF (TNFSF) como TNF-R1−TNFα y CD40–CD154 como se mencionó anteriormente [23], y el IL-2 – IL-2Rα IBP ensayado aquí (IC_{50} 0,37 μM; IC del 95%: 0,27 – 0,50), que seleccionamos por tener una interfaz compleja [32] y, por lo tanto, menos probabilidades de ser susceptibles a la inhibición por un pequeño molécula.

Inhibición de la **entrada del pseudovirus SARS-CoV-2**

Es importante destacar que, a pesar de esta actividad inhibidora inespecífica del IBP, MeBlu también inhibió la entrada de dos pseudovirus diferentes que llevan la proteína espiga S del SARS-CoV-2 en células que expresan ACE2. Dicho ensayo de pseudovirus permite cuantificar la entrada viral utilizando la contención de nivel 1 de bioseguridad porque no se replican en células humanas. En primer lugar, se ha realizado con un baculovirus portador de proteínas S de espiga del SARS-CoV2 y se ha generado utilizando herramientas basadas en BacMam. Como este pseudovirus también expresa proteína fluorescente verde brillante, la entrada está indicada por la expresión de fluorescencia verde en el núcleo de las células huésped (que expresan ACE2- y un reportero de fluorescencia roja). Si la entrada está bloqueada, el núcleo celular permanece oscuro. MeBlu mostró una clara actividad inhibitoria dependiente de la concentración con IC_{50}s de 3,6 μM (IC 95%: 2,4 – 5,4 μM) para la cepa original y 4,7 μM (IC del 95%: 3,4 – 6,3) para la variante delta (B.1.617.2) (Figura 4A y B). Aquí, también se incluye un conjunto de imágenes representativas de experimentos de dilución en serie para ilustración.
(Figura 4C y D). La evaluación de la citotoxicidad realizada en condiciones similares dio CT_{50}s de 57,9 μM (IC del 95%: 44,9 – 72,2), lo que indica una clara separación entre la actividad del inhibidor y la toxicidad (Figura 5); sin embargo, MeBlu tenía un índice terapéutico (TI) relativamente estrecho de poco más alto que 10 (es decir, un indicador cuantitativo de la seguridad relativa). destacando la separación entre concentraciones o dosis tóxicas y efectivas, por ejemplo, TI = TC_{50} / IC_{50}, que aquí en este ensayo basado en células salió a 15.9 y 12.3 para las cepas original y delta, respectivamente).

La inhibición de entrada por parte de MeBlu para la cepa original también se confirmó con un pseudovirus diferente, un pico de SARS-CoV-2 más un reportero de GFP que lleva VSV-Gα pseudovirus, es decir, virus de la estomatitis vesicular que carece de la glicoproteína de la envoltura VSV) [27]. Como se describió anteriormente [12], la fluorescencia de GFP cuantificada utilizando un sistema de imágenes en vivo (Incucyte) sirvió como medida de infección y los valores normalizados se ajustaron con curvas concentración-respuesta para obtener IC_{50} (Figura 6). El valor obtenido en este ensayo con una línea celular diferente (células Vero-E6 que sobreexpresan ACE2/Furina) IC_{50} = 2,5 μM (IC 95%: 1,9 – 3.2 μM) fue muy consistente con el del anterior confirmando el potencial antiviral de MeBlu.

Actividad antiviral del SARS-CoV-2

Finalmente, la actividad antiviral de MeBlu también se confirmó en un ensayo de reducción de ARN viral en Vero Células E6 infectadas con SARS-CoV-2 (B.1.5) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 como se describió anteriormente [28, 29]. En este ensayo con virus vivos, MeBlu fue eficaz para bloquear la replicación del SARS-CoV-2 en células Vero E6 con un CI_{50} de 1,70 μM (IC del 95%: 1.44 – 1.98) (Figura 7).

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados resumidos anteriormente indican que MeBlu inhibe la interacción del SARS-CoV-2 proteína espiga con hACE2, incluso para la variante delta de preocupación (B.1.617.2), y reforzar el potencial de MeBlu, un compuesto colorante incluido en la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS [19–22] como tratamiento antiviral preventivo o terapéutico de bajo costo para la COVID-19. MeBlu, que fue sintetizado por primera vez en BASF (Badische Anilin und Soda Fabrik) por Heinrich Caro en 1876 [21], fue, de hecho, el primero completamente medicina sintética, ya que se utilizó para el tratamiento de la malaria desde 1891 (hasta que fue reemplazada por cloroquina durante la 2ª Guerra Mundial) [20]. MeBlu está aprobado por la FDA para uso clínico en los EE.UU. para el tratamiento de la metahemoglobinemia, y también se utiliza para algunos otros aplicaciones (por ejemplo, prevención de infecciones del tracto urinario en pacientes de edad avanzada, tratamiento de la neurotoxicidad inducida por ifosfamida en pacientes con cáncer, tratamiento del síndrome vasopléjico durante los procedimientos coronarios, así como la visualización intraoperatoria de los nervios, los tejidos nerviosos y las glándulas endocrinas) [20, 22]. En presencia de luz, MeBlu tiene actividad virucida de amplio espectro, y se ha utilizado así desde 1991 para inactivar virus en productos sanguíneos antes de las transfusiones [33]. El plasma convaleciente tratado con MeBlu también se ha explorado como tratamiento para pacientes con COVID-19, por ejemplo, [34]. Además de nuestros resultados, otros también han encontrado evidencia de una posible actividad antiviral y, en particular, anti-SARS-CoV-2 para MeBlu, incluso en ausencia de de la activación inducida por UV, como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los estudios revisados por pares publicados que muestran la actividad anti-SARS-CoV-2 para MeBlu.

Ensayo	**Línea celular**	**IC_{50} (□M)**	**Comentario**	**Referencia**
Inhibición del **IBP (SARS-CoV-2-S – hACE2)**	N/A	1–5	Incluyendo VoCs (por ejemplo, delta)	[23] y este trabajo (VoC)
Entrada de células del pseudovirus SARS-CoV-2	HEK293T	3–5	Incluyendo VoCs (por ejemplo, delta)	[23] y este trabajo (VoC)
Actividad antiviral del SARS-CoV-2	Vero E6	1.7	Inhibición del SARS-CoV-2 (B.1.5) replicación	Este trabajo
Unión al SARS-CoV-2 S RBD	N/A	0.36	Interferometría de biocapa	[35]
Actividad antiviral del SARS-CoV-2	Vero E6	~0.3	También activo contra virus de la influenza H1N1	[36]

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

Actividad antiviral del SARS-CoV-2	Vero E6	0,4 – 1,1	cepas de SARSCoV-2 clínicamente aisladas (IHUMI-3 e IHUMI-6)	[37, 38]
Citopicidad del SARS-CoV-2	Caco-2	2.03	Golpe de HTS, confirmado en respuesta de concentración (Supp Info en la preimpresión de Res Square)	[39]
VSV-SARS-CoV-2-Sdel18 entrada de pseudovirus	Vero E6	9	Golpe de HTS, confirmado en respuesta de concentración	[40]
Multiciclo basado en imágenes **ensayo de** replicación **(hCoV-229E)**	Eh7	1.4	Golpe de HTS, confirmado en respuesta de concentración	[41]

Por ejemplo, Cagno, Tapparel y sus colegas de la Universidad de Ginebra (Ginebra, Suiza) encontraron que MeBlu mostró actividad virucida preventiva o terapéutica contra el SARS-CoV. -2 (así como el virus de la influenza H1N1) a bajas concentraciones micromolares y en ausencia de activación UV [36]. Sus resultados también sugirieron que la actividad antiviral de MeBlu podría ser el resultado de múltiples mecanismos de acción, ya que el grado de degradación del ARN genómico era mayor en presencia de luz y después de laexposición. Gendrot, Pradines y sus compañeros de trabajo en el Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Marsella, Francia) encontraron que el MeBlu no fotoactivado inhibe el SARS-CoV. 2 replicación en Vero E6 *in vitro* con un IC_{50} de 0,3 ± 0,03 □M [37] y luego confirmada posteriormente con dos clínicamente aislados cepas de SARS-CoV-2 (IHUMI-3 e IHUMI-6; IC_{50}s de 0,4 y 1,1 □M, respectivamente) [38]. En línea con las observaciones de Cagno y sus compañeros de trabajo, este estudio realizado por Gendrot y sus compañeros de trabajo en células Vero E6 también sugirió que MeBlu interactúa. tanto en la fase de entrada como después de la entrada de la infección por SARS-CoV-2 [38]. MeBlu también fue identificado en varias reutilizaciones de drogas
(reposicionamiento) ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS) en busca de actividad anti-SARS-CoV-2, y luego se confirmó que tenían baja actividad micromolar en concentración-respuesta estudios. Por ejemplo, H. L. Xiong y sus colegas de la Universidad de Xiamen (Xiamen, China) encontraron que MeBlu tenía un IC_{50} de 9 □M en un ensayo de pseudovirus VSV-SARSCoV-2-Sdel18 cuando se probó como uno de los 12 compuestos seleccionados de actividad prometedora identificados a partir de la detección de 1403 medicamentos aprobados por la FDA [40]. Finalmente, un ensayo de replicación multiciclo basado en imágenes basado en la reutilización de una biblioteca química de 5440 compuestos que están aprobados, en clínica Ensayo, o en desarrollo preclínico por Murer, Greber y colaboradores de la Universidad de Zurich (Zurich, Suiza) identificaron MeBlu como uno de dos candidatos prometedores (el otro es el ácido micofenólico) que tienen baja actividad micromolar contra el SARS-CoV-2 (1,4 □M). Si bien Cagno et al informaron un buen índice terapéutico para MeBlu en el ensayo basado en células Vero E6

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

(TI = 46.1 / 0.11 = 420) [36], este estudio por Murer et al con células Huh7 encontraron que era aún más bajo (TI = 8.7/1.4 = 6.2) [41] que el obtenido aquí con células HEK293T (TI = 12–16).

