



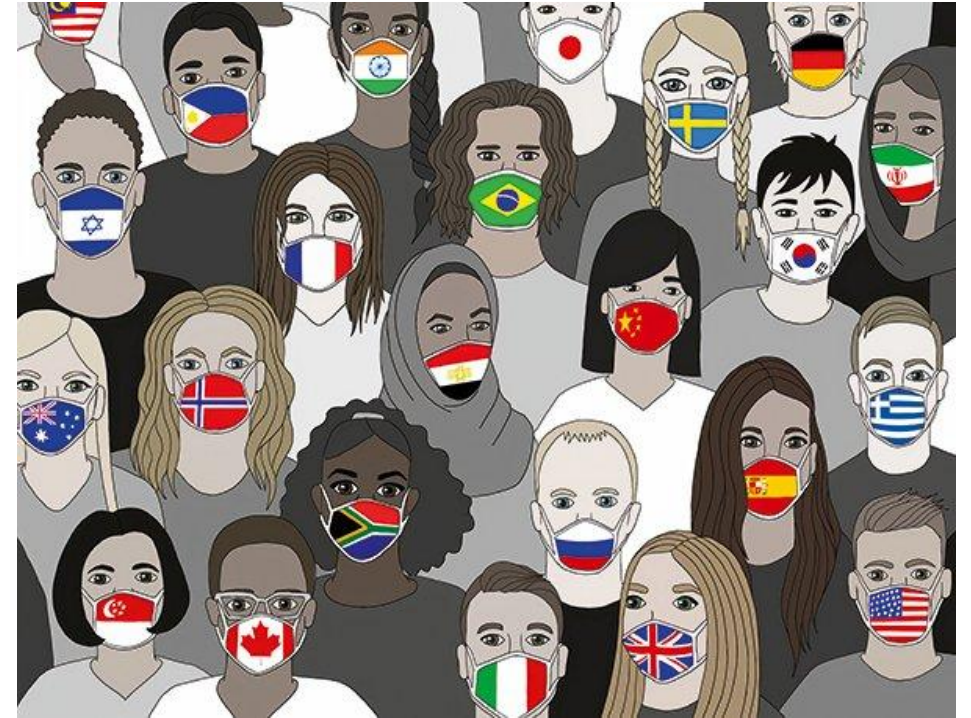
Από το acyclovir στο raxlovid: η συμβολή της Φαρμακευτικής Χημείας στην επείγουσα αντιμετώπιση του κορωνοϊού.

Η συσσωρευμένη γνώση από την ανάπτυξη προηγούμενων αντι-ϊικών φαρμάκων επιτάχυνε την θεραπευτική αντιμετώπιση της λοίμωξης από τον SARS-CoV2.

Η πρόσφατη πανδημία παρουσίασε σημαντική θνησιμότητα κυρίως στις ευπαθείς ομάδες, λόγω ανάπτυξης του συνδρόμου **Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV2)**. Ο παθογόνος ιός που απομονώθηκε στη Wuhan, (China 12/2019) προσβάλλει και μεταδίδεται εύκολα από το αναπνευστικό.

Η ασθένεια χαρακτηρίστηκε ως η σοβαρότερη απειλή κατά της υγείας του ανθρώπου τον τρέχοντα αιώνα: 6 000 000 θάνατοι (στην οξεία φάση - μέχρι 3/2022) - οι κοινωνικές, οικονομικές και γεωπολιτικές επιπτώσεις της πανδημίας δεν έχουν ακόμη εκτιμηθεί πλήρως.

Στην οικογένεια **Coronaviridae** ανήκουν τρεις παθογόνοι ιοί: ο **SARS-CoV**, ο **MERS CoV** (σύνδρομο **Middle East Respiratory Syndrome**) και ο **SARS-CoV2**.



Αντίθετα με τους προηγούμενους κορωνοϊούς που προκαλούν περιορισμένες λοιμώξεις και επανεμφανίζονται σποραδικά, ο SARS-CoV-2 είχε εξ αρχής απειλητικά χαρακτηριστικά και **η πανδημία φάνηκε ότι θα διαρκέσει**. Αργότερα, ο ιός εντάχθηκε στα συνήθη παθογόνα και παρασιτεί στον άνθρωπο (ενδημικός). **η**

Η μελλοντική εμφάνιση ενός επόμενου παθογόνου ιού της ίδιας οικογένειας είναι πολύ πιθανή και μπορεί να προκύψει από τις δεξαμενές των άγριων ζώων.



Η κατάσταση έκτακτης ανάγκης έληξε στις 5/5/2023 (ΠΟΥ).

Η κλιματική αλλαγή τροποποιεί την αλληλεπίδραση ανθρώπων-ζώων και ευνοεί την ανάπτυξη και διασπορά ζώων και εντόμων, διευκολύνοντας τη μετάδοση των ιών.

Έχουν προκύψει ισχυρές ενδείξεις για τη προέλευση της πανδημίας από το εμπόριο αγρίων ζώων στις αγορές της Κίνας.

Η προετοιμασία και ο προγραμματισμός δράσεων για τη **διατήρηση της υγείας του ανθρώπου και ολόκληρου του οικοσυστήματος** είναι απαραίτητη.



2020: Η ταχύρρυθμη ανάπτυξη εμβολίων και φαρμάκων ήταν σημαντική επιστημονική πρόκληση

Drug Discovery & Development Pipeline



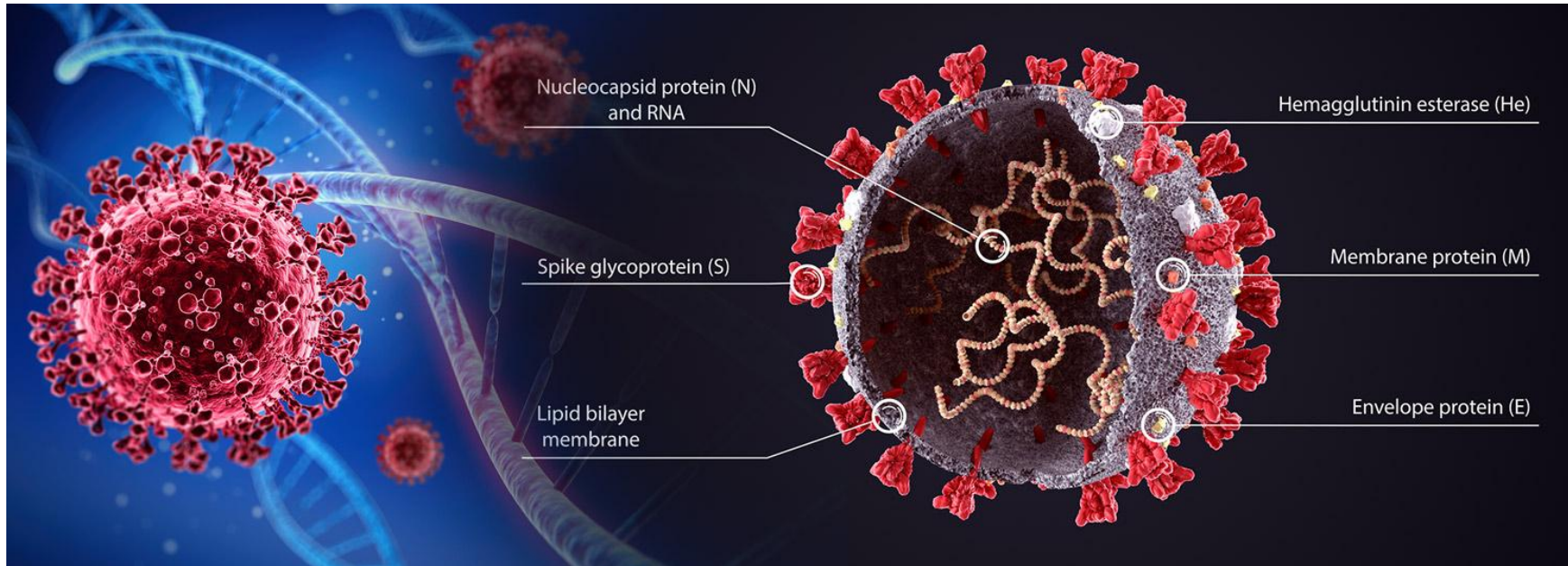
Η εισαγωγή των εμβολίων μείωσε θεαματικά:

- κρούσματα
- εισαγωγές στο νοσοκομείο
- θνησιμότητα

Η ενδεχόμενη εμφάνιση νέων στελεχών και η μειωμένη απόκριση του ανοσοποιητικού στις ευπαθείς ομάδες απαιτούν τη παράλληλη παρουσία αποτελεσματικών αντιϊικών φαρμάκων.

Target selection / validation

Η επιλογή του στόχου για την έναρξη της μακράς και κοστοβόρου διαδικασίας ανάπτυξης φαρμάκου είναι κομβικής σημασίας. Όλα τα ένζυμα που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού μεταβολισμού ή στον κύκλο ζωής του ιού, αποτελούν εν δυνάμει πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (**druggable targets**). Οι εγκεκριμένες SARS-CoV2 θεραπείες στοχεύουν **τον ιικό πολλαπλασιασμό**.



Οι κορωνοιοί διαθέτουν **φάκελο** και **(+)ssRNA**. **Μεταλλάσσονται εύκολα**: ενδεχόμενη ανάπτυξη μολυσματικότερων, ή ικανότερων διαφυγής από το ανοσοποιητικό στελεχών.

Η ταχεία ανάπτυξη αντοχής κατέστησε **αναποτελεσματικές τις θεραπείες με αντισώματα** (έναντι της **S** επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης), καθιστώντας ελκυστικότερα τα μικρά μόρια, που στοχεύουν πιο συντηρημένες πρωτεΐνες.

Μέγεθος γενετικού υλικού 30,000 νουκλεοτίδια → 29 πρωτεΐνες:

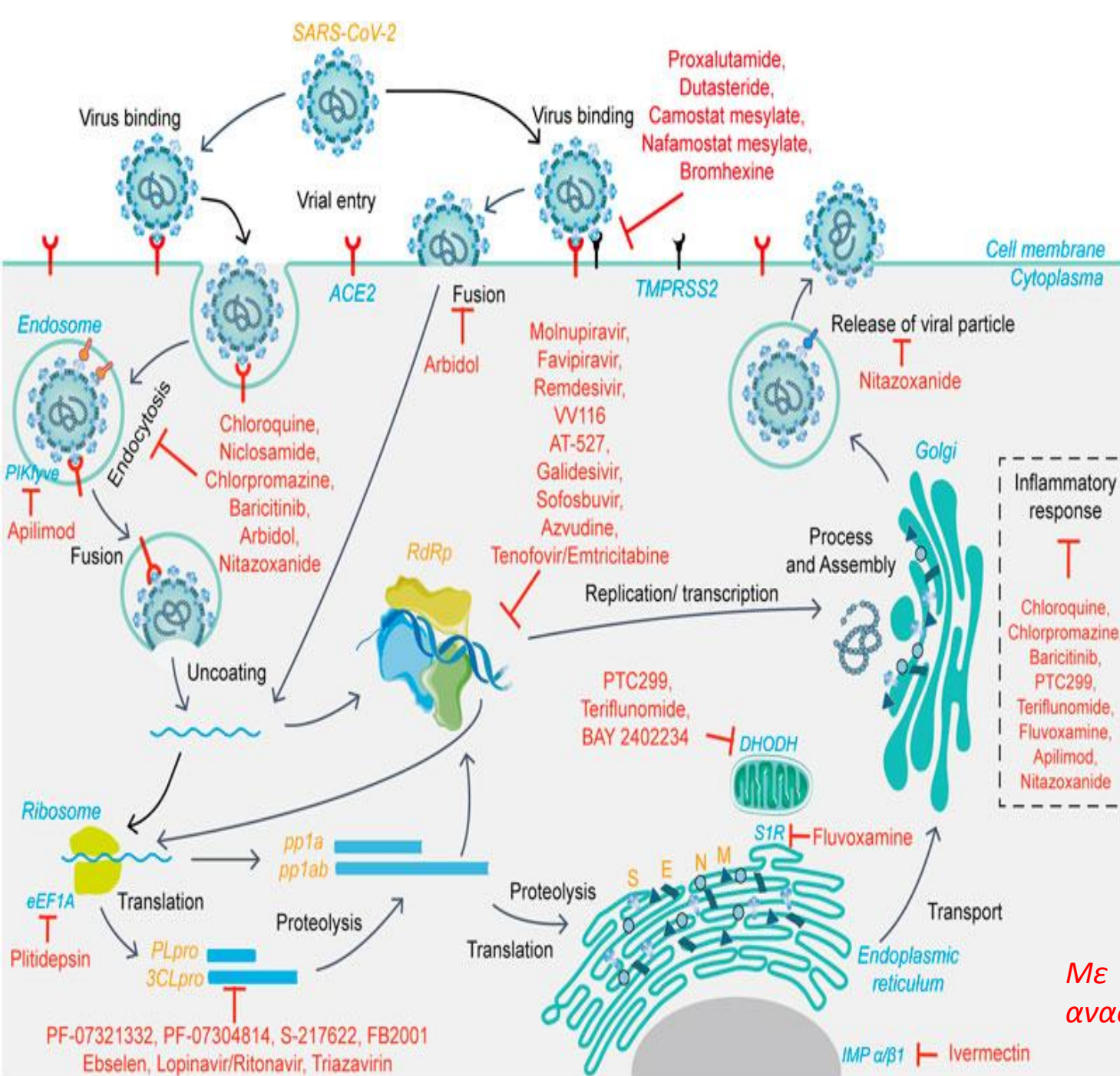
- **4 δομικές πρωτεΐνες** - συστατικά της ιικής κάψας
- **15 λειτουργικές πρωτεΐνες (non structural proteins, NSPs)** - ένζυμα που σχετίζονται με την ιική αναπαραγωγή
- **10 βοηθητικές πρωτεΐνες** - για την διαφυγή ή την αντιμετώπιση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

