

# La lunga strada verso le terapie e i vaccini contro la Covid-19

## Parte 1- Riposizionamento dei farmaci

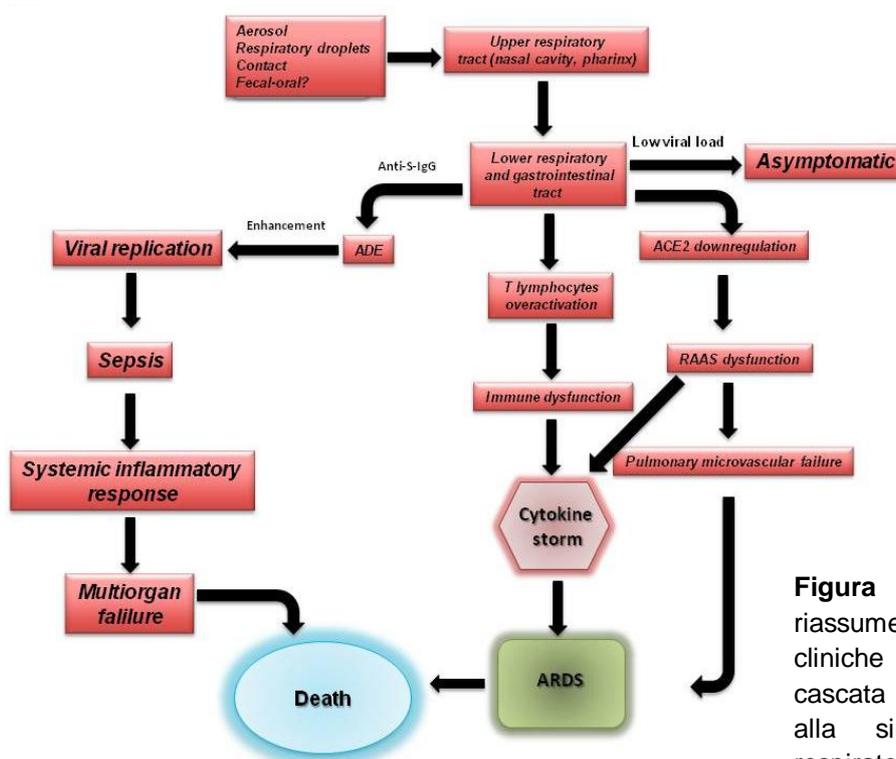
Barbara Illi

Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBPM-CNR), c/o Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Sapienza Università di Roma.

*Note: evidenziate in corsivo sono riportate informazioni per "non biologi".*

### Introduzione

Negli ultimi mesi, abbiamo assistito ad una crescita senza precedenti delle informazioni scientifiche relative ad un solo campo di indagine. SARS-CoV-2 (CoV-2) e la pandemia di Covid-19 hanno rappresentato un'opportunità unica per creare le più forti sinergie tra scienziati appartenenti a diverse discipline: dall'epidemiologia, alla virologia, dalla biologia molecolare e strutturale alla bioinformatica, dall'immunologia, pneumologia, scienze cardiovascolari fino alle scienze sociali. Questo enorme sforzo, al di là del contenimento della pandemia e dell'accumulo di una grande quantità di conoscenza riguardo la biologia di CoV-2, ambisce, ancora oggi, a trovare soluzioni in termini di terapie e vaccini.



**Figura 1.** Schema che riassume le manifestazioni cliniche del Covid-19 e la cascata di eventi che portano alla sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS).  
Abbreviazioni: ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome.

**Tabella 1**

Treatment	Number of trials
<i>Remdesivir</i>	16
<i>Lopinavir/ritonavir</i>	35
<i>Ribavirin</i>	3
<i>Tenofovir</i>	2
<i>Galidesivir</i>	1
<i>Darunavir</i>	2
<i>Camostat</i>	6
<i>Favipiravir</i>	21
<i>Ivermectin</i>	26
<i>Hydroxychloroquine</i>	186
<i>Umifenovir</i>	4
<i>Tocilizumab</i>	36
<i>Steroids</i>	12
<i>Interferon</i>	20
<i>Convalescent plasma</i>	104
<i>Stem cells</i>	47
<i>Vaccines</i>	130

Attualmente, sappiamo che la Covid-19, nella sua manifestazione clinica severa, è una malattia iperinflammatoria, multi organo e potenzialmente letale (figura 1).

La Covid -19 potrebbe essere anche definita una patologia multifattoriale, in quanto la prognosi sfavorevole dipende da una serie di fattori, quali età, sesso<sup>1</sup>, polimorfismi del gene Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) e del sistema HLA<sup>2,3</sup>, etnia<sup>4</sup>. Perciò, deve essere affrontata con terapie multidisciplinari. Ad oggi, sono stati esplorati molti approcci terapeutici – peptidi sintetici, inibitori della RNA polimerasi e delle proteasi, anticorpi monoclonali, plasma convalescente, terapia cellulare - e diversi trial clinici sono in corso (tabella 1). Inoltre, ci sono un certo numero di vaccini in sperimentazione che, ottimisticamente, saranno pronti per la produzione su larga scala in autunno.

### 5.1 Riposizionamento dei farmaci

La prima strategia, quando ci si trova di fronte ad una patologia sconosciuta, causata da un

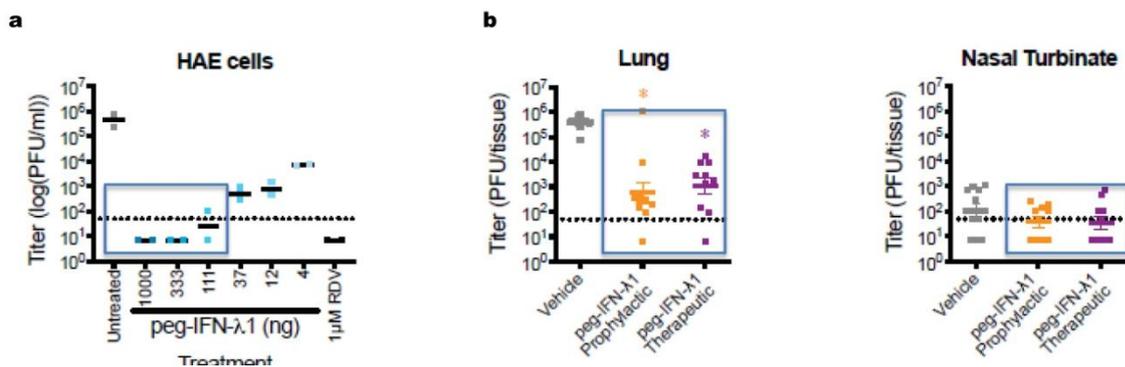
agente eziologico nuovo, è l'utilizzo di farmaci già impiegati per altre patologie, simili o meno. I primi interventi per la Covid-19 sono stati dei cocktail di antivirali e steroidi. Di recente, l'analisi proteomica di 26 su 27 proteine di CoV-2 ha indicato diversi potenziali interattori e bersagli farmacologici<sup>5</sup>. Le proteine di CoV-2 interagiscono con mediatori cellulari di processi vitali per la cellula. Il 40% delle proteine di CoV-2 interagisce con proteine del reticolo endoplasmatico coinvolte nel traffico delle vescicole, il che può spiegare il massiccio rimodellamento del reticolo endoplasmatico stesso e dell'apparato di Golgi durante l'infezione. Alcune proteine, interagiscono con regolatori epigenetici, come la deacilasi istonica 2 ( Histone Deacetylase 2, HDAC2) e le proteine con bromodominio (bromodomain and extra-terminal domain, BET). Altre interagiscono con proteine della risposta immune innata, con la via di segnalazione dell'ubiquitina e con l'apparato di

traduzione<sup>5</sup>. Questo tipo di analisi ha identificato un numero di molecole già approvate per l'uso clinico, come anche molecole in fase di sperimentazione pre-clinica o nuove molecole per cui esistono ancora solo dati di laboratorio "in vitro"<sup>5</sup>. Tra esse, inibitori della sintesi proteica e ligandi dei recettori Sigma 1 e 2 - due recettori transmembrana espressi nel cervello e nel sistema immunitario – riducono la capacità infettiva di CoV-2<sup>6,7</sup>.