En cuanto a la aplicabilidad clínica correspondiente de MeBlu, es importante que la concentración los niveles que parecen proporcionar actividad antiviral para MeBlu (por ejemplo, IC_{50} = 0.5 – 5.0 ?M) están dentro del rango de los obtenidos después de la dosis clínica normal (~3 mg/kg) incluso con administración oral. Por ejemplo, se midieron 19 ?M de concentración máxima en sangre después de 500 mg p.o. [42], y se obtuvieron niveles mínimos de 6–7 ?M después de una dosis de 207 mg/día (69 mg, t.i.d., p.o.) [43]. La biodisponibilidad oral (F ≈ 80%) y la vida media de eliminación terminal de MeBlu ($t_{1/2}$ ≈ 14 h) [42] se encuentran en rangos muy razonables por una vez. administración oral diaria. Si bien MeBlu es generalmente seguro, se sabe que causa toxicidad dependiente de la dosis, en línea con el índice terapéutico relativamente estrecho de MeBlu visto aquí (TI ≈ 10–15; Figura 5). Por ejemplo, náuseas, vómitos, hemólisis y otros efectos secundarios no deseados comienzan a ocurrir a dosis >7 mg/kg (es decir, >500 mg) [19, 21, 22]. MeBlu está contraindicado en personas que toman inhibidores de la recaptación de serotonina o que tienen deficiencia hereditaria de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (deficiencia de G6PD).

En esta línea, hay que mencionar que si bien MeBlu actúa claramente como un inhibidor del IBP SARSCoV-2 S – hACE2 (Figura 1, Figura 2), también parece ser un inhibidor promiscuo del IBP, que limita claramente su especificidad y, por lo tanto, su utilidad. Por ejemplo, también inhibió los IBP TNFSF (por ejemplo, CD40–CD40L, TNF-R1–TNF?) [23], así como los IBP IL-2R–IL-2 en nuestros ensayos con una potencia micromolar baja similar (Figura 3). El marco de fenotiazina de tres anillos de MeBlu se asemeja al marco de tres anillos de la eritrosina B, un colorante alimentario aprobado por la FDA que hemos demostrado antes que actúa como inhibidor promiscuo del IBP (junto con algunos otros colorantes de xanteno estructuralmente similares como la rosa de Bengala y la floxina) [44]. Además, MeBlu es bien conocido por mostrar polifarmacología y actuar sobre una multitud de objetivos [20]. Si bien estos limitan aún más la especificidad y pueden causar efectos no deseados, al menos algunos de estos efectos podrían ser beneficiosos en el tratamiento de COVID-19 [45, 46]. Por ejemplo, su principal mecanismo de acción detrás de su uso clínico es su capacidad para reducir la forma oxidada de la hemoglobina cuando se encuentra en un estado de metahemoglobinemia y aumentar la capacidad de unión al oxígeno de la hemoglobina, lo que aumenta el suministro de oxígeno a los tejidos [22]. Esto podría ser un beneficio adicional importante en pacientes con COVID-19 que a menudo exhiben niveles muy bajos de oxígeno, es decir, silenciosos (o felices) hipoxemia [47].

Hay algunas pruebas clínicas , aunque limitadas, que respaldan el uso de MeBlu para prevenir o tratar COVID-19, y la mayoría de ellas deben tratarse con precaución como lo fue. publicado no en revistas médicas revisadas por pares reconocidas internacionalmente. El primer apoyo para un posible papel preventivo provino de un estudio retrospectivo de 2500 pacientes tratados con MeBlu (75 mg t.i.d.) como parte de su atención del cáncer en Francia. Esto encontró que ninguno de ellos desarrolló una enfermedad similar a la influenza durante las primeras fases de la pandemia de COVID19 (marzo de 2020) [48]. Actualmente , hay tres ensayos documentados como iniciados con MeBlu para el tratamiento de COVID-19 (según ClinicalTrial.gov): uno en México (NCT04619290; 1 mL prexablu y 50 min de terapia de luz de bajo nivel s.i.d. durante 7 días), uno en Suiza (NCT04635605; MeBlu 100 mg b.i.d. durante 5 días), y uno en Irán (NCT04370288; MeBlu 1 mg/kg como parte de un cóctel adicional de tres fármacos de última opción terapéutica con vitamina C 1500 mg/kg y N-acetil cisteína 2000 mg/kg en pacientes críticos con COVID-19). El último completó los estudios de Fase 2 y 3 con resultados prometedores afirmados. En la Fase 1, cuatro de los cinco pacientes tratados respondieron bien al tratamiento [49]. La extensión de la fase 2 fue un ensayo clínico aleatorizado, controlado y abierto en elque participaron 80 pacientes hospitalizados con COVID-

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

19 grave. Indicó que la adición de MeBlu al protocolo de tratamiento mejoró significativamente la saturación de oxígeno (SpO_2) y la dificultad respiratoria ($p < 0,001$), lo que resultó en una disminución de la estancia hospitalaria. (7.3±4.7 vs. 11,7±6,6 días, $p = 0,004$) y mortalidad (12,5% vs. 22,5%) [50]. Se completó un ensayo clínico aleatorizado, controlado y de etiqueta abierta de fase 3 en 223 pacientes hospitalizados con casos graves confirmados de COVID-19. Esto también encontró que la adición de MeBlu oral a la atención estándar acortó significativamente la estancia hospitalaria (6.2±3.1 vs 10.6±9.2, $p < 0.001$) y disminuyó la mortalidad. (12,2% vs 21,4%, $p = 0,07$) [51].

Se ha explorado meBlu intravenoso (1 mg/kg) como terapia de rescate en 50 pacientes con COVID-19 hipóxico moderado a grave con síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) con prometedores resultados y ningún efecto secundario importante o eventos adversos [52]. Finalmente, las aplicaciones inhaladas también se han explorado en algunos países en desarrollo como tratamientos respiratorios [53]. Dos estudios con MeBlu nebulizado realizados en pacientes con infecciones por COVID-19 en la India afirmaron beneficios notables: disminución de los marcadores inflamatorios y los requisitos de oxígeno y una tendencia hacia la reducción de las estancias hospitalarias (9,17 vs 12 días) en un estudio observacional con 63 pacientes divididos en tres grupos [54] y efectos beneficiosos sobre saturación y requerimientos de oxígeno en 7 pacientes con COVID-19 y SDRA graves que no respondieron al antiviral (remedesivir, favipiravir) y tratamientos antiinflamatorios (tocilizumab, esteroides, heparina) e inhalación de oxígeno, pero posteriormente respondieron a la inhalación de MeBlu [55].

CONCLUSIÓN

En conclusión, encontramos que MeBlu es un inhibidor micromolar bajo del IBP entre el pico del SARS-CoV-2 y su receptor cognado ACE2, incluso para mutantes como como la variante delta de preocupación. MeBlu también inhibió la entrada celular de pseudovirus portadores de espigas tanto para la cepa original como para la variante delta, y bloqueó el SARS-CoV-2 (B.1.5.) replicación del virus en células Vero E6. Por lo tanto, MeBlu, un medicamento aprobado para uso clínico, muestra potencial como un agente antiviral reutilizado (reposicionado) para la prevención y el tratamiento de COVID- 19. Si bien MeBlu muestra una polifarmacología fuerte, parece ser un inhibidor inespecífico del IBP y tiene un índice terapéutico relativamente estrecho, todavía tiene potencial como tratamiento económico, ampliamente disponible y administrable por vía oral para las enfermedades causadas por el SARS-CoV-2, sus variantes de preocupación, y posiblemente otros CoV de presión de pico-ex.

ABREVIATURAS

Las siguientes abreviaturas se utilizan en este manuscrito:

ACE2, enzima convertidora de angiotensina 2

CoV, coronavirus

MeBlu, azul de metileno

NBlBk, negro naftólico azul

PPI, interacción proteína-proteína

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

SARS, síndrome respiratorio agudo severo

SMI, inhibidor de moléculas pequeñas

SPR, resonancia de plasmón de superficie

SY, amarillo atardecer FCF

TNF: factor de necrosis tumoral

VoC, variante de preocupación.

AGRADECIMIENTOS

Estamos agradecidos con el Dr. György Miklós Keserű por su ayuda facilitando la colaboración con el Grupo del Laboratorio Nacional de Virología de la Universidad de Pécs, Hungría.