Θεραπευτικοί στόχοι στον κύκλο ζωής του SARS-CoV-2

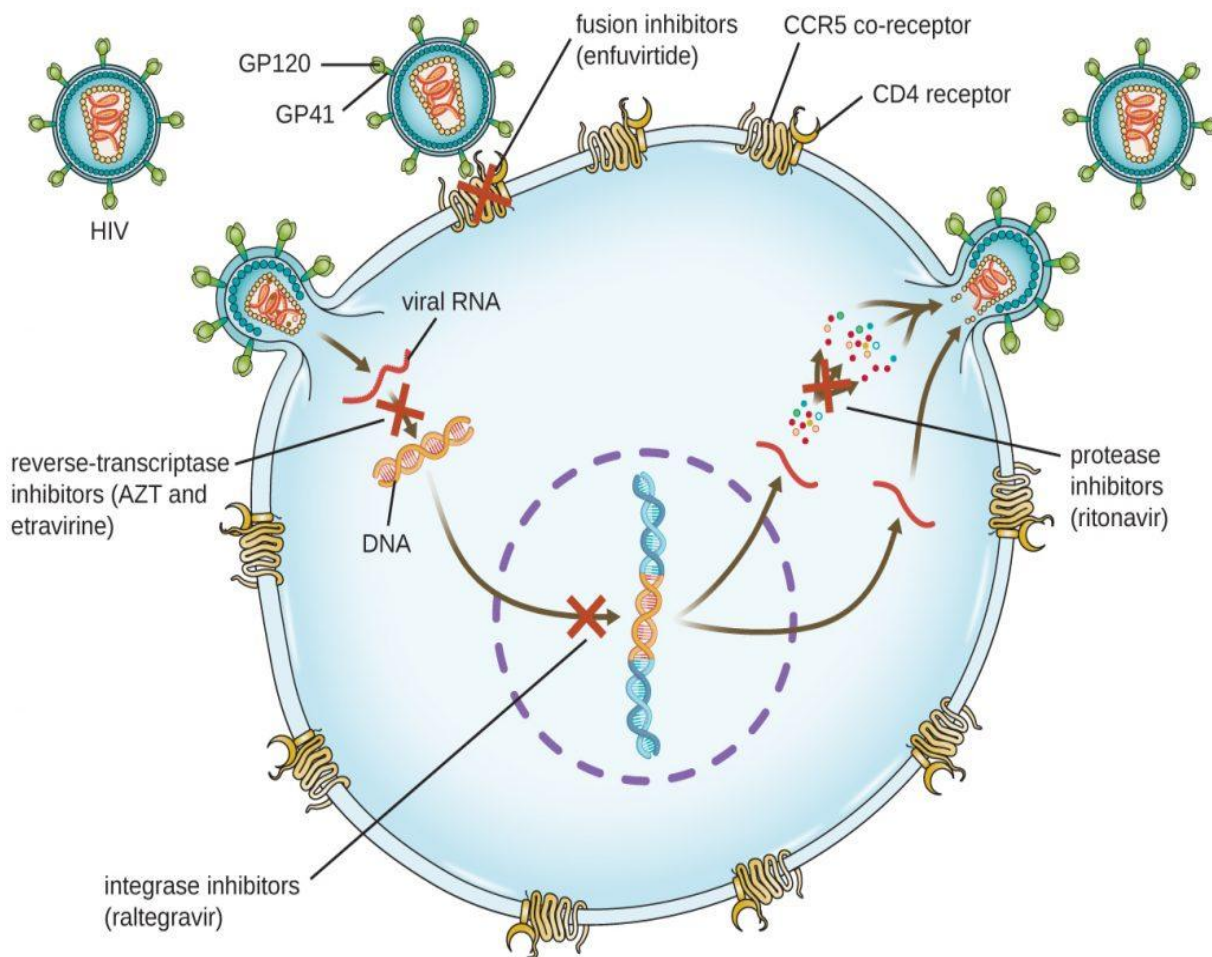
Προτεραιότητα στόχευσης δόθηκε στην αναστολή ενζύμων που αντιστοιχούν με πιστοποιημένους στόχους (**validated targets**) άλλων ιών. Η αποτελεσματικότητα ευρέως φάσματος εγκαθιστά **'target-class confidence'**. Η αξιοπιστία αυξάνεται αν είναι κατανοητός ο μηχανισμός δράσης και η σημασία του αποτελέσματος για την ιική αναπαραγωγή, *in vitro* και *in vivo*.

Τα εγκεκριμένα ή σε προχωρημένες κλινικές δοκιμές φάρμακα για τη θεραπεία του SARS-CoV-2 έχουν ως φαρμακευτικούς στόχους τα αρχικώς επιλεγμένα ιικά ένζυμα **RdRp** και **Mpro**. Αναμένεται να επικρατήσουν για τα επόμενα 3-5 χρόνια.

Με κόκκινο σημειώνονται ενώσεις που ελέγχονται ως αναστολείς διαφόρων σταδίων του κύκλου ζωής του SARS-CoV-2.



Περισσότερα από 90 αντιϊκά φάρμακα έχουν πάρει άδεια κυκλοφορίας για την αντιμετώπιση οξείας ή χρόνιας ιικής λοίμωξης.



Η ανάπτυξη αποτελεσματικής αντιϊκής θεραπείας άρχισε στη δεκαετία 1970-1980. **Ανακάλυψη του acyclovir.**

Το 1980-2000 στα πλαίσια της προσπάθειας για την αντιμετώπιση του **HIV** σημειώθηκε ραγδαία πρόοδος. Η επιτυχία της ART υπογράμμισε τα πλεονεκτήματα της χορήγησης συνδυαστικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων (**combination therapy**) έναντι της μονοθεραπείας.

Κατά την ανάπτυξη φαρμάκων έναντι του **HCV** εφαρμόσθηκαν εκ νέου ή αναθεωρήθηκαν οι διάφορες τεχνικές.

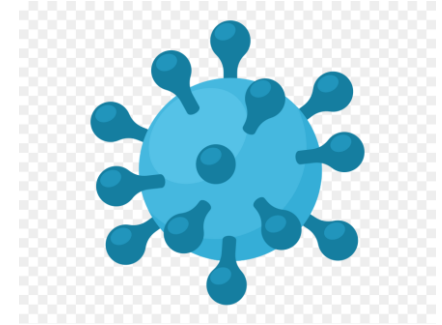
Πρόσφατα, η εντατική διεπιστημονική έρευνα σε ακαδημαϊκό χώρο και βιομηχανία έναντι του **SARS-CoV-2** συγκέντρωσε μεγάλο όγκο πληροφοριών που θα αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη των επόμενων αντιϊκών φαρμάκων.

Το ιδεώδες αντιϊικό φάρμακο αναστέλλει μια κρίσιμη και συντηρημένη ιική λειτουργία.

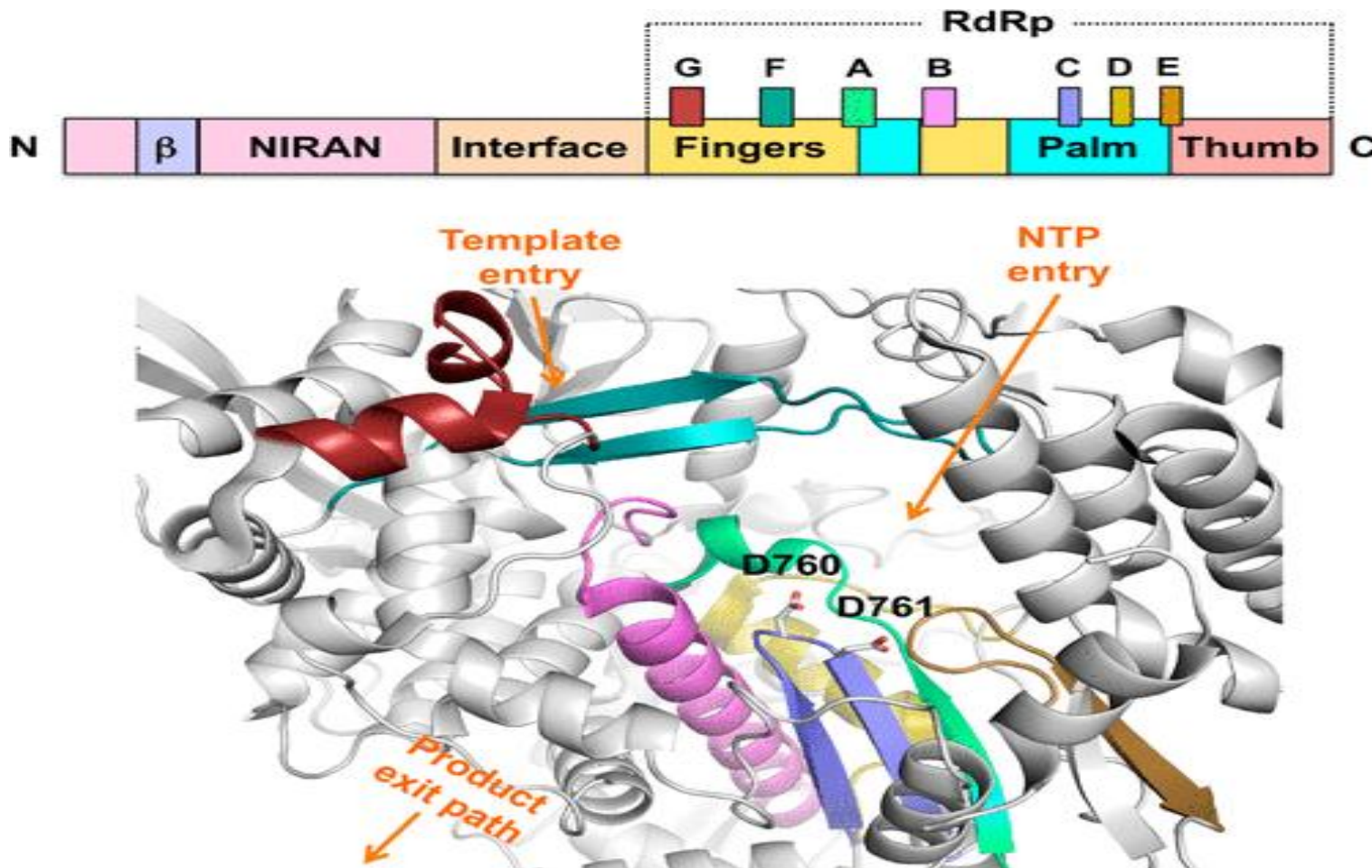
Προτιμάται μικρό μόριο με ελέγξιμες, βελτιστοποιημένες φ/χ, φ/κ και μεταβολικές ιδιότητες.

Στη διαδικασία ανάπτυξης αντιϊκών παραγώγων λαμβάνονται υπόψη ορισμένες βασικές αρχές, όπως:

- Έχουν λογικό θεραπευτικό εύρος. Η αγωγή μπορεί να είναι και προφυλακτική.
- Η βιοδιαθεσιμότητα ελέγχεται, ανάλογα με την οδό χορήγησης.
- Έχουν κατά προτίμηση ευρύ φάσμα δραστηριότητας (*in vitro* / *in vivo*)
- Προτιμάται η ανάπτυξη συνδυαστικών σχημάτων για μέγιστη αποτελεσματικότητα/πρόληψη αντοχής.



Αναστολείς της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp, nsr 12).



Δεν είναι τυχαία η ανάπτυξη πολλών αναστολέων των ιικών πολυμερασών και της παρουσίας τους ως βασικών συστατικών των θεραπευτικών σχημάτων.

Οι RdRp με σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και μεταγραφή των RNA ιών **διατηρούνται ισχυρά** κυρίως στο ενεργό τους κέντρο.

Δεν έχουν αντιστοιχία με ανθρώπινα ένζυμα.