- **Antivirali**

- **Interferoni**

CoV-2 sopprime la risposta immune primaria anche impedendo la produzione degli interferoni e inibendo l'attivazione delle loro vie di segnalazione<sup>8,9</sup>. Inoltre, dati pubblicati in precedenza, hanno indicato come gli interferoni possano essere dannosi anziché favorevoli, poiché inducono l'espressione di ACE2, aumentando, potenzialmente, la capacità infettiva di CoV-2<sup>9</sup>. Inoltre, siccome i recettori per gli interferoni di tipo I e II sono espressi in maniera ubiquitaria,

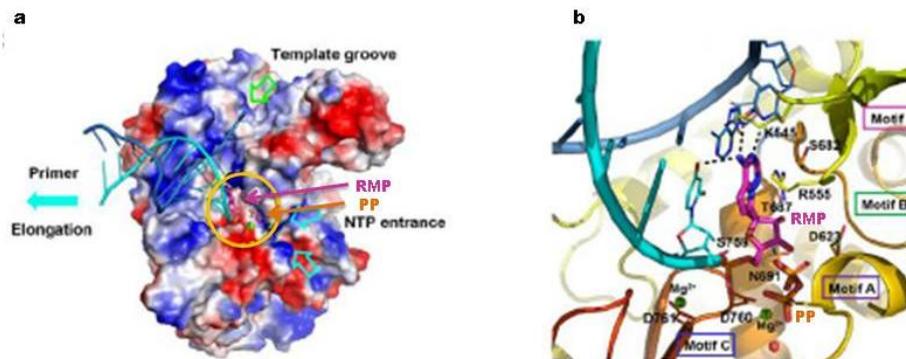


**Figura 2.** Effetto del trattamento con IFN λ. Titolo virale in umane cellule di epitelio respiratorio (a), polmoni (b) e turbinati nasali (c) in un modello murino di infezione da CoV-2. Evidenziati da un rettangolo blu i dati ottenuti con l' IFN λ. Abbreviazioni: HAE=human air way epithelial cells. (Tratto da: *Dinnon et al., bioRxiv. 2020 May 7:2020.05.06.081497. doi: 10.1101/2020.05.06.081497*).

una terapia basata sugli interferoni causa effetti collaterali importanti. Tuttavia, l'interferone λ di tipo III, è stato proposto come potenziale agente terapeutico, dal momento che inibisce la disseminazione virale dall'epitelio nasale alle vie aeree superiori<sup>10</sup> ed è una molecola protettiva, anziché infiammatoria<sup>11</sup>. Recentemente, l' interferone λ si è dimostrato efficace nell' inibire la replicazione virale nelle cellule dell'epitelio del tratto respiratorio superiore e avere effetto profilattico e terapeutico nell'unico modello murino ad oggi disponibile che ricapitolò l'infezione da CoV-2 (figura 2)<sup>12</sup>.

## ➤ Inibitori dell' RNA polimerasi

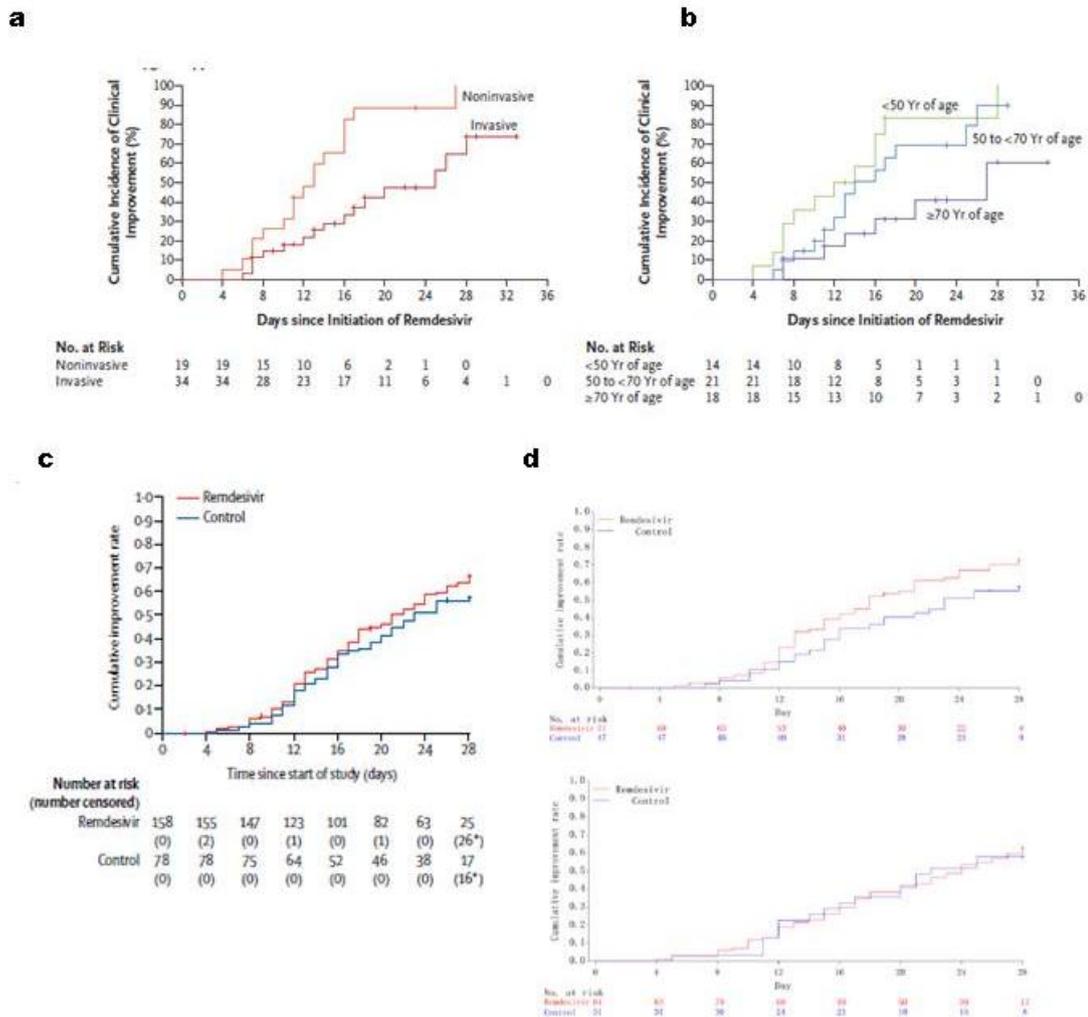
- a. Remdesivir. Questo farmaco è utilizzato in diversi trial clinici in corso (tabella 1). Il remdesivir è un analogo dei nucleosidi che viene convertito nella sua forma trifosfato all'interno della cellula e che inibisce l'RNA polimerasi. È stato già utilizzato per il trattamento dell' Ebola<sup>13</sup> ed ha attività antivirale sia contro SARS-CoV che MERS-CoV<sup>14</sup> e contro CoV-2 *in vitro*<sup>15</sup>. Le basi strutturali dell'azione del remdesivir sono state chiarite dalla struttura in CryoEM, ad una risoluzione di 2.5 Å, dell'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) di CoV-2, complessata con: i) le proteine non strutturali (nsp) 7 ed 8, che aiutano la polimerasi a legarsi allo stampo e ne aumentano la capacità di processamento; ii) con uno stampo di RNA di 50; iii) con il remdesivir, (figura 3)<sup>16</sup>. Il remdesivir, nella sua forma monofosfato, giace



**Figura 3.** a) Struttura del sito catalitico dell' RdRp, col suo potenziale elettrostatico da negativo (rosso) a positivo (blu), legato all'RNA stampo (in azzurro). Il sito attivo dell'enzima è evidenziato da un circolo giallo. Il remdesivir, nella sua forma monofosfato (RMP) è mostrato in viola e il pirofosfato, necessario alla conversione in remdesivir trifosfato (RTP), in arancio. b) Ingrandimento del sito attivo di RdRp. Oltre all'RMP e al pirofosfato sono mostrati, in verde, gli ioni magnesio ( $Mg^{2+}$ ), anch'essi richiesti per la conversione dell'RMP in RTP. Abbreviazioni: RMP=remdesivir monofosfato; PP=pirofosfato; NTP=nucleotide trifosfato. (Adattato da: Yin *et al*, Science, 2020).

nella regione catalitica di RdRp, al sito 3' dell'RNA innesco ed è incorporato come prima base nel filamento replicato, causando la terminazione della catena, una volta convertito nella sua forma trifosfato<sup>16</sup>. Questo tipo di meccanismo è stato proposto per altri antivirali come favipiravir, galidesivir, ribavirin, che hanno la stessa azione inibitoria su RdRp<sup>17</sup>.