MATERIALES COMPLEMENTARIOS

El material complementario para este artículo está disponible al final de este archivo e incluye la Figura S1, Unión de MeBlu al pico RBD del SARS-CoV-2 según lo evaluado a través de SPR .

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

STC realizó los ensayos de unión y pseudovirus BacMam y analizó los datos correspondientes; HP realizó los ensayos de virus vivos y analizó los datos correspondientes; AK realizó el ensayo ddPCR; RE realizó los ensayos de SPR, analizó los datos correspondientes y contribuyó con materiales; JMCC realizó los ensayos de pseudovirus VSV; LAS proporcionó materiales y analizó los datos; FJ proporcionó materiales y supervisó los experimentos anti-SARS-CoV-2; PB concibió y diseñó el proyecto, proporcionó orientación de estudio, analizó los datos y escribió el borrador del manuscrito. Todos los autores contribuyeron a escribir, han leído y han aceptado la versión publicada del manuscrito.

FINANCIACIÓN

El apoyo financiero de la Fundación del Instituto de Investigación de la Diabetes (www.diabetesresearch.org) es agradecido (PB). El ensayo antiviral anti-SARS-CoV-2 fue financiado por la Comisión Temática
Programa de Excelencia 2021 Salud y Defensa Nacional, Subprogramas de Seguridad Nacional del Ministerio de Seguridad Nacional

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

Innovación y Tecnología en Hungría en el marco de los proyectos EGA-10 y NVA-07 de la Universidad de Pécs y el Desarrollo Integral para la Implementación inteligente Estrategias de especialización en la Universidad de Pécs (EFOP-3.6.1. -16-2016-00004) subvenciones. Dr. Shehadeh es financiado por subvenciones de la Instituto Nacional de Salud (1R01HL140468) y el Miami Heart Research Institute.

DECLARACIÓN DE LA JUNTA DE REVISIÓN INSTITUCIONAL

No procede.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

No procede.

DECLARACIÓN DE DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos en bruto que respaldan las conclusiones de este manuscrito serán puestos a disposición por los autores a petición razonable de investigadores calificados.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

[1] Liu, P. P.; Blet, A.; Smyth, D.; Li, H. La ciencia subyacente a COVID-19: implicaciones para el sistema cardiovascular. *Circulación* **2020**, *142*, 68-78; https://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.

[2] Moore, J. B.; Junio, C. H. Síndrome de liberación de citoquinas en COVID-19 grave. *Ciencia* **2020**, *368*, 473474; https://dx.doi.org/10.1126/science.abb8925.

[3] Matheson, N. J.; Lehner, P. J. ¿Cómo causa el SARS-CoV-2 el COVID-19? *Ciencia* **2020**, *369*, 510-511; https://dx.doi.org/10.1126/science.abc6156.

[4] V'Kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. Biología y replicación del coronavirus: implicaciones para el SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 155-170; https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6.

[5] Tiwari, V.; Cerveza, J. C.; Sankaranarayanan, N. V.; Swanson-Mungerson, M.; Desai, Estados Unidos R. Descubriendo terapias de moléculas pequeñas contra el SARS-CoV-2. *Droga Discov. Hoy* **2020**, *25*, 1535-1544; https://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2020.06.017.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

[6] Consorcio de Ensayos solidarios de la OMS; Pan, H.; Peto, R.; Henao-Restrepo, A. M.; Preziosi, M. P.; Sathiyamoorthy, V.; Abdool Karim, Q.; Alejandria, M. M.; Hernández García, C.; Kieny, M. P.; Malekzadeh, R.; Murthy, S.; Reddy, K. S.; Rosas Periago, M.; Abi Hanna, P.; Ader, F.; Al-Bader, A. M.; Alhasawi, A.; Allum, E.; Alotaibi, A.; Álvarez-Moreno, C. A.; Appadoo, S.; Asiri, A.; Aukrust, P.; Barratt-Due, A.; Bellani, S.; Branca, M.; Cappel-Porter, H. B. C.; Cerrato, N.; Chow, T. S.; Como, N.; Eustaquio, J.; García, P. J.; 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, M. T.; Mesa Rubio, M. L.; Miranda-Montoya, M. C.; Nel, J.; Nunes, E. P.; Perola, M.; Portoles, A.; Rasmin, M. R.; Raza, A.; Rees, H.; Reges, P. P. S.; Rogers, C. A.; Salami, K.; Salvadori, M. I.; Sinani, N.; Sterne, J. Un. C.; Stevanovikj, M.; Tacconelli, E.; Tikkinen, K. Un. O.; Trelle, S.; Zaid, H.; Rottingen, J. A.; Swaminathan, S. Medicamentos antivirales reutilizados para la Covid-19 - Resultados provisionales del ensayo Solidaridad de la OMS. *N. Inglés J. Med.* **2020**, *384*, 497-511; https://doi.org/10.1056/nejmoa2023184.

[7] Tummino, T. A.; Rezelj, V. V.; Fischer, B.; Fischer, A.; O'Meara, M. J.; Monel, B.; Vallet, T.; Blanco, K. M.; Zhang, Z.; Alon, A.; Schadt, H.; O'Donnell, H. R.; Lyu, J.; Rosales, R.; McGovern, B. L.; Rathnasinghe, R.; Jangra, S.; Schotsaert, M.; Galarneau, J. R.; Krogan, N. J.; Urbano, L.; Shokat, K. M.; Kruse, A. C.; García-Sastre, A.; Schwartz, O.; Moretti, F.; Vignuzzi, M.; Pognan, F.; Shoichet, B. K. La fosfolipidosis inducida por fármacos confunde la reutilización de fármacos para el SARS-CoV-2. *Ciencia* **2021**, *373*, 541-547; https://doi.org/10.1126/science.abi4708.

[8] Jayk Bernal, A.; Gomes da Silva, M. M.; Musungaie, D. B.; Kovalchuk, E.; González, A.; Delos Reyes, V.; Martín Quirós, A.; Caraco, Y.; Williams-Díaz, A.; Marrón, M. L.; Du, J.; Pedley, A.; Assaid, C.; Strizki, J.; Grobler, J. A.; Shamsuddin, H. H.; Propinas, R.; Wan, H.; Paschke, A.; Butterton, J. R.; Johnson, M. G.; De Anda, C.; Grupo, M. O. -O. S. Molnupiravir para el tratamiento oral de covid-19 en pacientes no hospitalizados. *N. Ing. J. Med.* **2021**, *386*, 509-520; https://doi.org/10.1056/nejmoa2116044.

[9] Owen, D. R.; Allerton, C. M. N.; Anderson, A. S.; Aschenbrenner, L.; Avery, M.; Berritt, S.; Boras, B.; Cardin, R. D.; Carlo, A.; Coffman, K. J.; Dantonio, A.; Di, L.; Ing, H.; Ferre, R.; Gajiwala, K. S.; Gibson, S. A.; Greasley, S. E.; Hurst, B. L.; Kadar, E. P.; Kalgutkar, A. S.; Lee, J. C.; Lee, J.; Liu, W.; Mason, S. W.; Noell, S.; Novak, J. J.; Obach, R. S.; Ogilvie, K.; Patel, N. C.; Pettersson, M.; Rai, D. K.; Reese, M. R.; Sammons, M. F.; Sathish, J. G.; Singh, R. S. P.; Steppan, C. M.; Stewart, A. E.; Tuttle, J. B.; Updyke, L.; Verhoest, P. R.; Wei, L.; Yang, Q.; Zhu, Y. Un candidato clínico oral al inhibidor del SARS-CoV-2 M(pro) para el tratamiento de la COVID-19. *Ciencia* **2021**, *374*, 1586-1593; https://doi.org/10.1126/science.abl4784.

[10] Chen, J.; Canción, Y.; Bojadzic, D.; Tamayo-García, A.; Landin, A. M.; Blomberg, B. B.; Buchwald, P. Inhibidores de moléculas pequeñas de la interacción proteína-proteína coestimuladora CD40-CD40L. *J. Med. Química.* **2017**, *60*, 8906-8922; https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01154

[11] Bojadzic, D.; Buchwald, P. Hacia la inhibición de moléculas pequeñas de las interacciones proteína-proteína: Aspectos generales y progreso reciente en la orientación de las interacciones coestimuladoras y coinhibitorias (punto de control inmune). *Curr. Arriba. Med. Química.* **2018**, *18*, 674-699; https://doi.org/10.2174/1568026618666180531092503.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

[12] Bojadzic, D.; Alcázar, O.; Chen, J.; Chuang, S. T.; Cóndor Capcha, J. M.; Shehadeh, L. A.; Buchwald, P. Inhibidores de moléculas pequeñas del coronavirus pico – Interacción proteína-proteína ACE2 como bloqueadores de la unión viral y la entrada para el SARS-CoV-2. *ACS infectar. Dis.* **2021**, *7*, 1519-1534; https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00070.