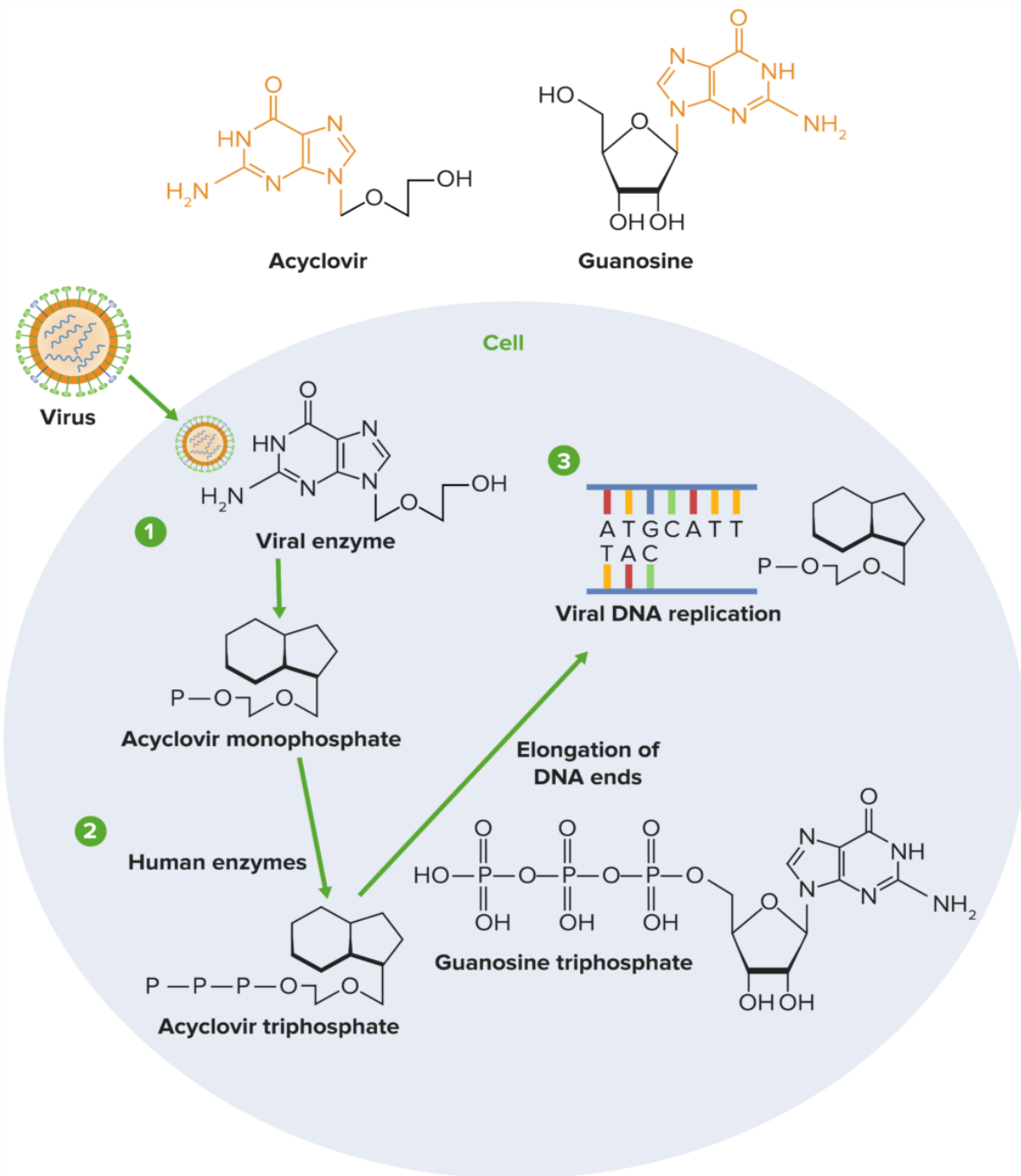
Τα διατηρημένα μοτίβα (A-G) του ενεργού κέντρου χρωματίζονται όπως στο διάγραμμα.
Τα καταλυτικά ασπαρτικά υπόλοιπα **D760** και **D761** συνδέονται με τα αντισταθμιστικά ιόντα.

A gold standard

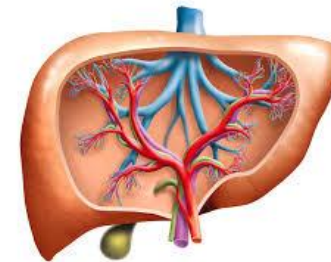
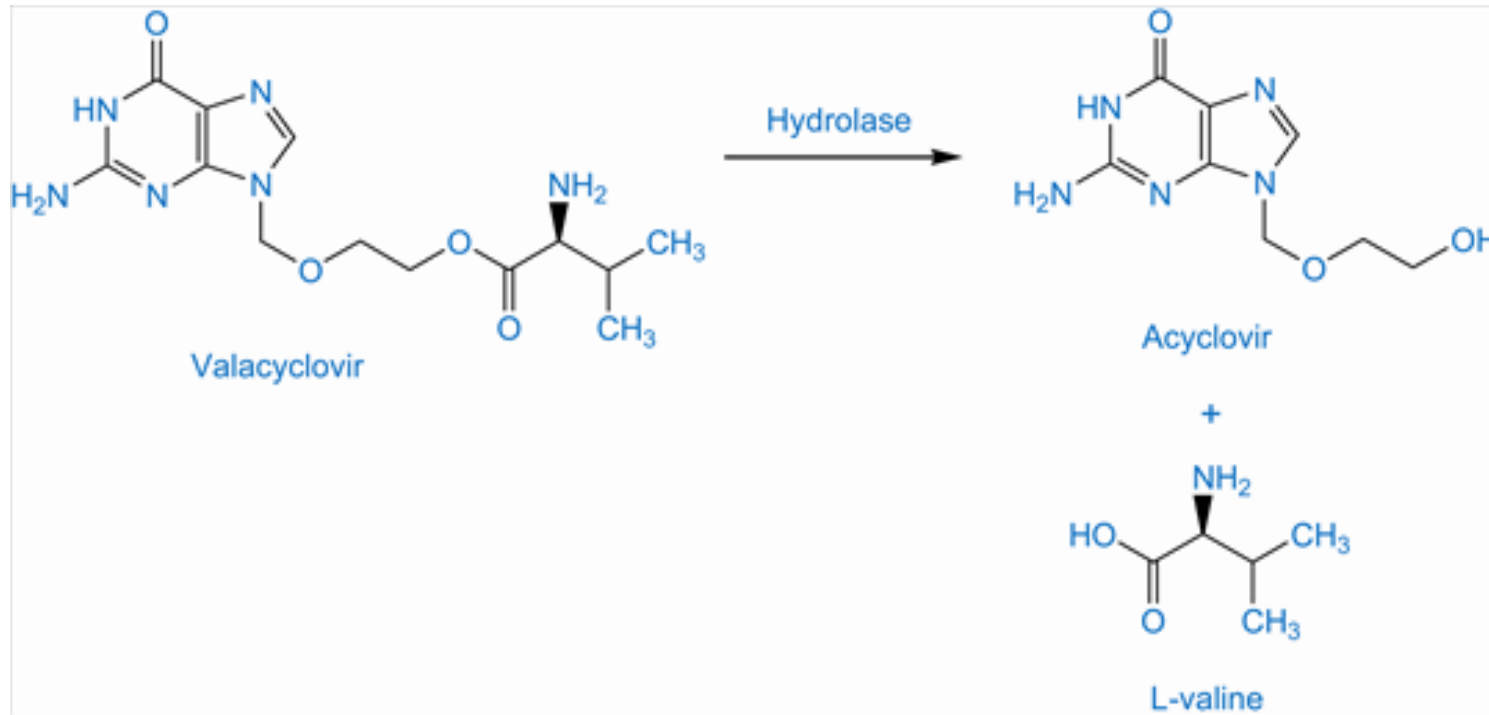
Το **Acyclovir**, συνθετικό «άκυκλο» ανάλογο της γουανοσίνης, υπήρξε το πρώτο συστηματικά χορηγούμενο αντιϊικό φάρμακο, έναντι μολύνσεων με DNA ερπητοϊούς (HSV-1, HSV-2, VZV).

Εισέρχεται στα κύτταρα αλλά **μόνο στα μολυσμένα** μετατρέπεται (με την ιική TK) στο αντίστοιχο μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο **(1)**. Από αυτό με διαδοχικές φωσφορυλιώσεις θα προκύψει το τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο **(3)** που αναγνωρίζεται ως ψευδές υπόστρωμα από την ιική **DdDp** και ενσωματώνεται στο ιικό νουκλεινικό οξύ. Δεν αναγνωρίζεται από τις ανθρώπινες DNA πολυμεράσες.

Καθώς το Acyclovir triphosphate δεν διαθέτει 3'-OH σταματά η επιμήκυνση της αλυσίδας του νουκλεϊνικού οξέος: δρα ως **chain terminator**.

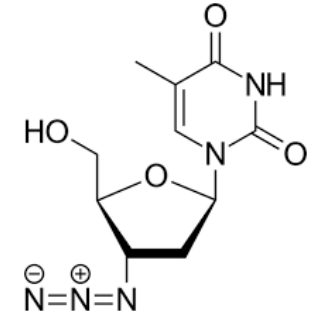


Μειονέκτημα: μέτρια φαρμακοκινητική συμπεριφορά



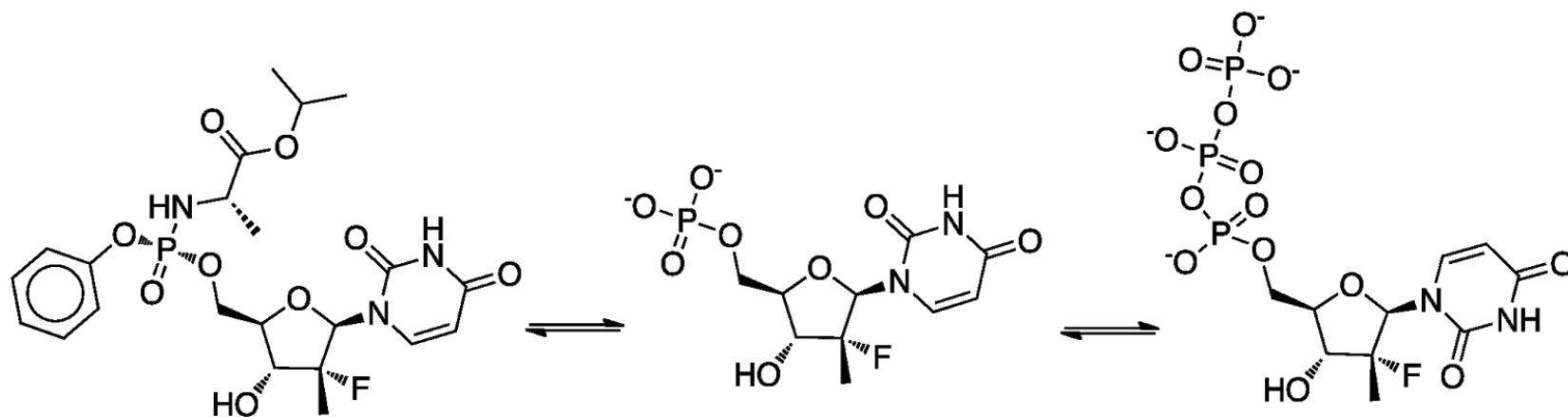
→ **Επιλύθηκε με την ανάπτυξη προφαρμάκων:** ο εστέρας με *L*-βαλίνη (valacyclovir) εισέρχεται στο κύτταρο (αναγνωρίζεται από μεταφορείς LAA), όπου αποδίδει ικανοποιητικά το φάρμακο και το *L*-αμινοξύ.

The diagram illustrates the effect of a modified base and modified ribose on RNA polymerase. On the left, the RNA strand contains a modified base (Y) and modified ribose (Z). The RNA polymerase is shown with a phosphate group (P) and a hydroxyl group (OH) on the ribose. An arrow indicates the reaction. On the right, the RNA strand is shown with the modified base (Y) and modified ribose (Z). The RNA polymerase is shown with a phosphate group (P) and a hydroxyl group (OH) on the ribose. The text "Alterations in base and/or ribose prevent incorporation of the next nucleotide" is present. The next nucleotide (BASE_{n+1}) is shown below the RNA strand, and the text "New nucleotide" is present.