I primi dati relativi all'uso compassionevole del remdesivir in 36 su 53 pazienti affetti dalla forma grave di Covid-19 (30 in ventilazione meccanica e

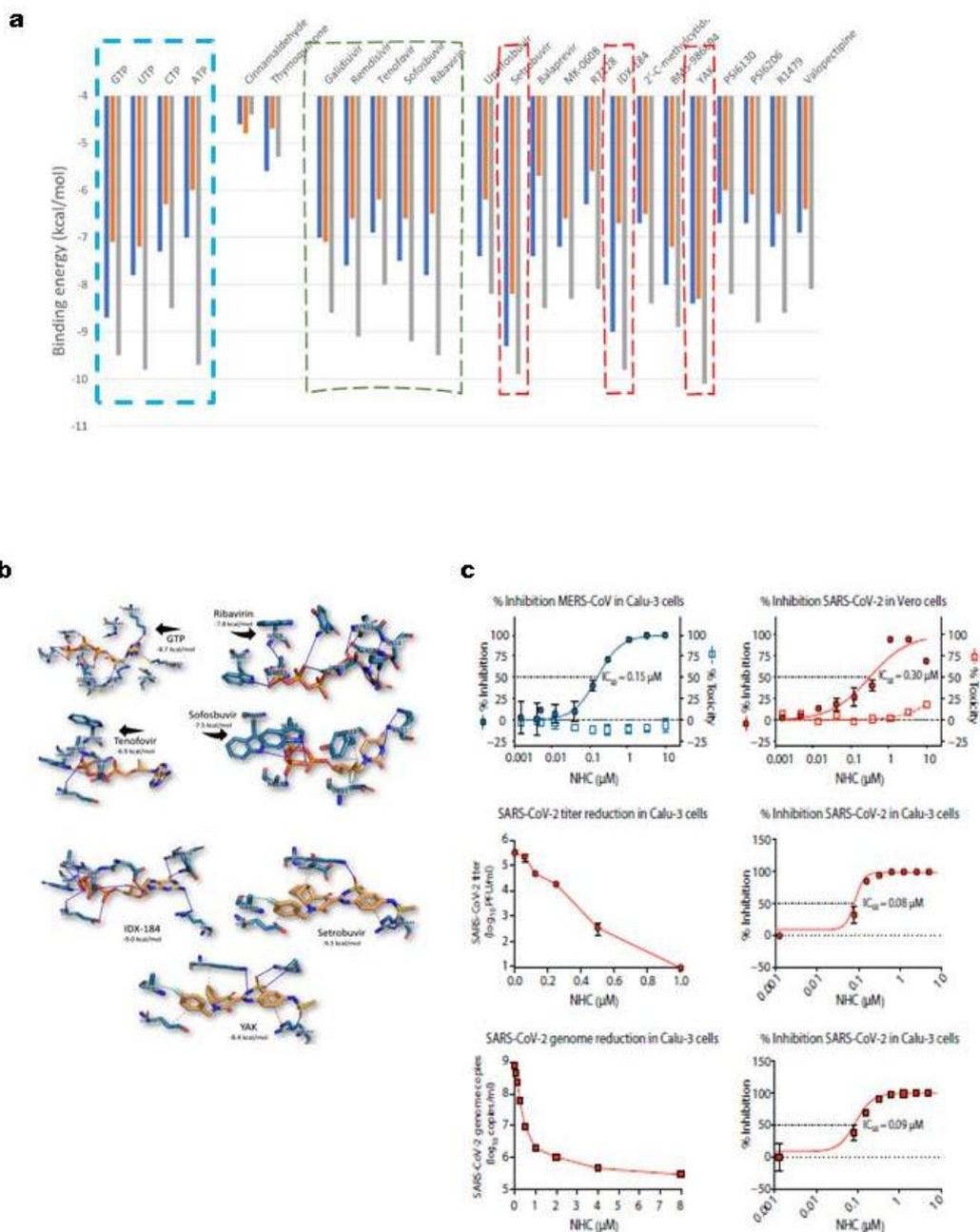


**Figura 4.** Effetto del remdesivir, ad uso compassionevole, in pazienti stratificati per procedura di ventilazione (invasiva contro non invasiva, a) ed età (b). c) Effetto del remdesivir su 158 pazienti con polmonite e saturazione di O<sub>2</sub> del 94% o inferiore, il cui trattamento è iniziato a 10 giorni dall'insorgenza dei sintomi, rispetto al gruppo di controllo (79 pazienti). d) Effetto del remdesivir quando somministrato entro 10 giorni dell'insorgenza dei sintomi (pannello superiore) o dopo (pannello inferiore). (Adattato da: *Grein et al., NEJM, 2020; Wang et al., Lancet, 2020*).

in ossigenazione extracorporea), hanno riportato un miglioramento delle condizioni cliniche (figure 4a e b)<sup>18</sup>. Tuttavia, il primo trial randomizzato su 237 pazienti gravi, in doppio cieco con controllo rappresentato da placebo, con remdesivir (più lopinavi/ritonavir e corticosteroidi) non ha riportato benefici clinici statisticamente significativi (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04257656) (figura 4a e b). Tuttavia, pazienti trattati precocemente con

remdesivir hanno recuperato più velocemente rispetto ai pazienti trattati con placebo, suggerendo risultati più promettenti ampliando il numero di pazienti trattati precocemente dopo l'insorgenza della malattia (figura 4d)<sup>19</sup>.

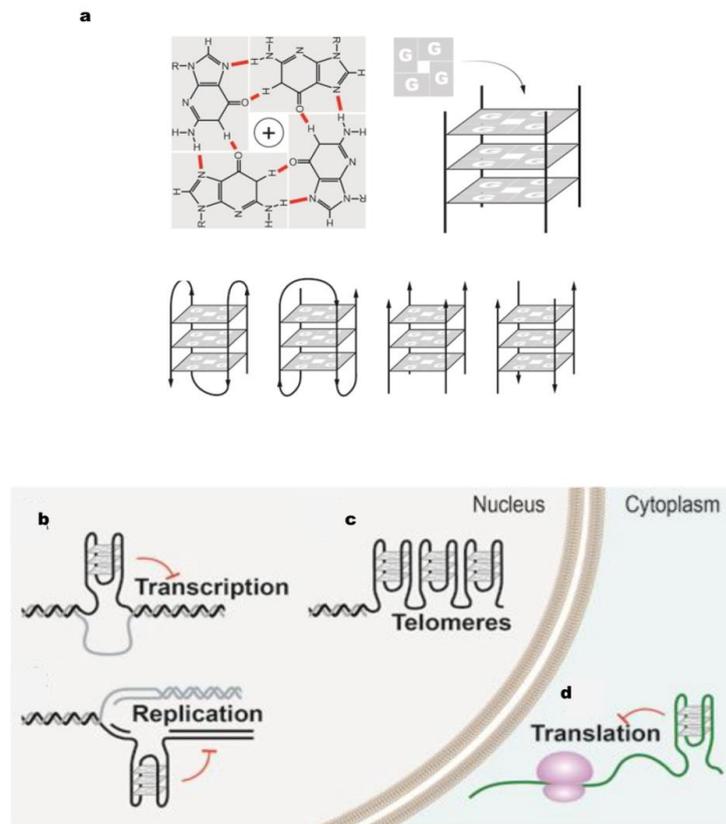
- b. Altri inibitori dell'RNA polimerasi. Da esperimenti di "molecular docking", altri analoghi dei nucleosidi si sono dimostrati efficaci nell'inibire l'attività di RdRp e la replicazione virale. Ribavirin e sofosbuvir (già testati nel limitare l'infezione da HCV<sup>20</sup>), tenofovir (utilizzato per la prevenzione dell'infezione da HIV<sup>21</sup>) e galidesivir (considerato un trattamento potenziale contro Ebola e il virus della febbre emorragica<sup>22</sup>) hanno un'energia di legame per l'RdRp di CoV-2 simile a quella dei nucleotidi fisiologici (figura 5a). Un altro analogo, l'IDX184, al momento in trial clinico per l'epatite C<sup>23</sup>, ha un'energia di legame ancora migliore (figura 5a). Questa differenza nell'affinità per RdRp dipende dal numero di legami idrogeno, legami idrofobici, alogeno ed interazioni cation- $\pi$  (cioè, *legami non covalenti che si formano tra la superficie di un composto chimico con una struttura ciclica (aromatica), che è caratterizzata da legami di risonanza, che conferiscono alta stabilità, e un catione*) (figura 5b)<sup>24</sup>. Inoltre, il favipiravir, un analogo delle purine, si è dimostrato efficace nel migliorare le condizioni cliniche di pazienti Covid-19<sup>25</sup>.
- c. Analoghi  $\beta$ -d-N4-idrossicitidina (NHC). Questi analoghi hanno già mostrato di possedere un'attività antivirale ad ampio spettro. Molto di recente, è stato riportato che posseggono anche attività antivirale contro MERS-CoV e CoV-2 in cellule primarie epiteliali umane del tratto respiratorio (figura 5c)<sup>17</sup>. EIDD-2801, un precursore del  $\beta$ -d-N4-idrossocitidina -5'- isopropil estere, riduce non solo la replicazione e la patogenesi di SARS-CoV e MERS-CoV ma ha anche attività profilattica in modelli murini. Questi effetti sembrano dovuti ad un accumulo di mutazioni nel genoma virale<sup>17</sup>. Tuttavia, non esistono dati *in vivo* per CoV-2, sebbene un modello animale che ricapitoli l'infezione da CoV-2 sia stato prodotto<sup>12</sup>.