[13] Souers, A. J.; Leverson, J. D.; Boghaert, E. R.; Ackler, S. L.; Catron, N. D.; Chen, J.; Dayton, B. D.; Ding, H.; Enschede, S. H.; Fairbrother, W. J.; Huang, D. C.; Hymowitz, S. G.; Jin, S.; Khaw, S. L.; Kovar, P. J.; Lam, L. T.; Lee, J.; Maecker, H. L.; Pantano, K. C.; Mason, K. D.; Mitón, M. J.; Nimmer, P. M.; Oleksijew, A.; Parque, C. H.; Parque, C. M.; Phillips, D. C.; Roberts, A. W.; Sampath, D.; Seymour, J.

F.; Smith, M. L.; Sullivan, G. M.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wendt, M. D.; Xiao, Y.; Xue, J. C.; Zhang, H.; Humerickhouse, R. A.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. ABT-199, un inhibidor potente y selectivo de BCL-2, logra la actividad antitumoral mientras ahorra plaquetas. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 202-208; https://doi.org/10.1038/nm.3048.

[14] Gadek, T. R.; Burdick, D. J.; McDowell, R. S.; Stanley, M. S.; Marsters, J. C., Jr.; París, K. J.; Oare, D. A.; Reynolds, M. E.; Ladner, C.; Zioncheck, K. A.; Lee, W. P.; Gribling, P.; Dennis, M. S.; Skelton, N. J.; Tumas, D. B.; Clark, K. R.; Keating, S. M.; Beresini, M. H.; Tilley, J. W.; Presta, L. G.; Bodary, S. C. Generación de un antagonista de LFA-1 por la transferencia del epítopo inmunorregulador ICAM-1 a una molécula pequeña. *Ciencia* **2002**, *295*, 1086-1089; https://doi.org/10.1126/science.295.5557.1086.

[15] Meanwell, N. A.; Krystal, M. R.; Nowicka-Sans, B.; Langley, D. R.; Conlon, D. A.; Eastgate, M. D.; Grasela, D. M.; Timmins, P.; Wang, T.; Kadow, J. F. Inhibidores de la unión al VIH-1: el descubrimiento y desarrollo de temsavir y su profármaco fostemsavir. *J. Med. Química.* **2018**, *61*, 62-80; http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01337.

[16] Arkin, M. R.; Wells, J. Un. Inhibidores de moléculas pequeñas de las interacciones proteína-proteína: progresando hacia el sueño. *Nat. Rev. Droga Discov.* **2004**, *3*, 301-317; https://doi.org/10.1038/nrd1343.

[17] Milroy, L. G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. Moduladores de las interacciones proteicas. *Química. Rev.* **2014**, *114*, 4695-4748; https://doi.org/10.1021/cr400698c.

[18] Scott, D. E.; Bayly, A. R.; Abell, C.; Skidmore, J. Moléculas pequeñas, grandes objetivos: el descubrimiento de fármacos se enfrenta al desafío de la interacción proteína-proteína. *Nat. Rev. Droga Discov.* **2016**, *15*, 533-550; https://doi.org/10.1038/nrd.2016.29.

[19] Clifton, J., 2º; Leikin, J. B. Azul de metileno. *AM. J. Ther.* **2003**, *10*, 289-291; https://doi.org/10.1097/00045391-200307000-00009.

[20] Schirmer, R. H.; Adler, H.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E. "Para que no te olvidemos--azul de metileno..." *Neurobiol. Envejecimiento* **2011**, *32*, 2325 e7-16; https://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.

[21] Oz, M.; Lorke, D. E.; Hasan, M.; Petroianu, G. Un. Acciones celulares y moleculares del azul de metileno en el sistema nervioso. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 93-117; https://doi.org/10.1002/med.20177.

[22] Bistas, E.; Sanghavi, D. Azul de metileno en *StatPearls*: Treasure Island; FL, Estados Unidos, **2020**.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

[23] Bojadzic, D.; Alcázar, O.; Buchwald, P. El azul de metileno inhibe el pico del SARS-CoV-2 – interacción proteína-proteína ACE2 – un mecanismo que puede contribuir a su actividad antiviral contra el COVID- 19. *Frente. Farmacol.* **2021**, *11*, 600372; https://doi.org/10.3389/fphar.2020.600372.

[24] Zhang, L.; Jackson, C. B.; Mou, H.; Ojha, A.; Peng, H.; Quinlan, B. D.; Rangarajan, E. S.; Pan, A.; Vanderheiden, A.; Suthar, M. S.; Li, W.; Izard, T.; Rader, C.; Farzán, M.; Choe, H. La mutación de la proteína espiga D614G del SARS-CoV-2 aumenta la densidad de picos de virión y la infectividad. *Nat. Comunidad.* **2020**, *11*, 6013; https://dx.doi.org/10.1038%2Fs41467-020-19808-4.

[25] CDC, Center for Disease Control and Prevention *SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions,* **2021**, https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variantclassifications.html, Consultado en febrero. 14, 2022.

[26] Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 años de análisis de imágenes. *Nat. Métodos* **2012**, *9*, 671-675; https://doi.org/10.1038/nmeth.2089.

[27] Cóndor Capcha, J. M.; Lambert, G.; Dykxhoorn, D. M.; Salerno, A. G.; Liebre, J. M.; Whitt, M. A.; Pahwa, S.; Jayaweera, D. T.; Shehadeh, L. Un. Generación de virus pseudotipados de pico sars-CoV-2 para ensayos de entrada y neutralización viral: un protocolo de 1 semana. *Frente. Cardiovasc. Med.* **2020**, *7*, 618651; https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.618651.

[28] Bajusz, D.; Wade, W. S.; Satala, G.; Bojarski, A. J.; Ilas, J.; Ebner, J.; Grebien, F.; Papp, H.; Jakab, F.; Douangamath, A.; Fearon, D.; von Delft, F.; Schuller, M.; Ahel, I.; Wakefield, A.; Vajda, S.; Gerencsér, J.; Pallai, P.; Keserű, G. M. Exploración de puntos calientes de proteínas mediante farmacóforos de fragmentos optimizados. *Nat. Comunidad.* **2021**, *12*, 3201; https://doi.org/10.1038/s41467-021-23443-y.

[29] Bereczki, I.; Papp, H.; Kuczmog, A.; Madai, M.; Nagy, V.; Agocs, A.; Batta, G.; Milankovits, M.; Ostorhazi, E.; Mitrovic, A.; Kos, J.; Zsigmond, A.; Hajdu, I.; Lorincz, Z.; Bajusz, D.; Keseru, G. M.; Hodek, J.; Weber, J.; Jakab, F.; Herczegh, P.; Borbas, A. Los apocarotenoides naturales y sus conjugados glicopéptidos sintéticos inhiben la replicación del SARS-CoV-2. *Productos farmacéuticos* **2021**, *14*; https://doi.org/10.3390/ph14111111.

[30] Buchwald, P. Un único modelo unificado para ajustar datos de respuesta de receptores simples a complejos. *Ciencia. Representante.* **2020**, *10*, 13386; https://doi.org/10.1038/s41598-020-70220-w.

[31] Kupferschmidt, K. Amenaza en evolución . *Ciencia* **2021**, *373*, 844-849; https://doi.org/10.1126/science.373.6557.844.

[32] Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. Un. Inhibidores de moléculas pequeñas de las interacciones proteína-proteína:
Avanzando hacia la realidad. *Química. Biol.* **2014**, *21*, 1102-1114; https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.001.

[33] Lozano, M.; Cid, J.; Muller, T. H. Plasma tratado con azul de metileno y luz: eficacia clínica y perfil de seguridad. *Transfus. Med. Rev.* **2013**, *27*, 235-240;
https://dx.doi.org/10.1016/j.tmrv.2013.08.001.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

[34] Alemany, A.; Millat-Martínez, P.; Corbacho-Monne, M.; Malchair, P.; Ouchi, D.; Ruiz-Comellas, A.; Ramírez-Morros, A.; Rodríguez Codina, J.; Amado Simón, R.; Videla, S.; Costes, G.; CapdevilaJauregui, M.; Torrano-Soler, P.; San José, A.; Bonet Papell, G.; Puig, J.; Otero, A.; Ruibal Suárez, J. C.; Zarauza Pellejero, A.; Llopis Roca, F.; Rodríguez Cortez, O.; García García, V.; Vidal-Alaball, J.; Millán, A.; Contreras, E.; Grifols, J. R.; Ancochea, A.; Galván-Femenia, I.; Piccolo Ferreira, F.; Bonet, M.; Cantoni, J.; Prat, N.; Ara, J.; Forcada Arcarons, A.; Farre, M.; Pradenas, E.; Blanco, J.; Ángel Rodríguez-Arias, M.; Fernández Rivas, G.; Marcos, M.; Bassat, Q.; Blanco, I.; Baro, B.; Clotet, B.; Mitja, O.; Grupo, C. -E. Plasma convaleciente tratado con azul de metileno de alto título como tratamiento temprano para pacientes ambulatorios con COVID-19: un placebo aleatorizado- ensayo controlado. *Lancet Respir. Med.* **2022**, *10*, 278-288; https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00545-2.

[35] Coghi, P.; Yang, L. J.; Ng, J. P. L.; Haynes, R. K.; Memo, M.; Gianoncelli, A.; Wong, V. K. W.; Ribaudo, G. Un enfoque de reutilización de fármacos para los antipalúdicos que interfieren con el dominio de unión al receptor de proteína espiga (RBD) del SARS-CoV-2 y la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2).
Productos farmacéuticos **2021**, *14*, 954; https://doi.org/10.3390/ph14100954.