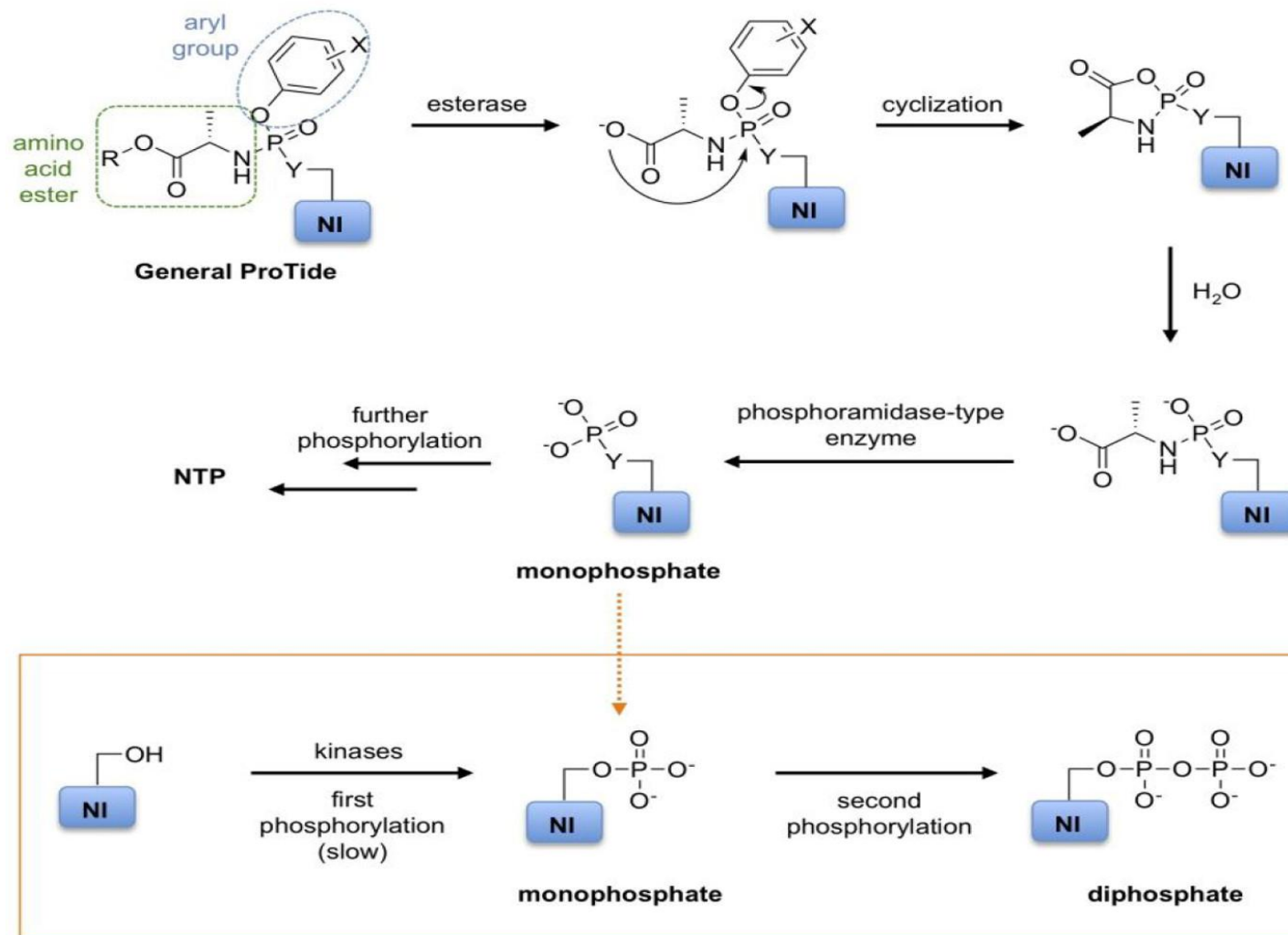
- **Υποχρωτικοί αναστολείς της επιμήκυνσης (obligate chain terminators):** όταν δεν διαθέτουν 3'-OH.
- **Μη υποχρωτικοί αναστολείς της επιμήκυνσης (nonobligate chain terminators):** αν και διαθέτουν 3'-OH, η διπλανή υποκατάσταση εμποδίζει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο.
- **Μεταλλαξιγόνοι παράγοντες:** όταν ενσωματωθούν προκαλούν λάθη σύνθεσης στη συμπληρωματική αλυσίδα (mismatch in base pairing), με αύξηση του ρυθμού μετάλλαξης που προκαλεί γονιδιωματική αστάθεια και μη βιώσιμα ιικά γονιδιώματα.

Η πρώτη φωσφορυλίωση είναι το *rate limiting step* της μεταβολικής ενεργοποίησης.

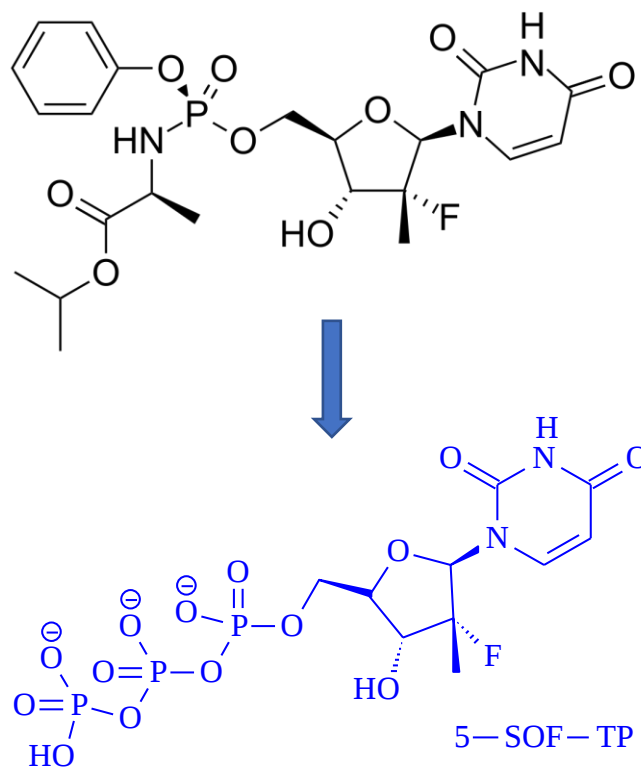


Σχεδιασμός προφαρμάκων ProTide (Prodrug nucleotide): είναι ουδέτερα φωσφοραμιδικά παράγωγα, που αναγνωρίζονται από τους μεταφορείς LAA και μεταβολίζονται ενδοκυτταρικά προς το αντίστοιχο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο.

Η τεχνική εφαρμόσθηκε επιτυχώς στην ανάπτυξη φαρμάκων έναντι της ηπατίτιδας.



Η ενζυμική υδρόλυση του εστέρα ακολουθείται από τη προσβολή του φωσφόρου και την απομάκρυνση φαινοξυανιόντος. Το ασταθές κυκλικό ενδιάμεσο υδρολύεται. Ο δεσμός **P-N διασπάται** από φωσφοραμιδάσες και εμφανίζεται το μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο (NMP) που θα μετατραπεί τελικά σε NTP.



Sofosbuvir: το φάρμακο που αποδέδειξε ότι η χρόνια ηπατίτιδα μπορεί να θεραπευθεί.

Νουκλεοτιδικό φωσφοραμιδικό παράγωγο ουριδίνης που λαμβάνεται από το στόμα και μετατρέπεται επιτυχώς εντός των ηπατικών κυττάρων στο αντίστοιχο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, που αναγνωρίζεται εκλεκτικά από την ιική RNA πολυμεράση. Είναι μη υποχρεωτικός chain terminator για το ιικό RNA.

Μεγάλο κόστος θεραπείας

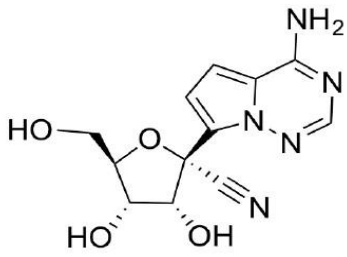


Αναστολείς της SARS-CoV-2 RdRp: ένα επιτυχές drug repurposing.

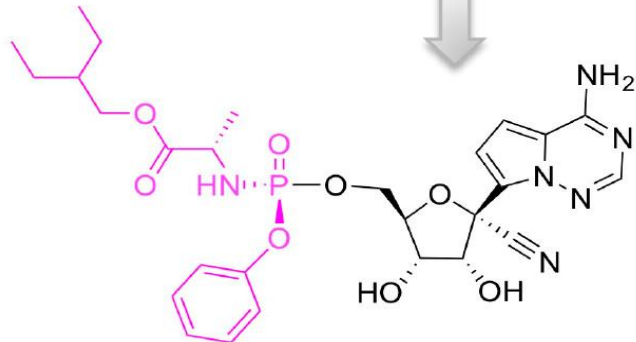
Το **Remdesivir** είναι αντίστοιχο νουκλεοτιδικό φωσφοραμιδικό παράγωγο με δράση ευρέως φάσματος έναντι RNA ιών (HCV, RSV, Ebola, SARS-CoV). Επιλέχθηκε

- για την επιτυχή απόδοση του δραστικού NMP in vivo
- την ισχύ και εκλεκτικότητα της αντιϊκής δράσης και
- την ευκολία λήψης καθαρού του δραστικού εναντιομερούς με κλασματική κρυστάλλωση (scale-up σύνθεση).

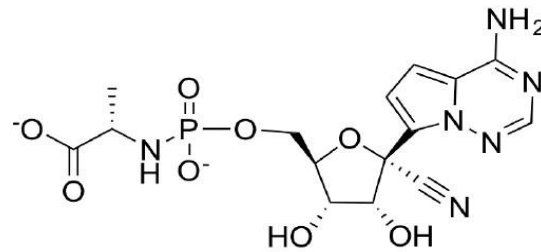
Τον **Οκτώβριο 2020** έλαβε άδεια κυκλοφορίας (FDA) ως **ενέσιμη θεραπεία ασθενών με SARS-CoV-2**. Αποτελεσματικό αν ληφθεί έγκαιρα (<7 ημέρες από την έναρξη συμπτωμάτων).



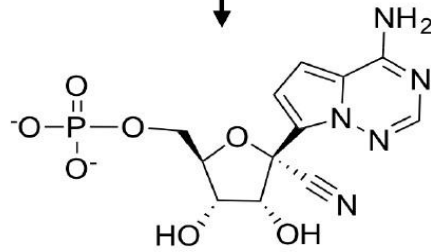
19



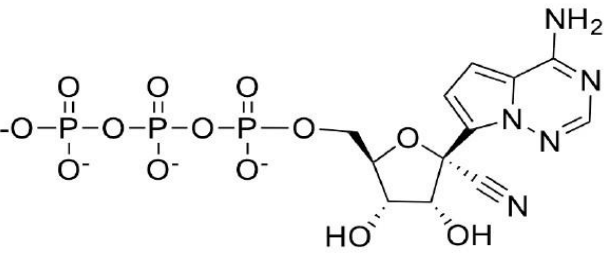
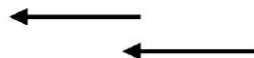
Remdesivir