**Figura 5.** a) Energia di legame di diversi inibitori dell'RNA polimerasi, confrontata con quella dei nucleotidi fisiologici (evidenziati da una linea spezzata azzurra). b) Legame formato tra i diversi inibitori evidenziati in a), e l'RNA polimerasi. c) Effetto del  $\beta$ -d-N4-idrossicitidina sulla capacit  infettiva di MERS-CoV e CoV-2. (Adattato da: *Elfiky AA, Life Sci, 2020; Shean et al., Sci Transl Med, 2020*).

d. Inibitori dei G-quadruplex (G4s). I G4s sono strutture a 4 eliche formate da regioni ricche in guanina, sia nel DNA che nell'RNA (figura 6)<sup>26</sup>. I quadruplex a RNA sono pi  stabili di quelli a DNA. G4s putativi sono stati trovati in un'ampia variet  di loci genomici umani e, di recente, anche in circa 7000

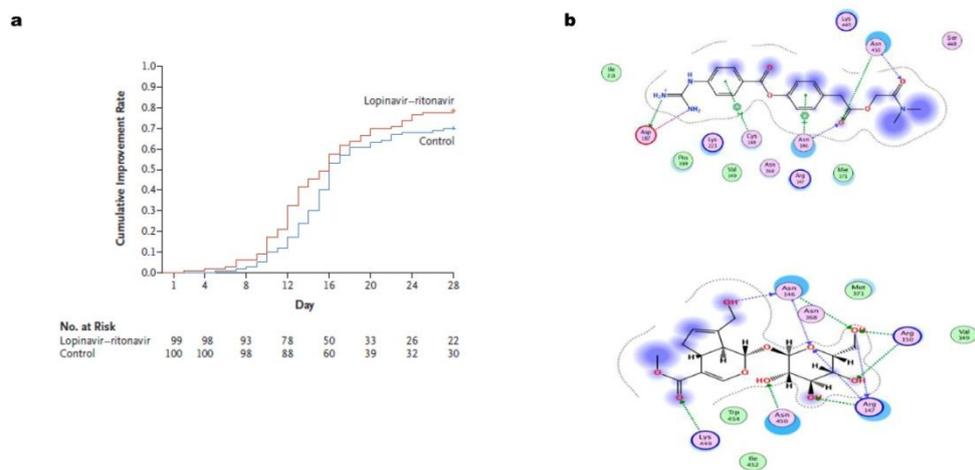
genomi virali<sup>27</sup>. Inoltre, sono stati identificati 2 macrodomini in SARS-CoV, capaci di legare i quadruplex, coinvolti nella replicazione e trascrizione virale<sup>28</sup>. Grazie ad una ricerca nel web server Quadruplex forming G-Rich Sequences, circa 25 G4s putativi sono stati identificati nel genoma di CoV-2 di Wuhan (NCBI reference sequence: NC\_045512.2)<sup>29</sup>. Tuttavia, i ligandi dei G4s sono scarsamente impiegati nei trial clinici, poiché mancano di specificità. Una strategia alternativa potrebbe essere quella di bersagliare l'elicasi di CoV-2, che srotola l'estremità 3' dell'RNA nascente e assicura il trasferimento all'estremità 5' della sequenza leader complementare. Le elicasi, srotolano anche i quadruplex. Ad oggi, inibitori delle elicasi, come la banina<sup>30</sup> e gli aptameri (*oligonucleotidi che possono interferire con la replicazione virale*)<sup>31</sup> non sono stati trasferiti alla pratica clinica. Comunque, una ricerca per farmaci già approvati dall'FDA nel database DrugBank, ha indicato 20 molecole potenzialmente attive contro le elicasi<sup>29</sup> che potrebbero essere riposizionate per il trattamento della Covid-19.



**Figura 6.** Struttura dei G-quadruplex. a) I G-quadruplex nascono dall'associazione di 4 guanine in una struttura ciclica, stabilizzata da legami idrogeno (N1–N6 and N2–N7). I quartetti di guanina si impilano l'uno sull'altro e formano strutture ad elica a 4 filamenti. Cationi monovalenti (come Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) guidano la formazione dei G-quadruplex. b) I G-quadruplex possono essere raggruppati in differenti famiglie, ad esempio, paralleli o antiparalleli a seconda dell'orientamento dei filamenti e possono essere ripiegati sia intermolecolarmente che intramolecolarmente. Il tipo di struttura dipende dal numero di tratti di guanina in un filamento. (Adattato da: Rhodes & Lipps, *Nucleic Acid Res*, 2015)

## ➤ Inibitori delle proteasi

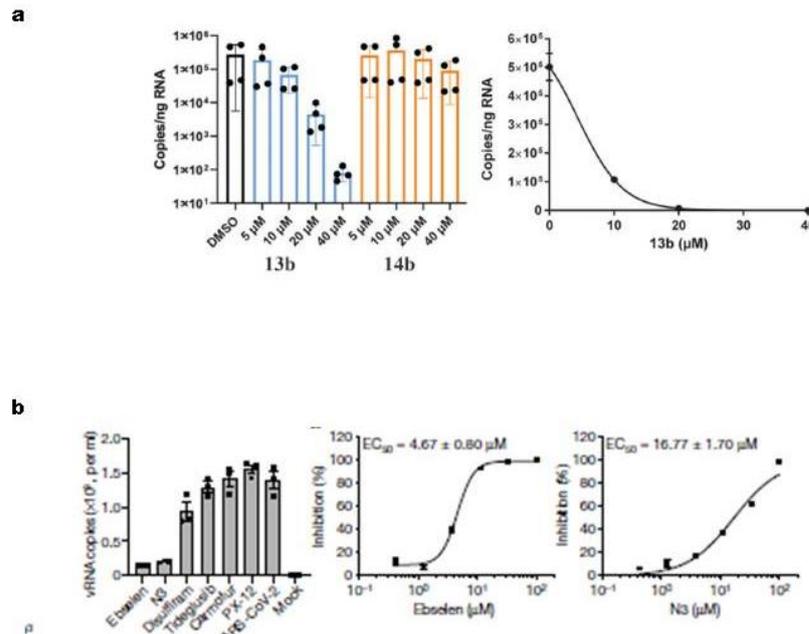
- a. Lopinavir/Ritonavir. Lopinavir e ritonavir, per lo più in trattamento combinato, e il darunavir sono già stati usati per il trattamento dell'infezione da HIV. Dati recenti di un trial clinico in pazienti Covid-19 gravi non hanno mostrato risultati clinici incoraggianti, né una diminuzione nella carica dell'RNA virale nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo (figura 7a)<sup>32</sup>.



**Figura 7.** a) Effetto del trattamento combinato con lopinavir e ritonavir su 99 pazienti rispetto al gruppo di controllo (100 pazienti). b) Numero e tipo di legami formati dal Camostat (pannello superiore) e dal composto NPC306344 (pannello inferiore) con TMPRSS2. (Adattato da: Cao et al., *NEJM*, 2020; Rahman et al., *Molecules*, 2020).

- b. Inibitori di TMPRSS2. Una delle proteasi cellulari coinvolta nel processamento della proteina Spike (S) di COV-2, necessario all'ingresso del virus nella cellula, è la Serina Proteasi Transmembrana 2 (transmembrane serine protease 2, TMPRSS2). Infatti, l'inibizione di TMPRSS2 da parte del Camostat - già impiegato come terapia per la pancreatite cronica, esofagite post-operatoria e da reflusso - blocca l'ingresso di SARS-CoV e CoV-2 nelle cellule<sup>33</sup>. Di recente, uno screening di una libreria di composti naturali (Natural Product Activity and Species Source, NPASS), contenente 30927 composti, contro TMPRSS2 ha identificato 12 composti. Uno di questi, - NPC306344 - ha mostrato la più alta affinità per TMPRSS2 (figura 7b)<sup>34</sup>. Tuttavia, validazioni "in vitro" e "in vivo" devono attestare l'efficacia di questi composti nell'inibire la capacità infettiva del virus.