[36] Cagno, V.; Medaglia, C.; Cerny, A.; Cerny, T.; Zwygart, A. C.; Cerny, E.; Tapparel, C. El azul de metileno tiene una potente actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 y el virus de la gripe H1N1 en ausencia de UVactivación *in vitro*. *Ciencia. Representante.* **2021**, *11*, 14295; https://doi.org/10.1038/s41598-021-92481-9.

[37] Gendrot, M.; Andreani, J.; Duflot, I.; Boxberger, M.; Bideau, M. L.; Mosnier, J.; Jardot, P.; Fonta, I.; Rolland, C.; Bogreau, H.; Hutter, S.; La Scola, B.; Pradines, B. El azul de metileno inhibe la replicación del SARS-CoV-2 *in vitro*. *Int. J. Antimicrob. Agentes* **2020**, *56*, 106202; https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106202.

[38] Gendrot, M.; Jardot, P.; Delandre, O.; Boxberger, M.; Andreani, J.; Duflot, I.; Le Bideau, M.; Mosnier, J.; Fonta, I.; Hutter, S.; La Scola, B.; Pradines, B. Evaluación in vitro de la actividad antiviral del azul de metileno solo o en combinación contra el SARS-CoV-2. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3007; https://doi.org/10.3390/jcm10143007.

[39] Ellinger, B.; Bojkova, D.; Zaliani, A.; Cinatl, J.; Claussen, C.; Westhaus, S.; Keminer, O.; Reinshagen, J.; Kuzikov, M.; Lobo, M.; Geisslinger, G.; Gribbon, P.; Ciesek, S. Un conjunto de datos de citopicidad del SARS-CoV-2 generado por el cribado de alto contenido de una gran colección de reutilización de fármacos. *Ciencia. Datos* **2021**, *8*, 70; https://doi.org/10.1038/s41597-021-00848-4.

[40] Xiong, H. L.; Cao, J. L.; Shen, C. G.; Ma, J.; Qiao, X. Y.; Shi, T. S.; Ge, S. X.; Sí, H. M.; Zhang, J.; Yuan, Q.; Zhang, T. Y.; Xia, N. S. Varios medicamentos aprobados por la FDA inhiben eficazmente la infección por SARS-CoV-2 *in vitro*. *Frente. Farmacol.* **2021**, *11*, 609592; https://doi.org/10.3389/fphar.2020.609592.

[41] Murer, L.; Volle, R.; Andriasyan, V.; Petkidis, A.; Gómez-González, A.; Yang, L.; Meili, N.; Suomalainen, M.; Bauer, M.; Sequeira, D.; Olszewski, D.; Georgi, F.; Kuttler, F.; Turcatti, G.; Greber, U. F. Identificación de agentes químicos anti-coronavirus amplios para la reutilización contra el SARS-CoV-2 y variantes de preocupación. *Curr. Res. Vir. Ciencia.* **2022**, *3*, 100019; https://doi.org/10.1016/j.crviro.2022.100019.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

[42] Walter-Sack, I.; Rengelshausen, J.; Oberwittler, H.; Burhenne, J.; Mueller, O.; Meissner, P.; Mikus, G. Alta biodisponibilidad absoluta del azul de metileno administrado como formulación oral acuosa. *Eur. J. Clin. Farmacol.* **2009**, *65*, 179-189; https://dx.doi.org/10.1007/s00228-008-0563-x.

[43] Baddeley, T. C.; McCaffrey, J.; Storey, J. M.; Cheung, J. K.; Melis, V.; Horsley, D.; Harrington, C. R.; Wischik, C. M. La disposición compleja de las formas redox de metiltioninio determina la eficacia en la terapia con inhibidores de la agregación tau para la enfermedad de Alzheimer. *J. Farmacol. Exp. Ther.* **2015**, *352*, 110118; https://doi.org/10.1124/jpet.114.219352.

[44] Ganesan, L.; Margolles-Clark, E.; Canción, Y.; Buchwald, P. El colorante alimentario eritrosina es un inhibidor promiscuo de la interacción proteína-proteína. *Bioquímica. Farmacol.* **2011**, *81*, 810-818; http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.12.020.

[45] Scigliano, G.; Scigliano, G. Un. Síndrome de dificultad respiratoria aguda por Covid-19: ¿una tormenta perfecta de radicales libres? Propuesta de un nuevo tratamiento. *Med. Hipótesis* **2020**, *144*, 110120; https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110120.

[46] Scigliano, G.; Scigliano, G. Un. Azul de metileno en COVID-19. *Med. Hipótesis* **2021**, *146*, 110455; https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110455.

[47] Tobin, M. J.; Laghi, F.; Jubran, A. Por qué la hipoxemia silenciosa COVID-19 es desconcertante para los médicos. *Am. J. Respiración. Crit. Cuidado Médico.* **2020**, *202*, 356-360; https://dx.doi.org/10.1164%2Frccm.202006-2157CP.

[48] Enrique, M.; Summa, M.; Patricio, L.; Schwartz, L. Una cohorte de pacientes con cáncer sin casos reportados de infección por SARS-CoV-2: el posible papel preventivo del azul de metileno. *Sustancia* **2020**, *4*, 888; https://dx.doi.org/10.13128/Substantia-888.

[49] Alamdari, D. H.; Moghaddam, A. B.; Amini, S.; Keramati, M. R.; Zarmehri, A. M.; Alamdari, A. H.; Damsaz, M.; Banpour, H.; Yarahmadi, A.; Koliakos, G. Aplicación de azul de metileno -vitamina C N-acetil cisteína para el tratamiento de pacientes con COVID-19 en estado crítico, informe de un ensayo clínico de fase I. *Eur. J. Farmacol.* **2020**, 173494; https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173494.

[50] Alamdari, D. H.; Lotfabadi, S. H.; Moghaddam, A. B.; Safari, H.; Mozdourian, M.; Javidarabshahi, Z.; Peivandi-Yazdi, A.; Ali-Zeraati, A.; Sedaghat, A.; Poursadegh, F.; Ahmadabadi, F. B.; Agheli-Rad, M.; Tavousi, S. M.; Vojouhi, S.; Amini, S.; Amini, M.; Hosseini, S. M.; Tavanaee-Sani, A.; Ghiabi, A.; Mahalli, S. N.; Morovatdar, N.; Rajabi, O.; Koliakos, G. Azul de metileno para el tratamiento de pacientes hospitalizados con COVID-19: un ensayo clínico aleatorizado, controlado y abierto, fase 2. *Rev. Invertir. Clin.* **2021**, *73*, 190-198; https://doi.org/10.24875/ric.21000028.

[51] Alamdari, D. H.; Lotfabadi, S. H.; Darban, B. M.; Agheli-Rad, M.; Saadatian, S.; Hashemi, S. H.; Ahmadabadi, F. B.; Morovatdar, N.; Arastoo, M.; Bhushan, B. Azul de metileno para el tratamiento de pacientes hospitalizados con COVID-19, ensayo clínico aleatorizado, controlado y abierto, fase 3. *Aristóteles Biomed.* **2021**, *3*, 12-18; https://ejournals.lib.auth.gr/ABJ/article/view/8158.

[52] Mahale, N.; Godavarthy, P.; Marreddy, S.; Gokhale, S. D.; Funde, P.; Rajhans, P. A.; Akole, P. V.; Pawar, B.; Bhurke, B.; Dalvi, P.; Marudwar, P.; Gugale, S.; Shahane, M. S.; Kshirsagar, S. N.; Jog, S. Un. El azul

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

de metileno intravenoso como terapia de rescate en el tratamiento de la hipoxia refractaria en pacientes con SDRA COVID-19: una serie de casos. *Indio J. Crit. Cuidado Médico.* **2021**, *25*, 934-938; https://doi.org/10.5005/jp-revistas-10071-23905.

[53] Golwalkar, D. Tratamiento para COVID-19 con azul de metileno . *Medio* **2020**, https://medium.com/@dr.deepak.golwalkar/treatment-para-covid-19-usando-metileno-azuld23fc5a31a4d.

[54] Patidar, V.; Sharma, A.; Bhoraskar, S.; Tripathi, A. P.; Dhaneriya, S. El papel del azul de metileno nebulizado (NMB) en el manejo de los casos de COVID-19: un estudio observacional. *Int. J. Med. Artes* **2022**, *4*, 2129-2132; https://dx.doi.org/10.21608/ijma.2022.112347.1416.