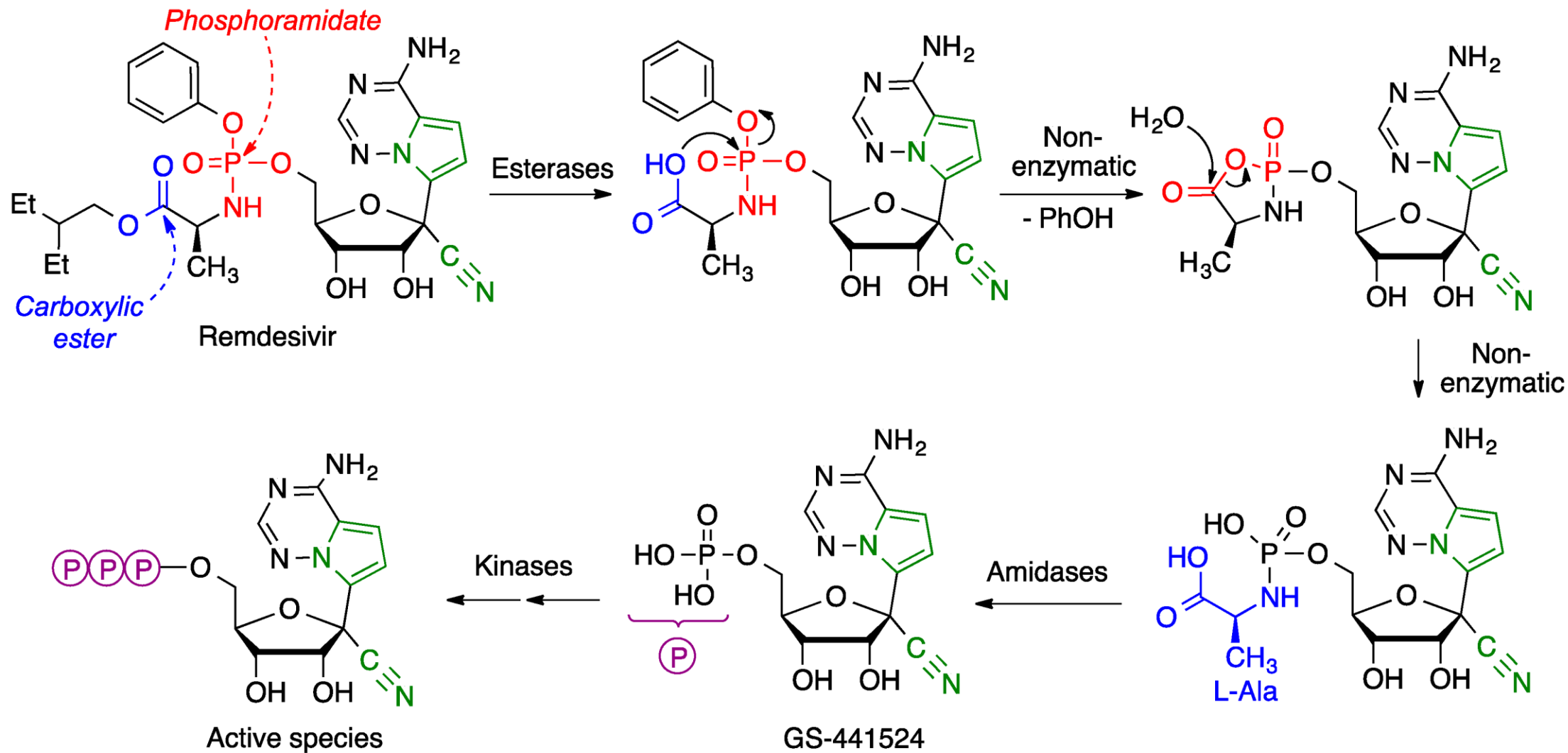
20



21



22

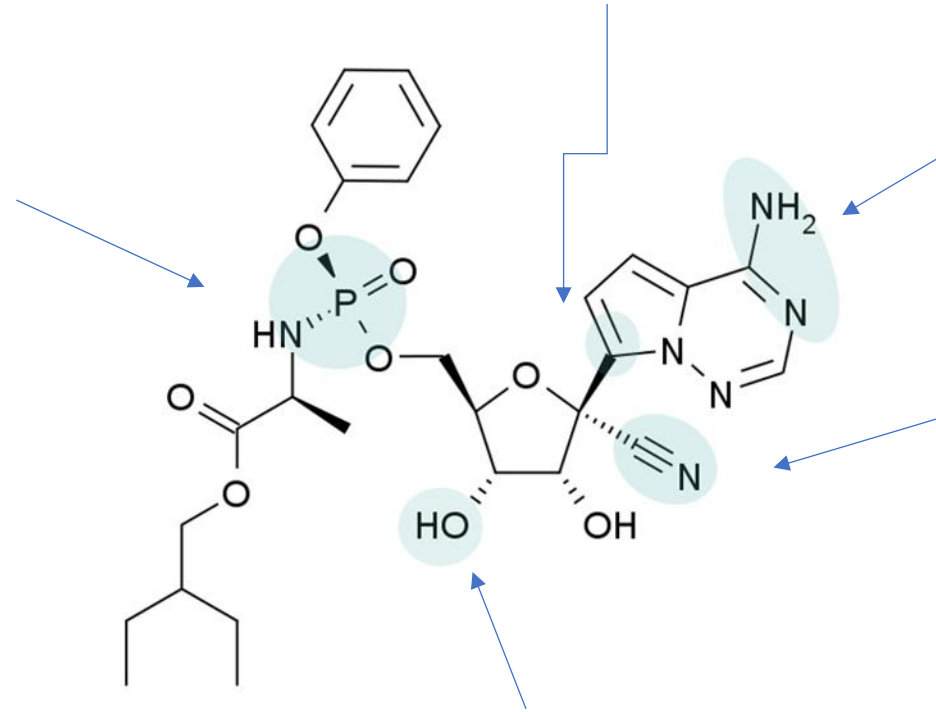


Μηχανισμός μεταβολικής ενεργοποίησης του Remdesivir

Φωσφοραμιδικό
προφάρμακο

C-νουκλεοζίτης

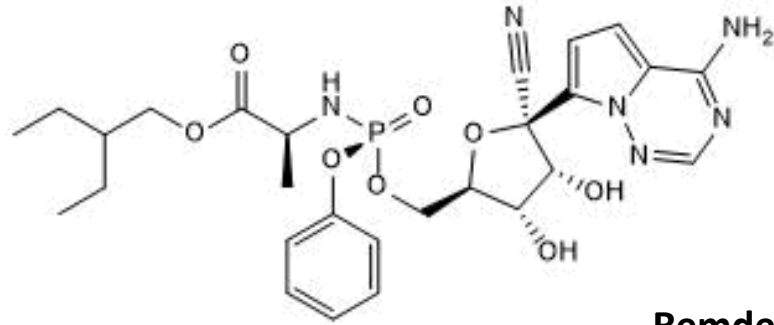
Η πυρρολοτριάζίνη είναι βιοϊσοστερής της αδενίνης. Η πρωτοταγής αμινομάδα δίπλα στο ετεροκυκλικό άζωτο αποτελεί μοτίβο αναγνώρισης και ανάπτυξης δH με την ουρακίλη



Η παρουσία του ογκώδους νιτριλίου στον 1'-C εμποδίζει τη μεταγραφή του ιικού RNA και μειώνει την αναγνώριση από τις ανθρώπινες RNA πολυμεράσες.

nonobligate chain terminator επιτρέπεται η προσθήκη 2 επιπρόσθετων νουκλεοτιδίων που προστατεύουν τον ενσωματωμένο αναστολέα από τη δράση επιδιορθωτικών ενζύμων

Σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά του Remdesivir



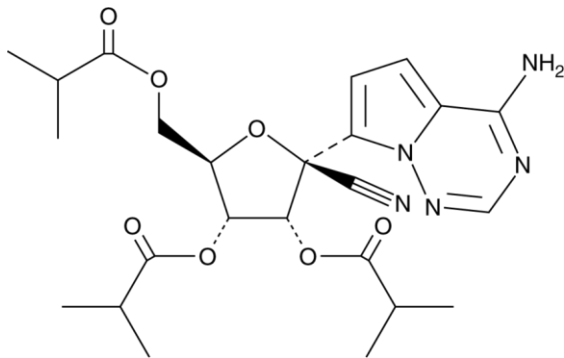
Remdesivir

Λόγω της ενδοφλέβιας χορήγησης το **remdesivir** περιορίζεται κυρίως σε ενδονοσοκομειακή χρήση.

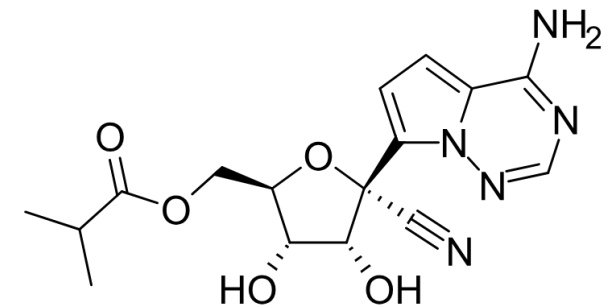
Στο επόμενο βήμα ελέγχονται κλινικά:

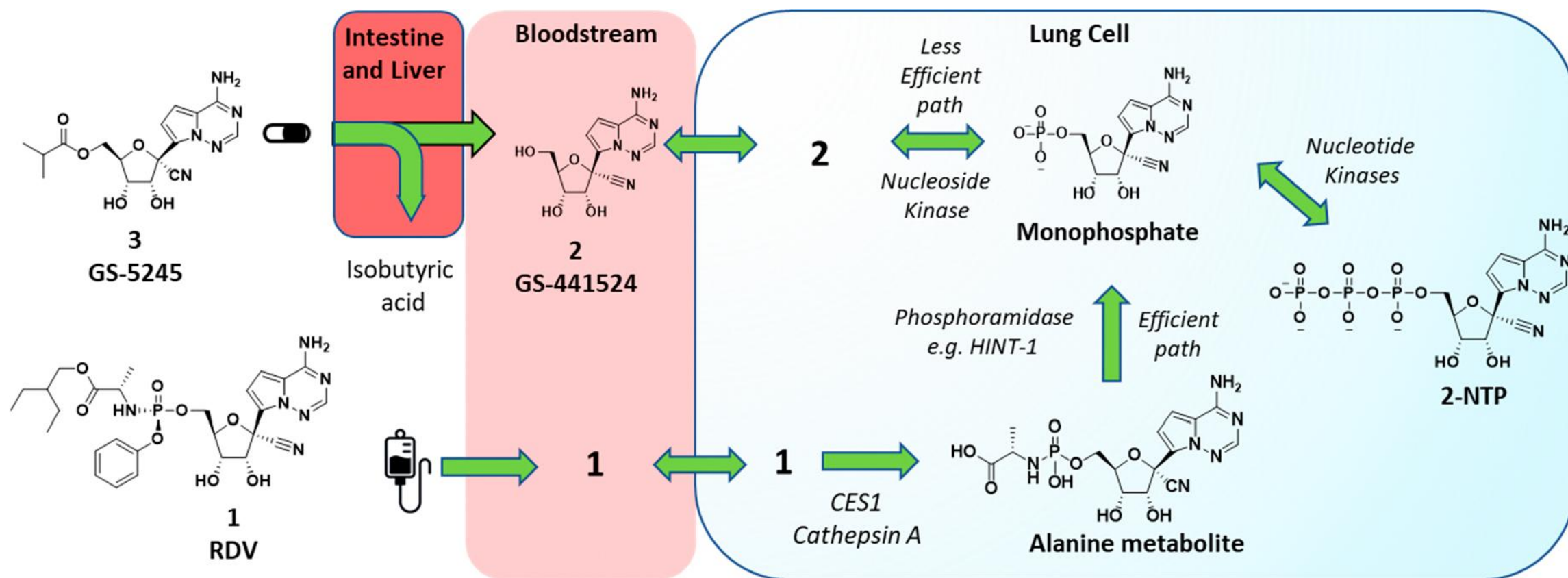
- Εισπνεόμενη φαρμακοτεχνική μορφή
- Η αποτελεσματικότητα της χορήγησης από του στόματος προφαρμάκων που αποδίδουν την ίδια δραστική.

**Mindeudesivir
(appr. China)**

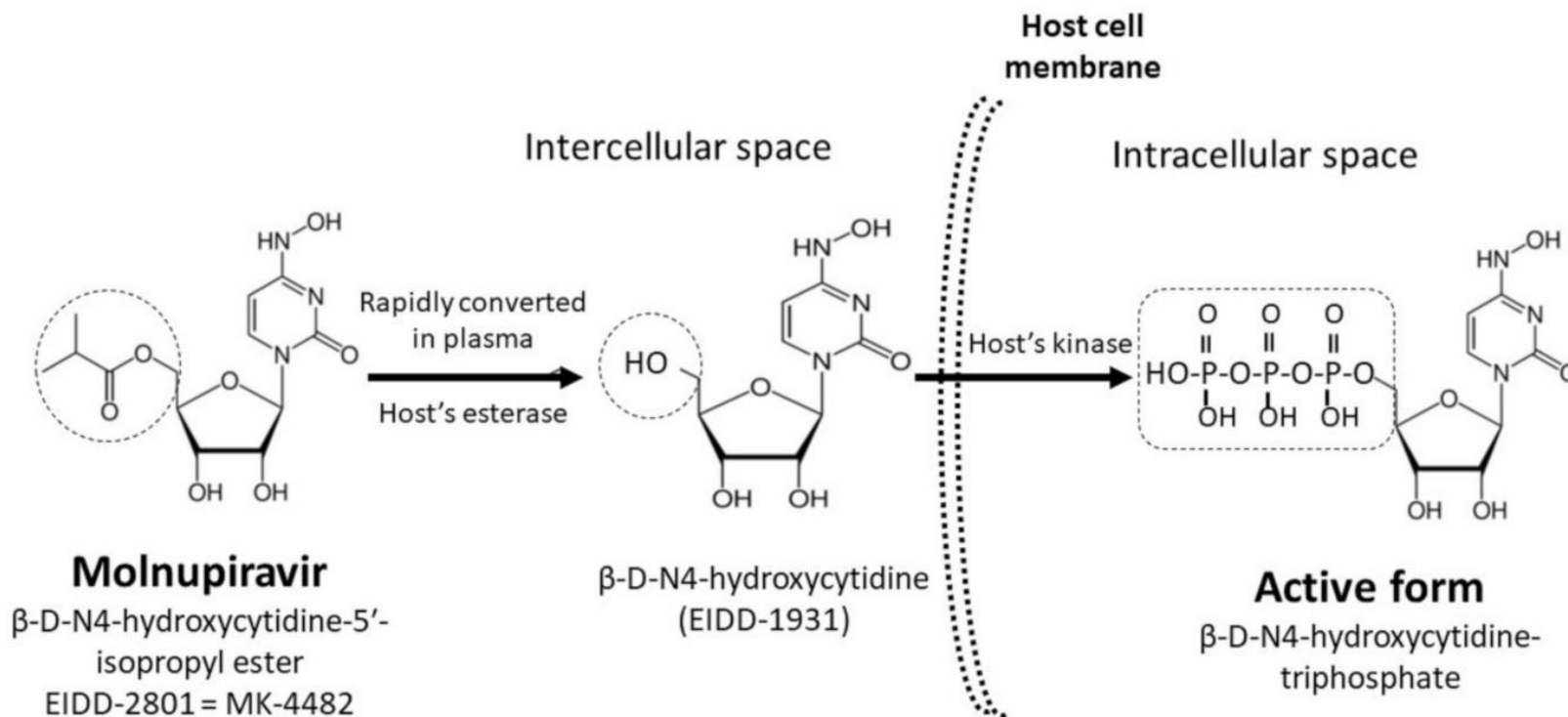


**Obeldesivir
(φάση III)**





Αναστολείς SARS-CoV-2 RdRp: Molnupiravir (Drug repurposing)