- c. Inibitori di M<sup>pro</sup>. La proteasi più studiata di CoV-2 è M<sup>pro</sup> (detta anche proteasi 3C), una proteasi dimerica simile alla chimotripsina, codificata dal gene nsp5. Studi di predizione hanno identificato piccole molecole già impiegate in altre malattie infettive. Un esempio sono il velpatasvir, ledipasvir e paritaprevir, usati



**Figura 8.** a) Effetto dell'inibitore chetoamidico 13b sulla replicazione virale in cellule umane di polmone Calu-3 (sinistra). A destra è mostrata una curva dose-risposta dell'EC<sub>50</sub> del composto 14b nell'inibire la replicazione dell'RNA virale. b) Quantificazione dl numero di copie di RNA virale per millilitro di sovrinatante di cellule Vero, a 72 ore dall'infezione con CoV-2 e trattate con vari composti (e veicolo, il dimetilsolfossido) (a sinistra). Al centro e a destra le curve dose-risposta mostrano un EC<sub>50</sub> molto migliore per ebselen che per il composto N3, che pure mostra attività antivirale *in vitro* (a sinistra). Abbreviazioni: EC<sub>50</sub>= in una curva dose-risposta, concentrazione effettiva che ha un' efficacia intermedia tra il valore di base e il valore massimo (half maximal effective concentration). (Adattato da: Zhang et al., Science 2020; Jin et al., Nature, 2020).

nell'infezione da HCV<sup>35,36,37</sup> e il raltegravir, impiegato come inibitore di HIV<sup>38,39</sup>. In aggiunta ai farmaci riposizionati, nuovi farmaci, anche di nuova sintesi, sono stati testati per inibire M<sup>pro</sup>. Di recente, sono state ottenute le strutture cristallografiche di M<sup>pro</sup>, complessata sia con inibitori α-chetoamidici<sup>40</sup> che con ebselen, un farmaco anti-ossidante<sup>41,42</sup>. Sia gli inibitori chetoamidici che l'ebselen hanno mostrato attività antivirale *in vitro*<sup>40,42</sup> (figure 8a e b) e l'inibitore chetoamidico 13b ha anche mostrato tropismo per

il tessuto polmonare in topi CD1<sup>40</sup>. Inoltre, un'analisi computazionale di inibitori putativi di M<sup>pro</sup> hanno suggerito il darunavir come farmaco promettente<sup>43</sup>. 2 trial clinici sull'uso del darunavir, come trattamento per la Covid-19, sono in corso (tabella1).

- d. Inibitori di catepsina-L (CatL). CatL, una cisteina proteasi degli endosomi, sostituisce TMPRSS2 una volta che CoV-2 entra nel citoplasma e continua a tagliare la subunità S1 di S<sup>44</sup>. Questo potrebbe spiegare perché inibitori di TMPRSS2 ed inibitori non-specifici della catepsina hanno efficacia limitata se usati da soli. In effetti, l'uso combinato di questi inibitori blocca completamente l'infezione da CoV-2 *in vitro*<sup>45</sup>. L'inibizione di CatL, tuttavia, desta preoccupazione per la sua espressione ubiquitaria. Nonostante questo, un certo numero di molecole che la inibiscono sono state approvate dall'FDA e potrebbero essere riposizionate per il trattamento della Covid-19<sup>46</sup>.

➤ **Inibitori della 2'-O-ribosio metiltransferasi**

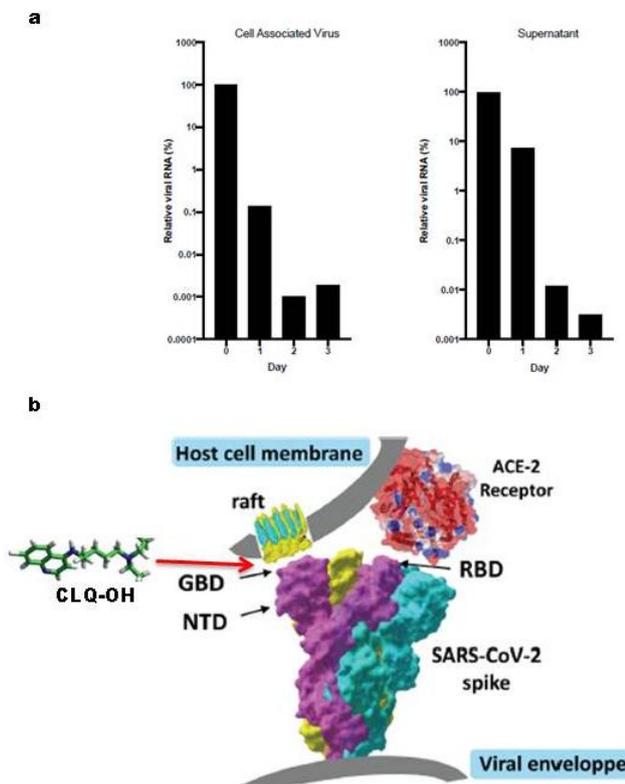
Un altro bersaglio potenziale di CoV-2 è la 2'-O-ribosio metiltransferasi, codificata dal gene nsp16. L'attività di questo enzima è necessaria per la metilazione dei "cap" (rivestimenti) dell'estremità 5' degli RNA messaggeri subgenomici. In questo modo, gli RNA messaggeri subgenomici sono mascherati e protetti dalle difese della cellula ospite. Uno studio predittivo ha indicato il bictegravir e il dolutegravir (entrambi inibitori dell'integrasi di HIV) come potenziali candidati per il trattamento di Covid-19<sup>39</sup>.

➤ **Antiparassitari**

- a. Ivermectin. L'ivermectin è un farmaco veterinario che è stato traslato nella pratica clinica ad uso umano. E' stato dimostrato che impedisce l'ingresso nel nucleo dell'integrasi di HIV<sup>47</sup>, inibendo l'interazione integrasi/ importina  $\alpha/\beta 1$ , e che limita la capacità infettiva di un gran numero di virus<sup>48,49,50,51</sup>. Questo ampio spettro di attività sembra essere dipendente dall' utilizzo dei virus ad RNA delle funzioni dell'importina  $\alpha/\beta 1$ . Dal momento che SARS-CoV sfrutta l'importina  $\alpha/\beta 1$  per il trasferimento nucleo-citoplasma della proteina N del nucleocapside<sup>52</sup> e inibisce l'attività antivirale di STAT1, sequestrando l' importina  $\alpha/\beta 1$  nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi<sup>53</sup>, è concepibile che CoV-2 possa usare gli stessi meccanismi e che, perciò,

l'ivermectin possa essere efficace contro l'infezione. In effetti, dati recenti mostrano che l'ivermectin riduce l'RNA virale sia nel sovrinatante che all'interno delle cellule infettate a partire dalle 24 di trattamento, raggiungendo un'inibizione di 5000 volte in 48 ore (figure 9a)<sup>54</sup>. Al momento, 27 trial clinici sull'ivermectin sono in corso per il trattamento della Covid-19 (tabella 1).

b. Idrossiclorochina/Azitromicina. Dall'inizio della pandemia, l'idrossiclorochina (CLQ-OH) ha ricevuto grande attenzione. CLQ-OH è la versione più sicura della cloroquina,



**Figura 9.** a) Effetto dell'ivermectin sulla replicazione dell'RNA virale in cellule Vero infettate con CoV-2, e nel relativo sovrinatante, a diversi giorni dall'infezione. L'ivermectin (e il veicolo, il dimetilsolfossido) sono stati aggiunti al terreno di coltura 2 ore dopo l'infezione. b) Modello di riconoscimento duplice della membrana cellulare per la proteina S di CoV-2. Col suo RBD, S riconosce il recettore ACE2, mentre con la parte N-terminale riconoscerebbe i gangliosidi all'interno delle cosiddette "zattere lipidiche", ossia porzioni della membrana cellulare particolarmente ricche di glicosfingolipidi e colesterolo. CLQ-OH interferirebbe con questo riconoscimento. Abbreviazioni: RBD=receptor binding domain (dominio di legame al recettore). ACE2=Angiotensin Converting Enzyme 2; GBD=ganglioside binding domain (dominio di legame ai gangliosidi); NTD= N-terminal domain (dominio N-terminale) (Adattato da: Cali et al., *Antiviral Res*, 2020; Fantini et al., *J Antimicrob Agents*, 2020).