[55] Bawaskar, H. S.; Bawaskar, P. H. Papel del azul de metileno en el tratamiento de la enfermedad COVID-19 leve, moderada y grave. *J. Medicina Familiar. Remilgado. Atención* **2022**, *11*, 812-814; https://dx.doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_2071_21.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

FIGURAS

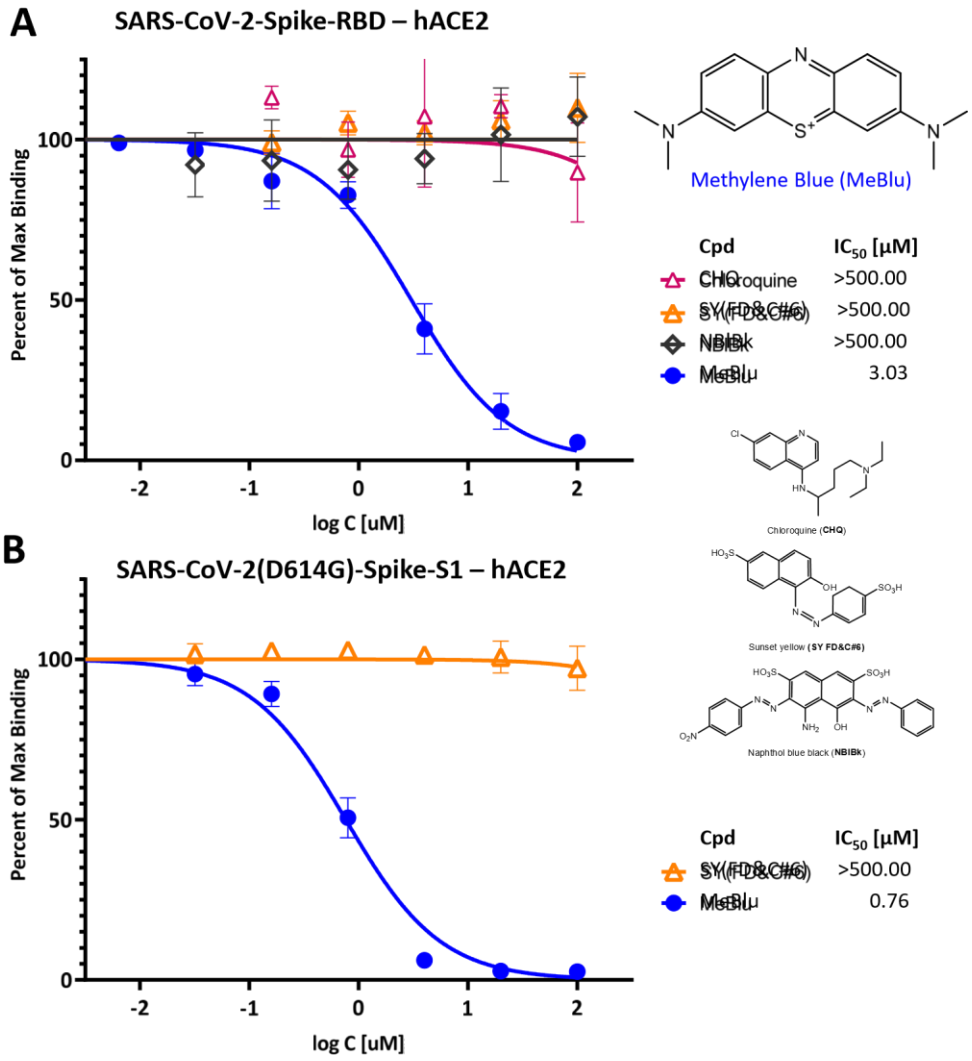
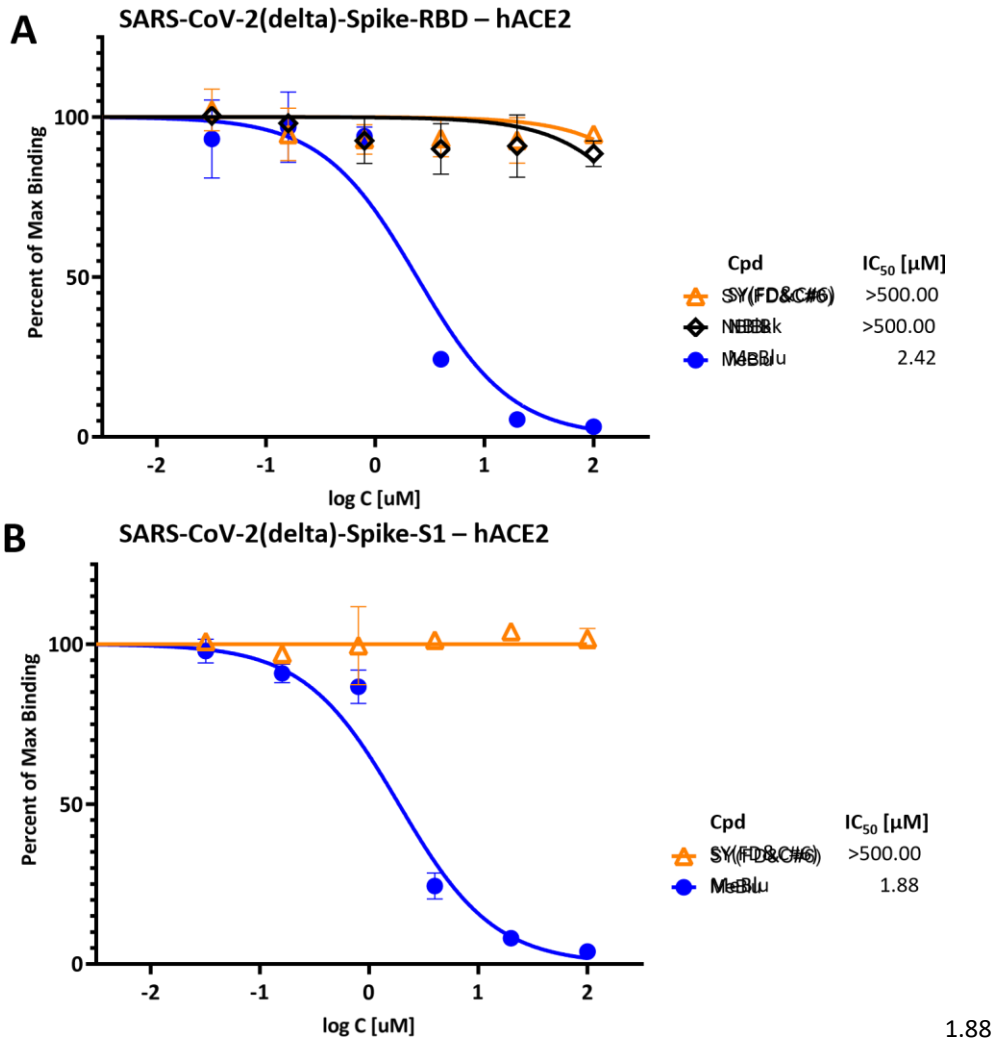


Figura 1. **Inhibición dependiente de la concentración de la proteína espiga del SARS-CoV-2** que **se une a la ACE2 humana por el azul de metileno** (**MeBlu)**. Curvas concentración-respuesta obtenidas en el ensayo tipo ELISA que muestran la inhibición de la unión del pico RBD del SARS-CoV-2 (His-tagged) (**A**) y D614G mutante S1 (**B**) a hACE2 en presencia de concentraciones crecientes de compuestos de prueba. Contrariamente a MeBlu, ni la cloroquina (CHQ) ni otros dos colorantes incluidos como control (amarillo atardecer FCF, SY, y negro azul naftol, NBlBk) mostraron actividad inhibitoria (estructuras químicas mostradas a la derecha). Los datos (media ± de des) se normalizaron y se ajustaron con curvas de inhibición estándar; se muestran los valores ic_{50} obtenidos.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.



1.88

Figura 2. **Inhibición dependiente de la concentración de** la **unión** del **SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) Spike RBD (A) y la proteína S1 (B) a hACE2 por MeBlu**. Curvas concentración-respuesta obtenidas en una configuración similar a la de la Figura 1 pero con la proteína espiga RBD (**A**) y S1 (**B**) del delta (B.1.617.2) variante en presencia de concentraciones crecientes de compuestos de ensayo. Los datos (media ± de des) se normalizaron y se ajustaron con curvas de inhibición estándar; Los valores de IC_{50} obtenidos se muestran a la derecha para cada figura.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

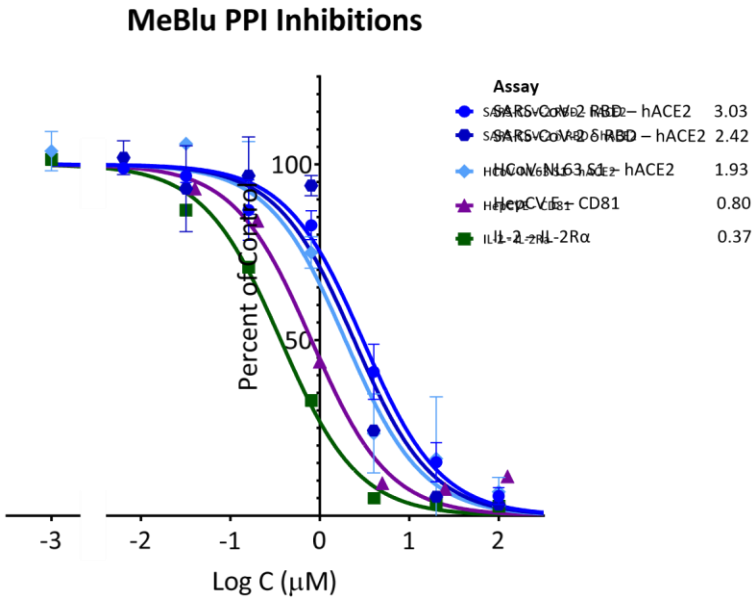


Figure 3. Promiscuous PPI inhibitory activity of MeBlu. Methylene blue inhibited several protein-protein **IC_{50} [μM]**

interacciones como se ensayan aquí de manera dependiente de la concentración siguiendo la ley típica de la respuesta de acción de masas (es decir, unidad pendiente de Hill, $n_H = 1$). Además de las interacciones de la proteína espiga del coronavirus con ACE2 humana, incluido el SAR S-CoV-2, su variante delta de preocupación, y el frío que causa el HCoV- NL63, también inhibió los IBP de la glicoproteína E de la envoltura del virus de la hepatitis C con CD81 así como otros como IL-2 – IL-2R con similares potencia. Los datos (media ± DE) para cada ensayo según lo indicado se normalizaron y se ajustaron con curvas de inhibición estándar; Los valores de IC_{50} obtenidos se muestran a la derecha.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