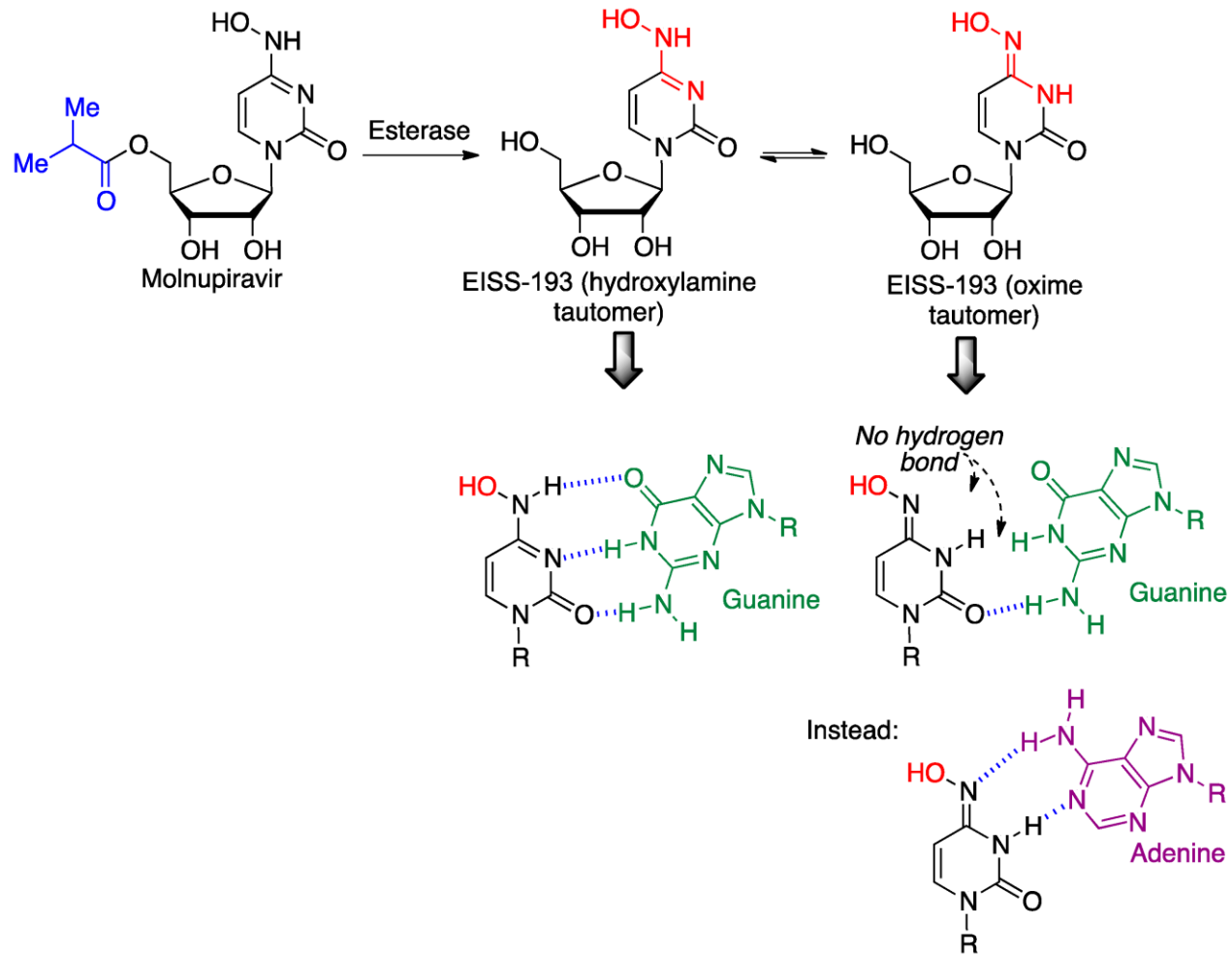
Φάρμακο για την influenza, με δράση ευρέως φάσματος έναντι RNA ιών.

Ο 5'-ισοβουτυρικός εστέρας του ριβονουκλεοζίτη της β -D-N4-υδροκυτιδίνης είναι **βιοδιαθέσιμο από το στόμα προφάρμακο του αντίστοιχου τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου**. Δρα ως μεταλλαξιογόνος παράγοντας.

Μετά από επιτυχείς κλινικές δοκιμές πήρε τον Δεκέμβριο 2021 άδεια κυκλοφορίας (FDA) ως θεραπεία από το στόμα για λοίμωξη από SARS-CoV-2.

Απαγορεύεται η χορήγηση του σε εγκύους.

Κίνδυνος επαγωγής μεταλλάξεων και δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών.



Σημαντικός μηχανισμός για τη συσσώρευση μεταλλάξεων είναι η ταυτομέρεια.

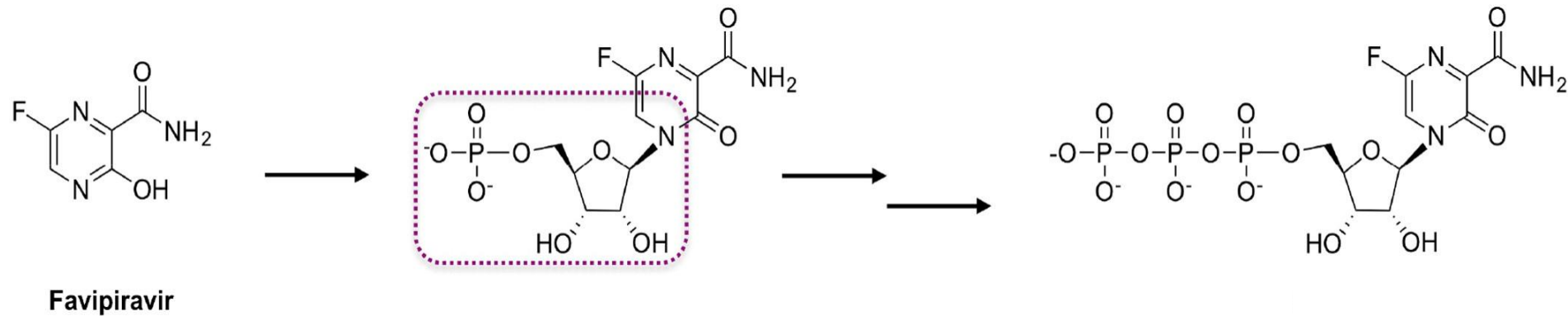
Το Molupiravir βρίσκεται σε δύο ταυτομερείς δομές:

- ως υδροξυλαμίνη σχηματίζει ζεύγος με γουανίνη
- ως οξίμη σχηματίζει ζεύγος με αδενίνη

Εάν υπερισχύσει η ταυτομερής δομή οξίμης, στη συμπληρωματική αλυσίδα τοποθετείται αντί νουκλεοτιδίου γουανίνης νουκλεοτίδιο αδενίνης.

Nat. Struct. Mol. Biol. 28, 706–708, 2021

Αναστολείς SARS-CoV-2 RdRp: Favipiravir (Drug repurposing)

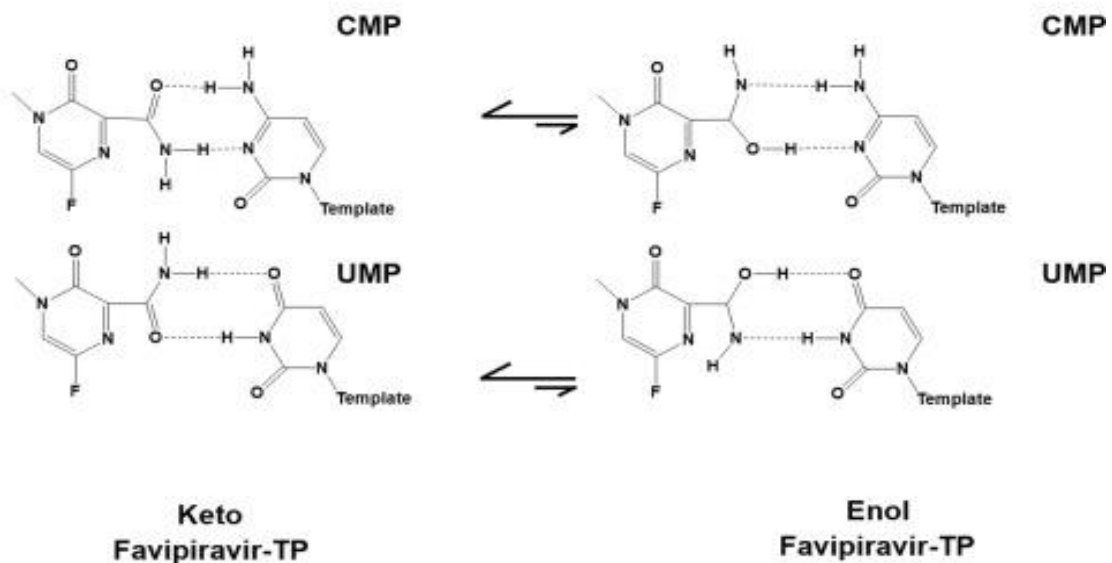


Φάρμακο (στην Ιαπωνία) για την influenza με δράση ευρέως φάσματος έναντι RNA ιών. Μεταλλαξιογόνος παράγοντας.

Παράγωγο πυραζίνης, που ριβοζυλιώνεται και **φωσφορυλιώνεται από ένζυμα του μονοπατιού διάσωσης των πουρινών**, για να αναγνωρισθεί ως υπόστρωμα από την ιική RNA πολυμεράση.

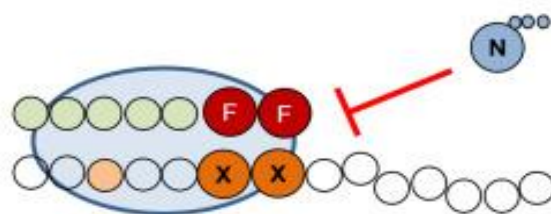
Έλαβε επείγουσα έγκριση σε Ιαπωνία, Κίνα, Ινδία, Ρωσία έναντι του **SARS-CoV-2**.

A



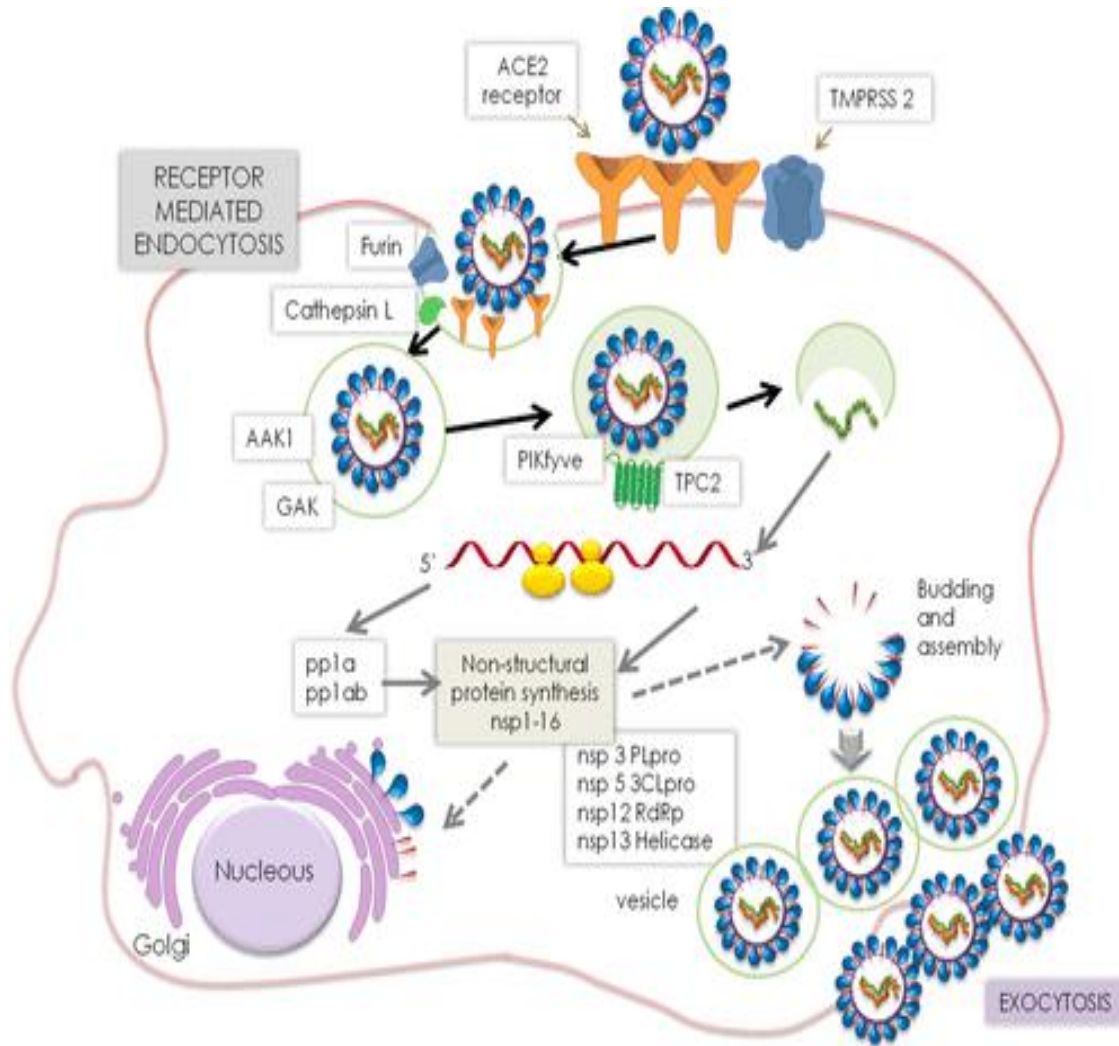
B

Inhibition



Η κετολική μορφή του Favipiravir ευνοεί τις μεταλλάξεις, επειδή σχηματίζει εύκολα ζεύγος και με τις δύο ετεροκυκλικές βάσεις (κυτιδίνη ή ουριδίνη).