quest'ultima sintetizzata nel 1934 e usata per trattare la malaria<sup>55,56</sup>. Esercita un effetto immunomodulatorio in un ampio numero di patologie, incluse l'AIDS e i tumori<sup>57,58</sup>. In un trial clinico non randomizzato e "open label" (ossia "in aperto", in cui paziente e medico sanno cosa si sta somministrando),

CLQ-OH in combinazione con azitromicina (ATM), hanno ridotto la carica virale<sup>59</sup>. Il meccanismo d'azione di CLQ-OH è stato identificato tramite "modellistica molecolare"<sup>60</sup>. CLQ-OH possiede un'alta affinità per i gangliosidi, che sono utilizzati, insieme ad ACE2, dalla proteina S per entrare nelle cellule ospiti. *I gangliosidi sono glicosfolipidi di membrana – costituiti a loro volta di ceramide e oligosaccaridi – contenuti una o più molecole di acido sialico legate alla catena oligosaccaridica.* Un dominio di legame ai gangliosidi è stato rilevato nel dominio N-terminale di S di CoV-2 ed è stato proposto un modello duplice del riconoscimento della cellula bersaglio da parte di S (figura 27b)<sup>60</sup>. CLQ-OH, legata ai gangliosidi e specificamente a GM1 (*un ganglioside contenente una sola molecola di acido sialico*), potrebbe interferire con il riconoscimento della membrana cellulare da parte di S, diminuendo la forza dell'interazione con ACE2. Lo stesso meccanismo è impiegato, probabilmente, dall'azitromicina che ha una struttura praticamente identica ad uno zucchero su GM1<sup>61</sup>.

#### ➤ **Inibitori della fusione di membrana**

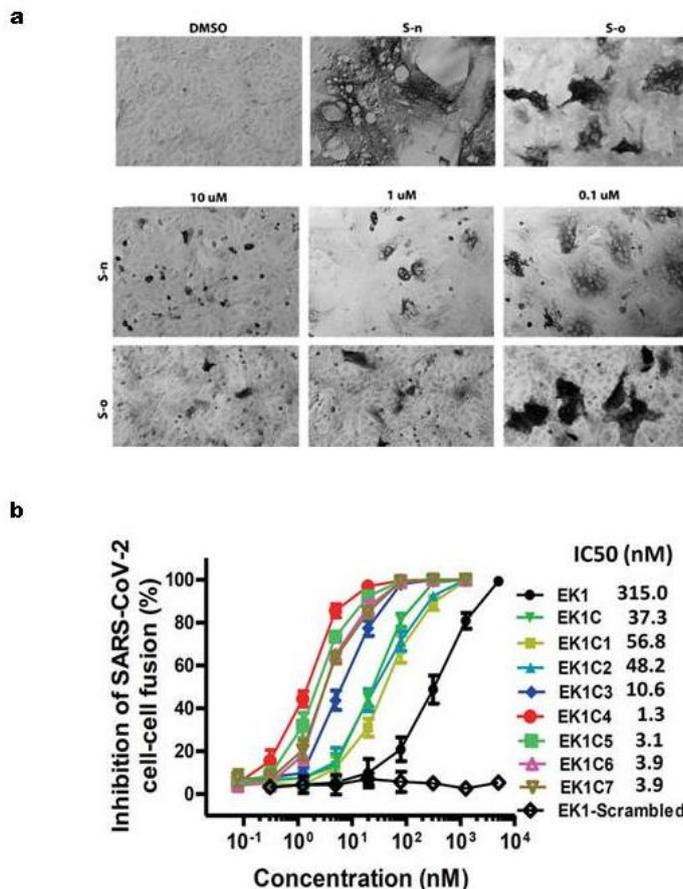
- a. Umifenovir. L' umifenovir è un inibitore della fusione di membrana già impiegato per il trattamento dell'influenza A e B. Sono disponibili pochi risultati sul suo utilizzo nel trattamento della Covid-19, mentre 4 trial clinici sono in corso (tabella 1). Tuttavia, una relazione su uno studio su 50 pazienti con malattia lieve/moderata, 16 trattati con umifenovir e 34 con lopinavi/ritonavir, ha riportato che i pazienti trattati con umifenovir sono guariti e sono diventati negativi all'RNA virale più velocemente dei pazienti trattati con lopinavi/ritonavir<sup>62</sup>.
- b. Nelfinavir. Inizialmente prodotto come un inibitore di proteasi dell'HIV<sup>63</sup>, il nelfinavir inibisce la fusione delle proteine S sia di SARS-CoV che di CoV-2 con la membrana cellulare, probabilmente grazie al legame del dominio N-terminale del sub-dominio S2 del trimero e impedendo la formazione della regione a sette ripetizioni (heptad repeat, HR) richiesta per la fusione del virus con la cellula bersaglio (figure 10a)<sup>64</sup>.
- c. EK1 e derivati. Un peptide inibitore, disegnato precedentemente che ha come bersaglio la regione HR del subdominio S2 di Spike (detto EK1), è stato già sfruttato per inibire le infezioni da SARS-CoV e MERS-CoV, altri coronavirus umani e coronavirus in relazione con SARS-CoV (SARSr-CoV).

Questo peptide ha anche dimostrato attività profilattica e terapeutica nei topi infettati<sup>65</sup>. Siccome CoV-2 ha una capacità di fusione più elevata rispetto a quella di SARS-CoV, probabilmente a causa di diversi aminoacidi mutati nella sua regione HR1 di Spike, è stata prodotta una versione avanzata, grazie all'aggiunta di una molecola di colesterolo. Il nuovo lipopeptide, detto EK1C4, ha mostrato una più alta capacità di inibire le infezioni da hCoV-OC43, MERS-CoV e CoV-2 (figure 10b)<sup>66</sup>.

- **Antinfiammatori**

- a. Anticorpo monoclonale contro il recettore dell'interleuchina 6 (Tocilizumab).

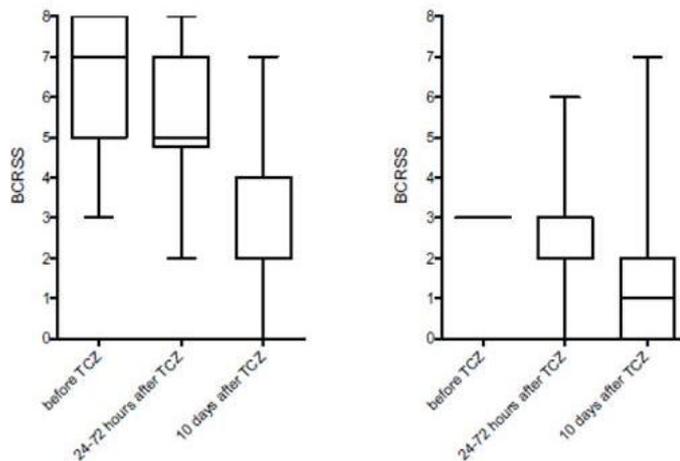
Uno dei dati certi sulla patogenesi della Covid-19 è la cosiddetta tempesta di citochine (figura 1), di cui la produzione di interleuchina 6 (IL-6) è l'ultimo, dannoso elemento della cascata. Perciò, interferire con le vie di segnalazione dell' IL-6 potrebbe essere efficace nel limitare il danno multiorgano causato dal Covid-19. Il tocilizumab (TCZ) è un anticorpo monoclonale che riconosce sia la forma solubile che legata alla membrana del recettore dell'IL-6 ed è stato già impiegato nel trattamento



**Figura 10.** a) Pannello superiore. Fusione della membrana di cellule Vero trasfettate con un plasmide esprime la proteina S di SARS-CoV (S-o) o CoV-2 (S-n). Le proteine sono state visualizzate con anticorpi specifici coniugati con la perossidasi per la visualizzazione a contrasto di fase. Pannello inferiore. Stesso esperimento, ma in presenza di nelfinavir a varie concentrazioni. b) Inibizione della fusione di membrana da parte del composto EK1 e derivati. Il composto EK1C4, in rosso, mostra l'efficacia maggiore. Abbreviazioni: S-o=Spike-old (Spike di SARS-CoV); S-n=Spike-new (Spike di SARS-COV-2). IC<sub>50</sub>= in una curva dose risposta, la concentrazione che ha attività inibitoria intermedia tra il valore di base e quello massimo (half maximal inhibitory concentration). (Tratto da: Musafar et al., J Med Virol, 2020; Xia et al., Cell Res, 2020).

dell'artrite reumatoide<sup>67</sup>. Al momento, ci sono 36 trial clinici sull'impiego del TCZ (tabella 1), uno in combinazione con il remdesivir. Ad oggi, i risultati relativi all'efficacia del TCZ nei pazienti Covid-19 gravi sono disponibili per numeri piccoli di pazienti<sup>68-70</sup>. Tuttavia, tutti gli studi riportano effetti benefici nei pazienti critici, In particolare, le condizioni respiratorie di 69 pazienti su 100, trattati con TCZ agli Spedali Civili di Brescia, sono significativamente migliorate (figura 11); il 39,5% dei pazienti che richiedevano terapia intensiva ed erano sottoposti a ventilazione forzata sono stati estubati<sup>70</sup>.