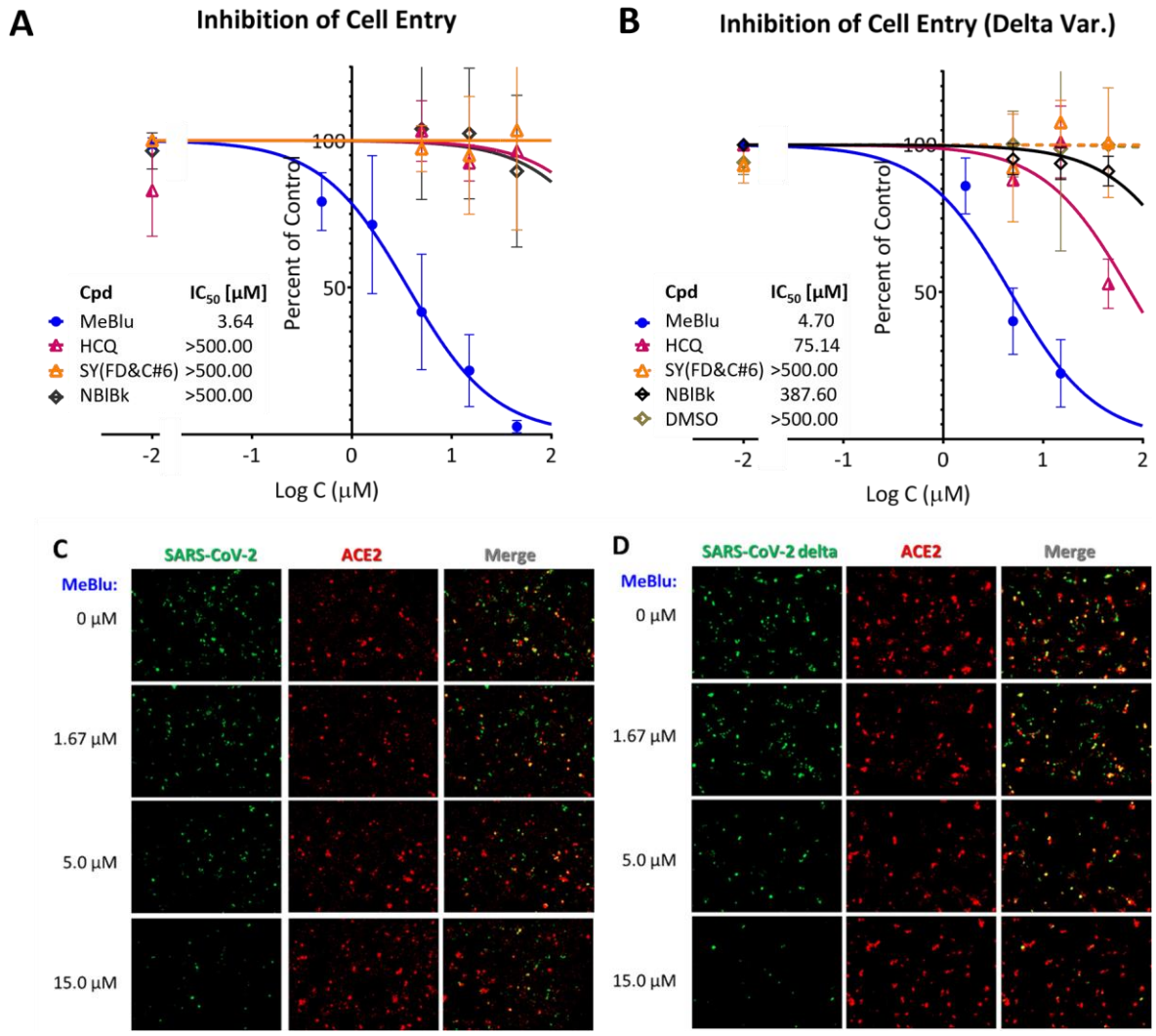


Figura 4. Inhibición dependiente de la **concentración de la entrada de pseudovirus del SARS-CoV-2 (BacMam) en células que expresan ACE2 por MeBlu.** Cuantificación de la entrada de pseudovirus portadores de la variante (B) original (**A**) o delta (B.1.617.2) de la proteína S del SARS-CoV-2 (más reporteros de proteínas fluorescentes verdes; Basado en BacMam) en ACE2 (más fluorescencia roja) que expresa células huésped (HEK293T). Los valores se obtuvieron como antes a partir de la cuantificación de la cantidad de verde presente [12, 23], ya que la fluorescencia verde se expresa solo en células infectadas por pseudovirus. Los datos se muestran como porcentaje de control en escala semilogarítmica y se ajustan a la curva sigmoidal clásica utilizada para calcular IC_{50}s para MeBlu también como los compuestos de control incluidos (hidroxicloroquina, HCQ, amarillo atardecer, SY y negro azul naftol , NBlBk). Un conjunto de imágenes representativas correspondientes de experimentos de dilución en serie con MeBlu y el pseudovirus BacMambased que lleva el SARS-CoV-2 S las proteínas se muestran en **C** y **D** como ilustración.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

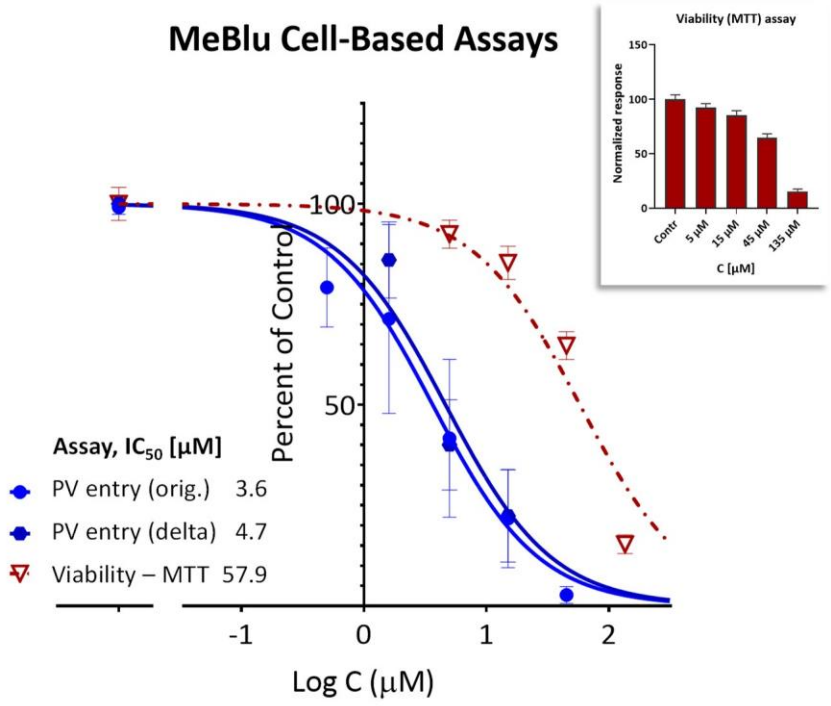


Figura 5. Índice terapéutico de MeBlu en el presente ensayo **basado en células.** Actividad dependiente de la concentración (inhibición de la entrada de pseudovirus basados en BacMam del SARS-CoV-2) y seguridad (efecto sobre la viabilidad) de MeBlu en células HEK293T. Efectos inhibitorios sobre la entrada celular de pseudovirus que expresan el mutante original y delta de la proteína espiga del SARS-CoV-2 (oscuro y claro) azul, respectivamente) mostrado en paralelo con los efectos sobre la viabilidad celular (rojo oscuro; evaluado mediante ensayo MTT) en las mismas condiciones (48 h en presencia de cultivo MeBlu + 48 h; también se muestra por separado como un gráfico de columnas en el recuadro).