Αναστολείς πρωτεασών του SARS-CoV2



Το ιικό ss-(+)-RNA μεταγράφεται προς (-)-RNA που θα αποτελέσει τη μήτρα για τη παραγωγή του ιικού γονιδιώματος. Τα 2/3 του μεταφράζονται στις **πολυπρωτεΐνες 1a** και **1ab** που με τη συνδυαστική δράση δύο πρωτεασών κυστεΐνης θα διασπασθούν με μεταμεταφραστικές διαδικασίες προς λειτουργικές και δομικές πρωτεΐνες.

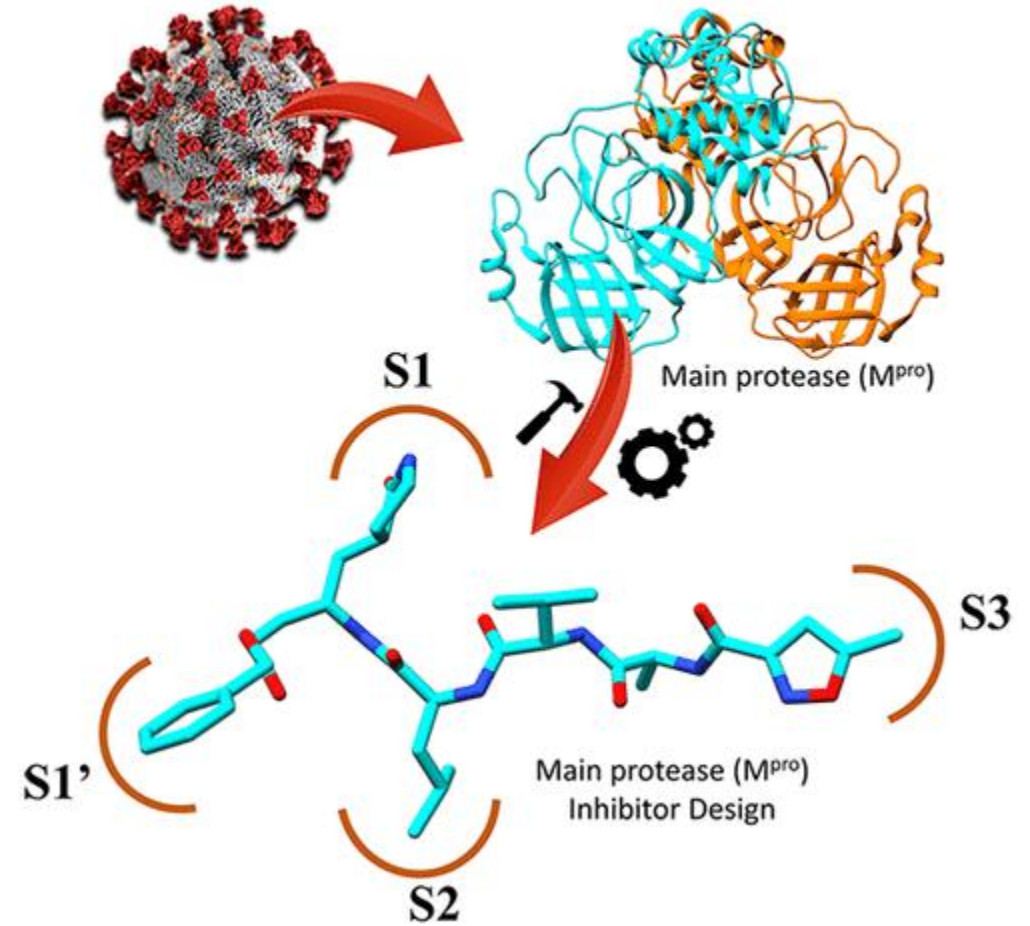
- Η πρωτεάση τύπου χυμοθρυψίνης **Mpro (main protease)** διασπά την πολυπρωτεΐνη 1ab σε 11 διακριτές θέσεις.
- Η πρωτεάση τύπου παπαΐνης **PLpro** διασπά σε διαφορετικές θέσεις. Είναι πολυδραστικό ένζυμο, με σύνθετους ρόλους στην ιική ωρίμανση και τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

Αναστολείς της SARS-CoV-2 Mpro.

Η Mpro είναι ελκυστικότερος στόχος από την PLpro:

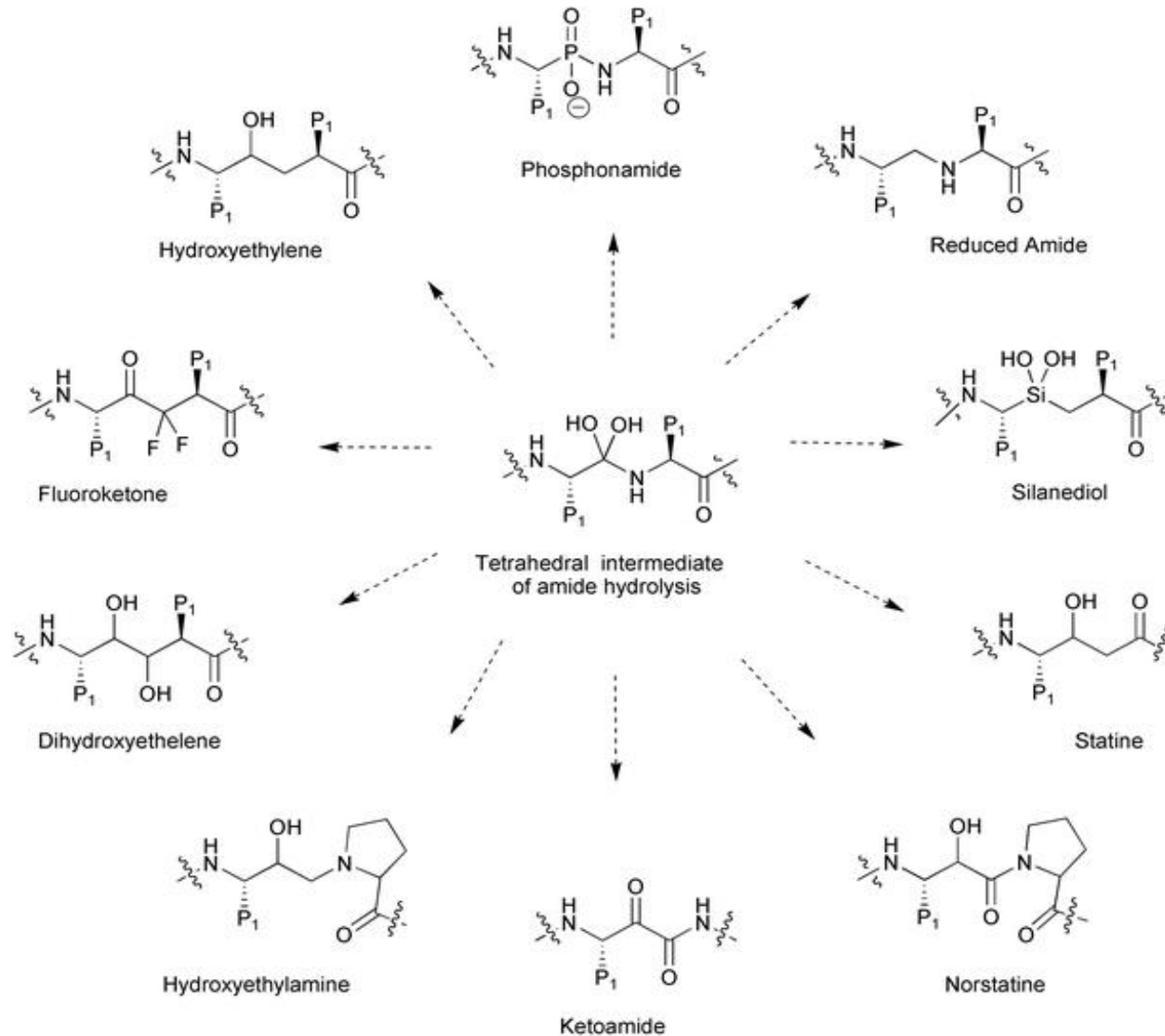
- μικρότερη
- διαφορετικής εκλεκτικότητας (Leu-Gln) από τις ανθρώπινες πρωτεάσες (η PLpro εμφανίζει αντιστοιχία)
- παράγεται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες/ διαθέσιμη για in vitro tests
- απλής λειτουργίας, συναφούς με πρωτεάσες άλλων ιών
- το ενεργό κέντρο αποσαφηνίσθηκε σύντομα (Μάρτιος 2020) και διευκόλυνε την εφαρμογή τεχνικών structure-based drug design
- η αμινοξική αλληλουχία + τρισδιάστατη δομή διατηρείται ισχυρά στα διάφορα ιικά στελέχη

Η χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων διευκολύνει την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων, πιθανά αποτελεσματικών και έναντι μελλοντικά αναδυόμενων στελεχών.



J. Phys. Chem. 13(25), 5776–5786, 2022.

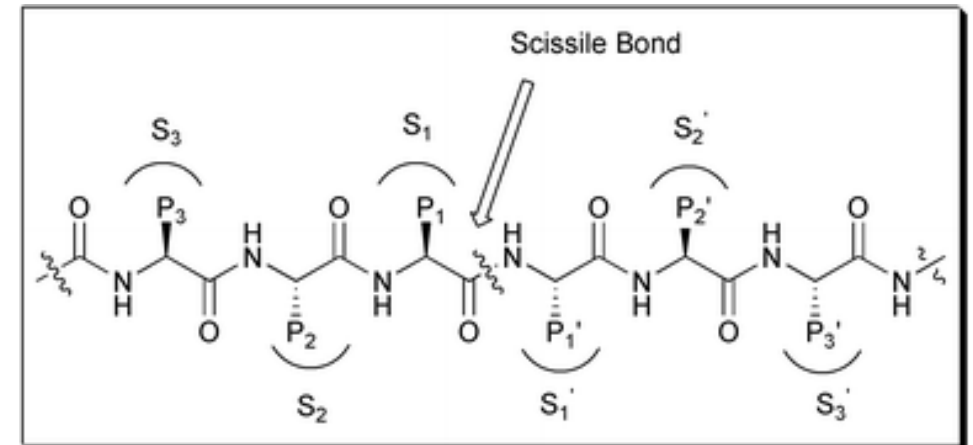
Η σημαντικότερη κατηγορία εγκεκριμένων αντιικών φαρμάκων (HIV, HCV) είναι οι αναστολείς ιικών πολυμερασών.



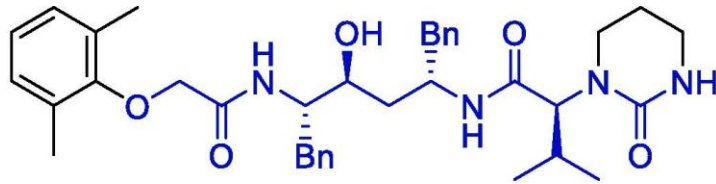
Οι **πεπτιδομιμητικοί αναστολείς** μιμούνται και ανταγωνίζονται το φυσικό υπόστρωμα (transition-state isosteres) χωρίς να προσφέρουν δυνατότητα υδρόλυσης (ισοστερή πεπτιδικού δεσμού). Οι νεότερες γενιές είναι «λιγότερο πεπτιδικές» ενσωματώνοντας μη φυσικά αμινοξέα ή άλλα δομικά στοιχεία που συνεισφέρουν στην:

- υψηλή εκλεκτικότητα
- αύξηση της εισόδου στα κύτταρα και
- μεταβολική σταθερότητα

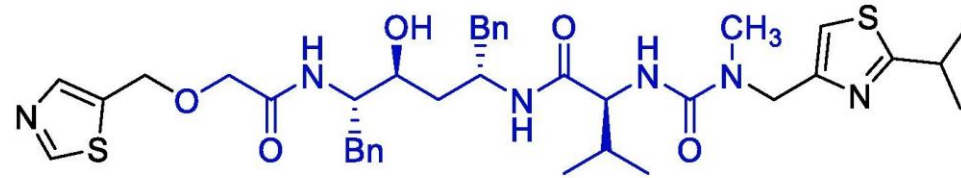
αυξάνοντας όμως συχνά το κόστος της σύνθεσης.