- b. Steroidi. Sono stati riportati risultati contraddittori sull'uso dei corticosteroidi nel trattamento dei pazienti con la Covid-19. Un'analisi degli studi disponibili sull'uso dei corticosteroidi nel trattamento delle infezioni da SARS-CoV, MERS-CoV e CoV-2 non ha evidenziato benefici clinici. Al contrario, sono stati osservati effetti collaterali importanti<sup>71</sup>. Tuttavia, corticosteroidi che agiscono per via inalatoria inibiscono l'infezione da coronavirus *in vitro*<sup>72</sup>, e in uno studio retrospettivo su 46 pazienti, 15 che hanno ricevuto basse e precoci dosi di metilprednisolone, hanno mostrato un miglioramento delle condizioni respiratorie, sia in termini di SpO<sub>2</sub> che di immagini in TAC<sup>73</sup>. Molto recentemente, è stato dimostrato che il desametasone, un farmaco ampiamente disponibile in dosi massicce ed economico, è in grado di ridurre la mortalità dei pazienti Covid-19 del 20%. I risultati del trial clinico, eseguito nel Regno Unito e che ha reclutato 2100 pazienti trattati con desametasone, comparati con 4300 pazienti che hanno ricevuto cure standard, devono essere ancora pubblicati, ma in un comunicato stampa è stato dichiarato che il desametasone si è rivelato efficace nel recupero di pazienti critici, specialmente quelli che richiedevano ventilazione forzata. Anche i pazienti che erano in ossigenoterapia hanno mostrato miglioramenti, mentre nessun effetto è stato osservato nei pazienti con sintomatologia lieve. Il desametasone è stato somministrato ad una dose di 6 milligrammi al giorno e per un periodo di tempo limitato (10 giorni), sottolineando l'atteggiamento di cautela richiesto per l'uso di steroidi per via sistemica<sup>74</sup>.



**Figura 11.** Effetto del tocilizumab sulle condizioni respiratorie di pazienti ricoverati in terapia intensiva (a sinistra) o in reparto (a destra). Abbreviazioni: BRCCS=Brescia Covid-19 Respiratory Scale<sup>70</sup>. (Adattato da: *Toniati et al., Autoimmun Rev, 2020*).

## Conclusioni

Il riposizionamento dei farmaci rappresenta uno strumento potente per fronteggiare la Covid-19. Infatti, i farmaci riposizionati sono già testati per la loro sicurezza nella pratica clinica e, in alcuni casi, disponibili in grandi quantità ed economici. In assenza di cure efficaci, questo rappresenta l'unica strategia percorribile per il trattamento precoce dei pazienti, per evitare condizioni di pericolo di vita e per curare efficacemente non solo pazienti moderati ma anche affetti in maniera grave.

## References

- 1 Tu, Y. F. *et al.* A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21072657 (2020).
- 2 Delanghe, J. R., Speeckaert, M. M. & De Buyzere, M. L. The host's angiotensin-converting enzyme polymorphism may explain epidemiological findings in COVID-19 infections. *Clin Chim Acta* **505**, 192-193, doi:10.1016/j.cca.2020.03.031 (2020).
- 3 Nguyen, A. *et al.* Human leukocyte antigen susceptibility map for SARS-CoV-2. *J Virol*, doi:10.1128/JVI.00510-20 (2020).
- 4 Chakrabarti, S. S. *et al.* COVID-19 in India: Are Biological and Environmental Factors Helping to Stem the Incidence and Severity? *Aging Dis* **11**, 480-488, doi:10.14336/AD.2020.0402 (2020).
- 5 Gordon, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2286-9 (2020).
- 6 Su, T. P., Su, T. C., Nakamura, Y. & Tsai, S. Y. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends Pharmacol Sci* **37**, 262-278, doi:10.1016/j.tips.2016.01.003 (2016).
- 7 Abate, C., Niso, M. & Berardi, F. Sigma-2 receptor: past, present and perspectives on multiple therapeutic exploitations. *Future Med Chem* **10**, 1997-2018, doi:10.4155/fmc-2018-0072 (2018).
- 8 Chu, H. *et al.* Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis*, doi:10.1093/cid/ciaa410 (2020).

- 9 Ziegler, C. G. K. *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* **181**, 1016-1035 e1019, doi:10.1016/j.cell.2020.04.035 (2020).
- 10 Klinkhammer, J. *et al.* IFN-lambda prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.33354 (2018).
- 11 Lazear, H. M., Schoggins, J. W. & Diamond, M. S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* **50**, 907-923, doi:10.1016/j.immuni.2019.03.025 (2019).
- 12 Dinnon, K. H. *et al.* A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID-19 medical countermeasures. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.05.06.081497 (2020).
- 13 Mulangu, S. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Ebola Virus Disease Therapeutics. *N Engl J Med* **381**, 2293-2303, doi:10.1056/NEJMoa1910993 (2019).
- 14 Sheahan, T. P. *et al.* Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci Transl Med* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aal3653 (2017).
- 15 Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* **30**, 269-271, doi:10.1038/s41422-020-0282-0 (2020).
- 16 Yin, W. *et al.* Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, doi:10.1126/science.abc1560 (2020).
- 17 Sheahan, T. P. *et al.* An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med* **12**, doi:10.1126/scitranslmed.abb5883 (2020).
- 18 Grein, J., Myers, R. P. & Brainard, D. Compassionate Use of Remdesivir in Covid-19. Reply. *N Engl J Med* **382**, e101, doi:10.1056/NEJMc2015312 (2020).
- 19 Wang, Y. *et al.* Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* **395**, 1569-1578, doi:10.1016/S0140-6736(20)31022-9 (2020).
- 20 Babusis, D. *et al.* Sofosbuvir and Ribavirin Liver Pharmacokinetics in Patients Infected with Hepatitis C Virus. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, doi:10.1128/AAC.02587-17 (2018).
- 21 Mugwanya, K. K. & Baeten, J. M. Safety of oral tenofovir disoproxil fumarate-based pre-exposure prophylaxis for HIV prevention. *Expert Opin Drug Saf* **15**, 265-273, doi:10.1517/14740338.2016.1128412 (2016).
- 22 De Clercq, E. New Nucleoside Analogues for the Treatment of Hemorrhagic Fever Virus Infections. *Chem Asian J* **14**, 3962-3968, doi:10.1002/asia.201900841 (2019).
- 23 Lalezari, J. *et al.* IDX184 in combination with pegylated interferon-alpha2a and ribavirin for 2 weeks in treatment-naive patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* **18**, 755-764, doi:10.3851/IMP2552 (2013).
- 24 Elfiky, A. A. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. *Life Sci* **253**, 117592, doi:10.1016/j.lfs.2020.117592 (2020).
- 25 Cai, Q. *et al.* Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering (Beijing)*, doi:10.1016/j.eng.2020.03.007 (2020).
- 26 Rhodes, D. & Lipps, H. J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res* **43**, 8627-8637, doi:10.1093/nar/gkv862 (2015).
- 27 Puig Lombardi, E., Londono-Vallejo, A. & Nicolas, A. Relationship Between G-Quadruplex Sequence Composition in Viruses and Their Hosts. *Molecules* **24**, doi:10.3390/molecules24101942 (2019).