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

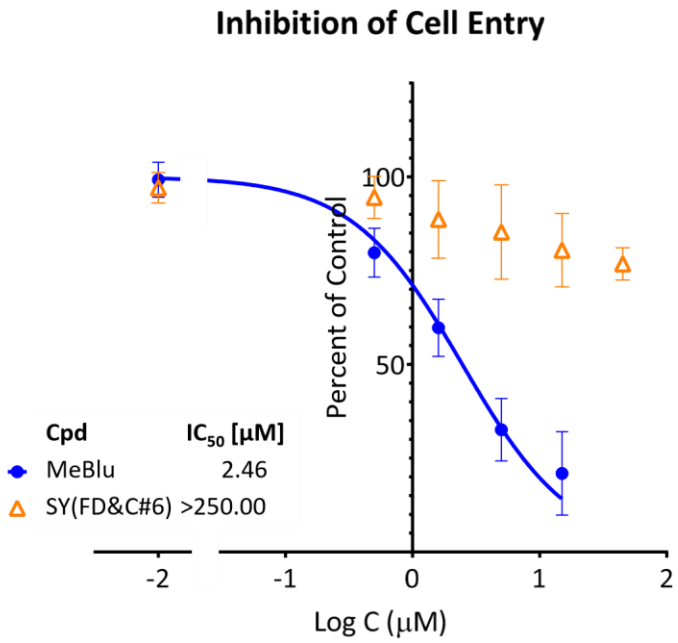


Figure 6. Concentration-dependent inhibition of the entry of SARS-CoV-2 pseudovirus (VSV-ΔG) into Células expresas de hACE2/Furina por MeBlu. Entrada de pseudovirus VSV-G portadores de la proteína SARS-CoV-2 S (más reporteros GFP) en células huésped sobreexpresantes de ACE2/Furina (Vero E6) en el la presencia de concentraciones crecientes de MeBlu se cuantificó a través de la fluorescencia GFP en un sistema de imágenes en vivo. Los datos normalizados se muestran a escala semilogarítmica y se ajustan a la curva sigmoidal clásica utilizada para calcular IC_{50}.

bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

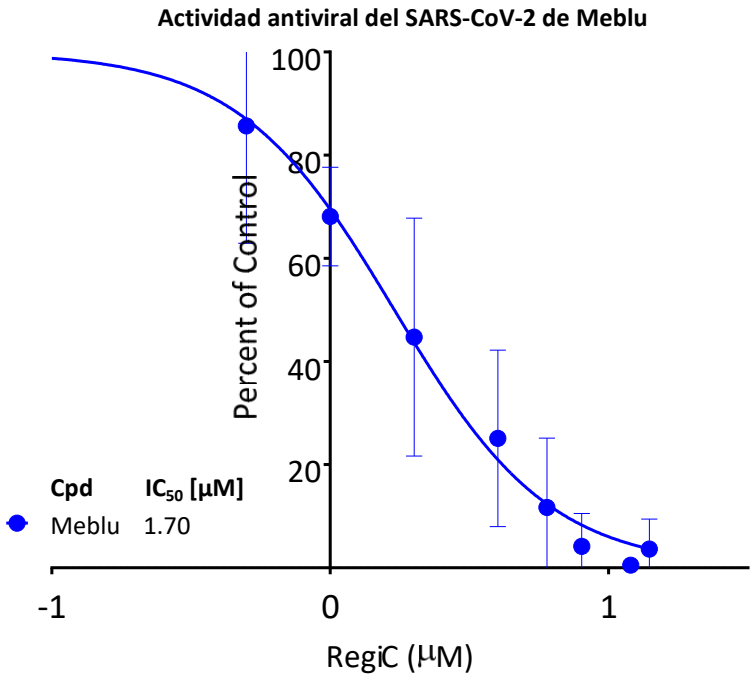
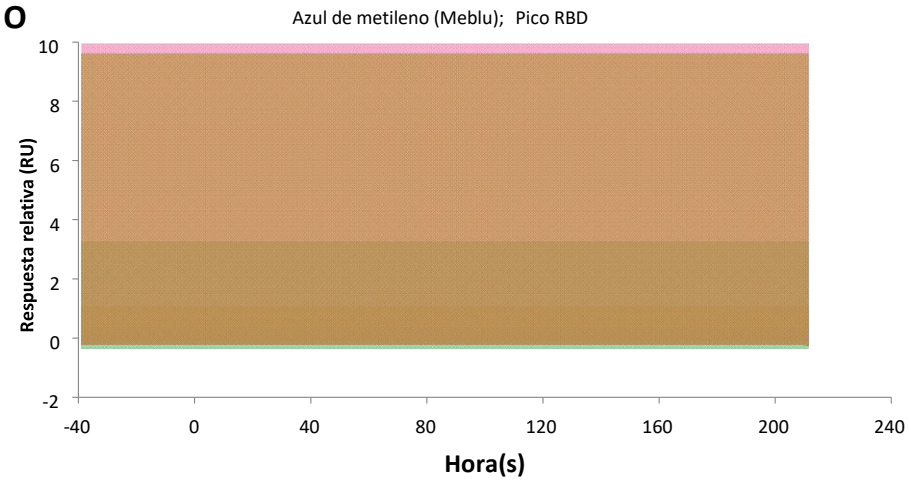


Figura 7. Inhibición dependiente de la concentración de **la replicación del SARS-CoV-2** en **células Vero E6 por MeBlu.** Las células Vero E6 se infectaron con SARS-CoV-2 a un MOI de 0,01; los tratamientos se realizaron durante 48 h como se describe en los Métodos. El rendimiento viral en el sobrenadante celular se cuantificó mediante PCR digital de gotas.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Cifras complementarias



bioRxiv Preprint Doi: https://doi.org/10.1101/2022.03.22.485299; éste Versión Publicada 22 de marzo de 2022. El derechos de autor titular para éste Preprint (cuál era no certificado por par revisión) es el autor/Donante, Quién tiene Concedido bioRxiv un licencia Para Monitor el Preprint en perpetuidad. Eso es hecho disponible debajo aCC-POR-NC-ND 4.0 Internacional licencia.

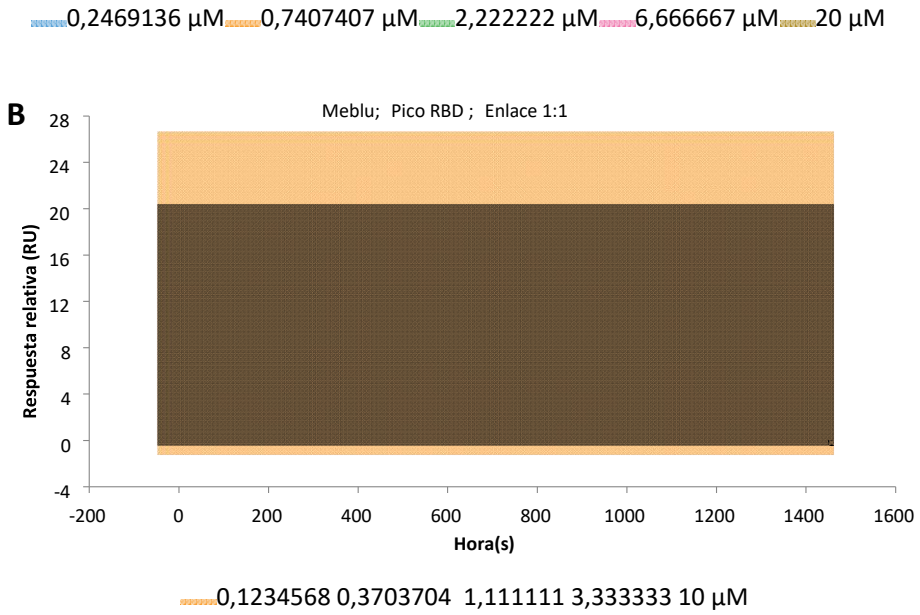


Figura S1. Unión de MeBlu a RBD de pico de SARS-CoV-2 evaluada a través de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Se utilizó la cinética de ciclo multi(A) y mono- (**B**) para medir la unión al pico RBD del SARS-CoV-2 utilizando un Biacore 8K instrumento con un chip sensor S CM5 de la serie (Cytiva) como se describe en los Métodos. Inicialmente se realizó una medición cinética multiciclo, sin embargo, las señales claramente no volvieron a la línea de base durante el período de disociación y una regeneración. no se estableció la condición para asegurar la eliminación de toda la molécula previamente unida antes de la inyección de la siguiente concentración. Como resultado, hubo un número decreciente de sitios de unión disponibles en el transcurso de la medición a medida que los sitios se bloquearon por el concentraciones anteriores, lo que significaba que este enfoque no era apropiado para un análisis cuantitativo , aunque cualitativamente estaba claro que la consolidación estaba ocurriendo. Para hacer frente a la aparente disociación lenta (señal que no regresa a la línea de base entre las inyecciones) se utilizó un enfoque cinético de ciclo único. Los datos indican baja unión micromolar; sin embargo, el comportamiento de binding no pudo describirse bien con interacciones de enlace 1:1, impidiendo así un análisis cuantitativo para determinar el valores on /off-rate y/o KD. La Figura B muestra un ejemplo de esta desviación de la unión 1:1 donde la curva coloreada (amarilla) son los datos medidos , mientras que la curva negra es la curva de ajuste producida utilizando un modelo de enlace 1:1. En cambio, los datos de SPR proporcionan un apoyo cualitativo de que MeBlu interactúa con el pico RBD del SARS-CoV-2.