- 28 Kusov, Y., Tan, J., Alvarez, E., Enjuanes, L. & Hilgenfeld, R. A G-quadruplex-binding macrodomain within the "SARS-unique domain" is essential for the activity of the SARS-coronavirus replication-transcription complex. *Virology* **484**, 313-322, doi:10.1016/j.virol.2015.06.016 (2015).
- 29 Panera, N., Tozzi, A. E. & Alisi, A. The G-Quadruplex/Helicase World as a Potential Antiviral Approach Against COVID-19. *Drugs* **80**, 941-946, doi:10.1007/s40265-020-01321-z (2020).
- 30 Tanner, J. A. *et al.* The adamantane-derived bananins are potent inhibitors of the helicase activities and replication of SARS coronavirus. *Chem Biol* **12**, 303-311, doi:10.1016/j.chembiol.2005.01.006 (2005).
- 31 Shum, K. T. & Tanner, J. A. Differential inhibitory activities and stabilisation of DNA aptamers against the SARS coronavirus helicase. *ChemBiochem* **9**, 3037-3045, doi:10.1002/cbic.200800491 (2008).
- 32 Cao, B. *et al.* A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med* **382**, 1787-1799, doi:10.1056/NEJMoa2001282 (2020).
- 33 Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280 e278, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052 (2020).
- 34 Rahman, N. *et al.* Virtual Screening of Natural Products against Type II Transmembrane Serine Protease (TMPRSS2), the Priming Agent of Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Molecules* **25**, doi:10.3390/molecules25102271 (2020).
- 35 Bourliere, M. *et al.* Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *N Engl J Med* **376**, 2134-2146, doi:10.1056/NEJMoa1613512 (2017).
- 36 Afdhal, N. *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **370**, 1483-1493, doi:10.1056/NEJMoa1316366 (2014).
- 37 Chen, Y. W., Yiu, C. B. & Wong, K. Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL (pro)) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. *F1000Res* **9**, 129, doi:10.12688/f1000research.22457.2 (2020).
- 38 de Miguel, R., Montejano, R., Stella-Ascariz, N. & Arribas, J. R. A safety evaluation of raltegravir for the treatment of HIV. *Expert Opin Drug Saf* **17**, 217-223, doi:10.1080/14740338.2018.1411903 (2018).
- 39 Khan, R. J. *et al.* Targeting SARS-CoV-2: a systematic drug repurposing approach to identify promising inhibitors against 3C-like proteinase and 2'-O-ribose methyltransferase. *J Biomol Struct Dyn*, 1-14, doi:10.1080/07391102.2020.1753577 (2020).
- 40 Zhang, L. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved alpha-ketoamide inhibitors. *Science* **368**, 409-412, doi:10.1126/science.abb3405 (2020).
- 41 Noguchi, N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Arch Biochem Biophys* **595**, 109-112, doi:10.1016/j.abb.2015.10.024 (2016).
- 42 Jin, Z. *et al.* Structure of M(pro) from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**, 289-293, doi:10.1038/s41586-020-2223-y (2020).
- 43 Ngo, S. T., Quynh Anh Pham, N., Thi Le, L., Pham, D. H. & Vu, V. V. Computational Determination of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. *J Chem Inf Model*, doi:10.1021/acs.jcim.0c00491 (2020).
- 44 Ou, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* **11**, 1620, doi:10.1038/s41467-020-15562-9 (2020).

- 45 Hoffmann, M. *et al.* Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, doi:10.1128/AAC.00754-20 (2020).
- 46 Liu, T., Luo, S., Libby, P. & Shi, G. P. Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. *Pharmacol Ther*, 107587, doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107587 (2020).
- 47 Wagstaff, K. M., Rawlinson, S. M., Hearps, A. C. & Jans, D. A. An AlphaScreen(R)-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *J Biomol Screen* **16**, 192-200, doi:10.1177/1087057110390360 (2011).
- 48 Tay, M. Y. *et al.* Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res* **99**, 301-306, doi:10.1016/j.antiviral.2013.06.002 (2013).
- 49 Gotz, V. *et al.* Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import. *Sci Rep* **6**, 23138, doi:10.1038/srep23138 (2016).
- 50 Lundberg, L. *et al.* Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication. *Antiviral Res* **100**, 662-672, doi:10.1016/j.antiviral.2013.10.004 (2013).
- 51 Mastrangelo, E. *et al.* Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J Antimicrob Chemother* **67**, 1884-1894, doi:10.1093/jac/dks147 (2012).
- 52 Timani, K. A. *et al.* Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res* **114**, 23-34, doi:10.1016/j.virusres.2005.05.007 (2005).
- 53 Frieman, M. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J Virol* **81**, 9812-9824, doi:10.1128/JVI.01012-07 (2007).
- 54 Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A. & Wagstaff, K. M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* **178**, 104787, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104787 (2020).
- 55 Ben-Zvi, I., Kivity, S., Langevitz, P. & Shoenfeld, Y. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* **42**, 145-153, doi:10.1007/s12016-010-8243-x (2012).
- 56 Tonnesmann, E., Kandolf, R. & Lewalter, T. Chloroquine cardiomyopathy - a review of the literature. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **35**, 434-442, doi:10.3109/08923973.2013.780078 (2013).
- 57 Savarino, A. & Shtaj, I. L. Chloroquine and beyond: exploring anti-rheumatic drugs to reduce immune hyperactivation in HIV/AIDS. *Retrovirology* **12**, 51, doi:10.1186/s12977-015-0178-0 (2015).
- 58 Rebecca, V. W. & Amaravadi, R. K. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene* **35**, 1-11, doi:10.1038/onc.2015.99 (2016).
- 59 Gautret, P. *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*, 105949, doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105949 (2020).
- 60 Fantini, J., Di Scala, C., Chahinian, H. & Yahi, N. Structural and molecular modelling studies reveal a new mechanism of action of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 infection. *Int J Antimicrob Agents* **55**, 105960, doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105960 (2020).
- 61 Fantini, J., Chahinian, H. & Yahi, N. Synergistic antiviral effect of hydroxychloroquine and azithromycin in combination against SARS-CoV-2: What

- molecular dynamics studies of virus-host interactions reveal. *Int J Antimicrob Agents*, 106020, doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106020 (2020).
- 62 Zhu, Z. *et al.* Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J Infect* **81**, e21-e23, doi:10.1016/j.jinf.2020.03.060 (2020).
- 63 Pai, V. B. & Nahata, M. C. Nelfinavir mesylate: a protease inhibitor. *Ann Pharmacother* **33**, 325-339, doi:10.1345/aph.18089 (1999).
- 64 Musarrat, F. *et al.* The anti-HIV drug nelfinavir mesylate (Viracept) is a potent inhibitor of cell fusion caused by the SARSCoV-2 spike (S) glycoprotein warranting further evaluation as an antiviral against COVID-19 infections. *J Med Virol*, doi:10.1002/jmv.25985 (2020).
- 65 Xia, S. *et al.* A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv* **5**, eaav4580, doi:10.1126/sciadv.aav4580 (2019).
- 66 Xia, S. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res* **30**, 343-355, doi:10.1038/s41422-020-0305-x (2020).
- 67 Kaly, L. & Rosner, I. Tocilizumab - a novel therapy for non-organ-specific autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **26**, 157-165, doi:10.1016/j.berh.2012.01.001 (2012).
- 68 Colaneri, M. *et al.* Tocilizumab for Treatment of Severe COVID-19 Patients: Preliminary Results from SMAteo COvid19 REgistry (SMACORE). *Microorganisms* **8**, doi:10.3390/microorganisms8050695 (2020).
- 69 Xu, X. *et al.* Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 10970-10975, doi:10.1073/pnas.2005615117 (2020).
- 70 Toniati, P. *et al.* Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: A single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmun Rev* **19**, 102568, doi:10.1016/j.autrev.2020.102568 (2020).
- 71 Li, H. *et al.* Impact of corticosteroid therapy on outcomes of persons with SARS-CoV-2, SARS-CoV, or MERS-CoV infection: a systematic review and meta-analysis. *Leukemia* **34**, 1503-1511, doi:10.1038/s41375-020-0848-3 (2020).
- 72 Iwabuchi, K. *et al.* Therapeutic potential of ciclesonide inhalation for COVID-19 pneumonia: Report of three cases. *J Infect Chemother* **26**, 625-632, doi:10.1016/j.jiac.2020.04.007 (2020).
- 73 Wang, Y. *et al.* A retrospective cohort study of methylprednisolone therapy in severe patients with COVID-19 pneumonia. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 57, doi:10.1038/s41392-020-0158-2 (2020).
- 74 Ledford, H. Coronavirus breakthrough: dexamethasone is first drug shown to save lives. *Nature* **582**, 469, doi:10.1038/d41586-020-01824-5 (2020).