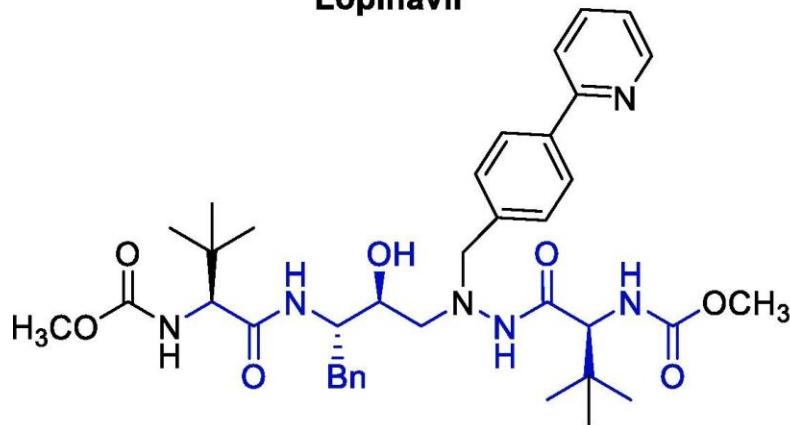
Drug repurposing: αναστολείς της HIV πρωτεάσης → Μη ομοιοπολικοί αναστολείς SARS-CoV-2 Mpro



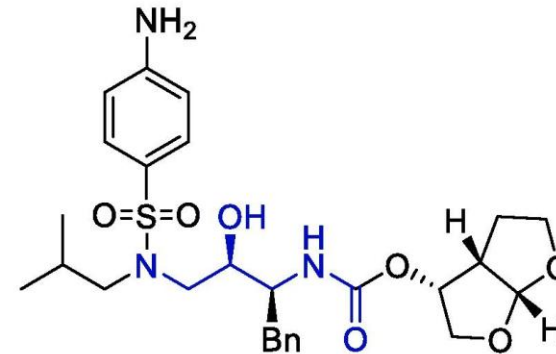
Lopinavir



Ritonavir



Atazanavir

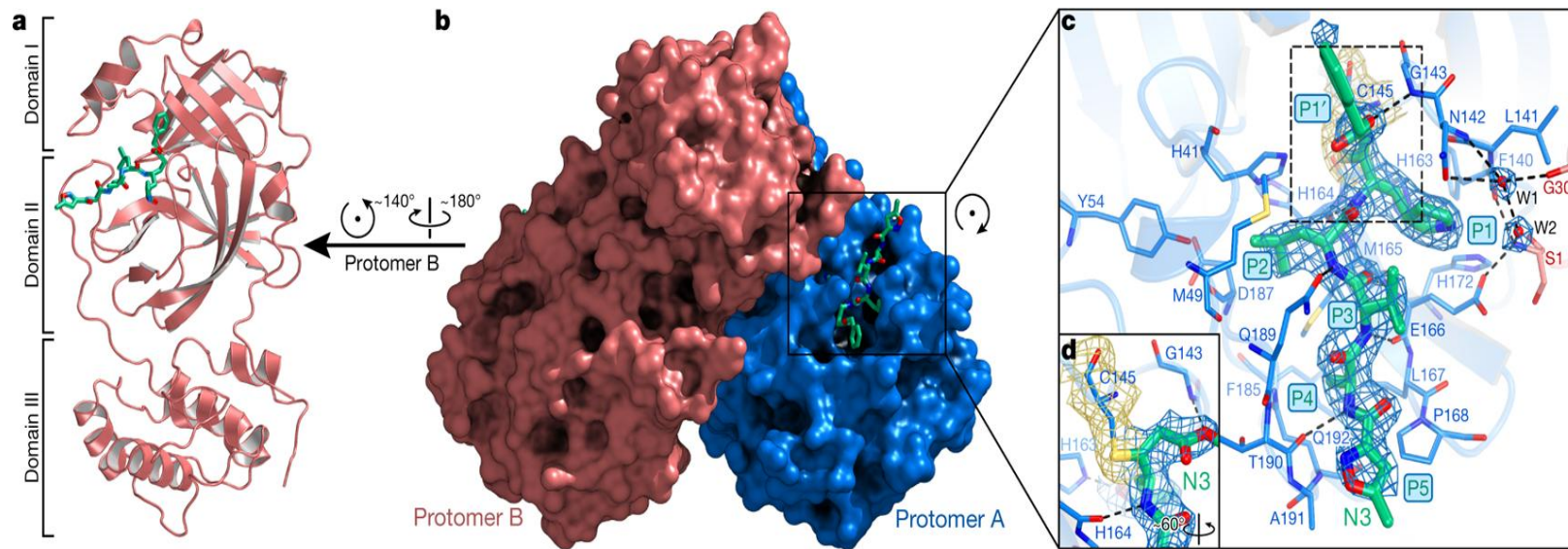


Darunavir

Συνδεόμενοι ανταγωνιστικά στην καταλυτική θέση με δΗ και μη πολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλούν παραμορφώσεις στους θύλακες και εκτοπίζουν βασικά μόρια νερού, εμποδίζοντας τη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.

Κατά τα πρώτα στάδια της πανδημίας δοκιμάσθηκαν αναστολείς της HIV πρωτεάσης έναντι της **SARS-CoV-2 Mpro** με **μέτρια αποτελέσματα**.

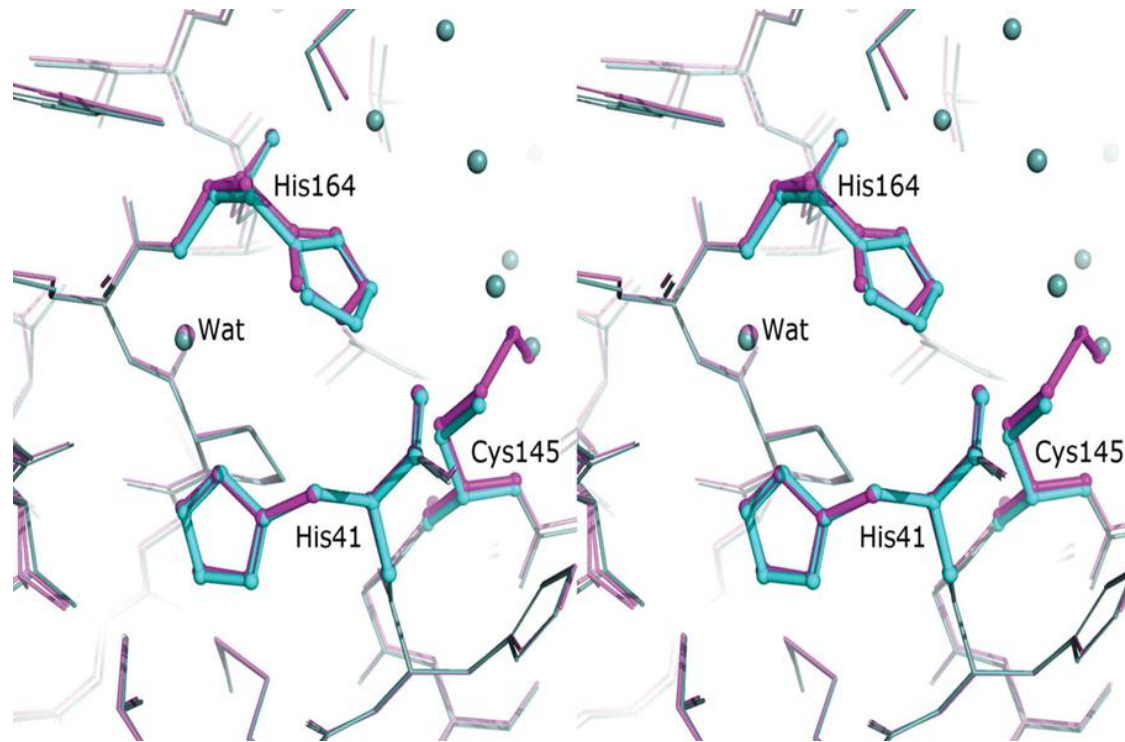
Τα ειδικά σχεδιασμένα φάρμακα είναι αποτελεσματικότερα από τα φάρμακα επαναστόχευσης (repurposed therapeutics).



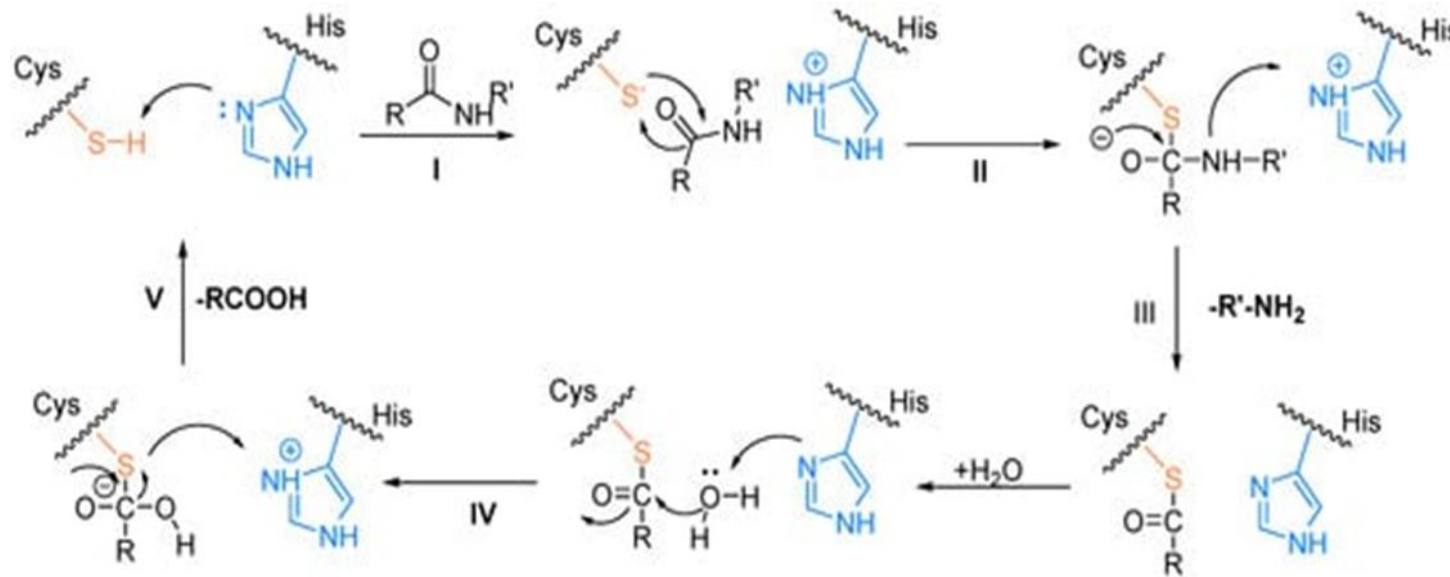
Η **Mpro** είναι ομοδιμερής, με τα δύο πρωτομερή (34.21 kDa) σε περίπου κάθετη διεύθυνση. Σε αναλογία με άλλες πρωτεάσες κυστεΐνης κάθε πρωτομερές αποτελείται από 3 τομείς (I, II, III). Το (ένα) ενεργό κέντρο εντοπίζεται στη σχισμή μεταξύ των τομέων I και II. Ο τομέας III που αποτελείται κυρίως από α-έλικες συμβάλλει στη καταλυτική διαδικασία.

Στο ενεργό κέντρο διακρίνονται έξι κοιλότητες (S1', S1, S2, S3, S4 και S5) που αλληλεπιδρούν, αντίστοιχα, με ομάδες του υποστρώματος (P1', P1, P2, P3, P4 και P5). Το ένζυμο είναι **πρωτεάση κυστεΐνης τριών σημείων**. Το ζεύγος **Cys145-His41** στην **S1** συμπληρώνεται από ένα μόριο H_2O για τη σύσταση της καταλυτικής τριάδας. Το H_2O συνδέεται (δH) με αμινοξέα (His41 κ.α. γειτονικά), ενώ υπάρχει και δεύτερο H_2O που συνδέεται επίσης ισχυρά με άλλα αμινοξέα (Phe140, His163, Glu166).

→ Μικρά μόρια που σχεδιάζονται ως αναστολείς του ενζύμου μπορεί να εισέλθουν αντί του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο εκτοπίζοντας αυτά τα 2 H_2O : προκύπτει σημαντικό εντροπικό κέρδος για τη σύνδεση τους=επιτυχής ανταγωνισμός του φυσικού υποστρώματος.



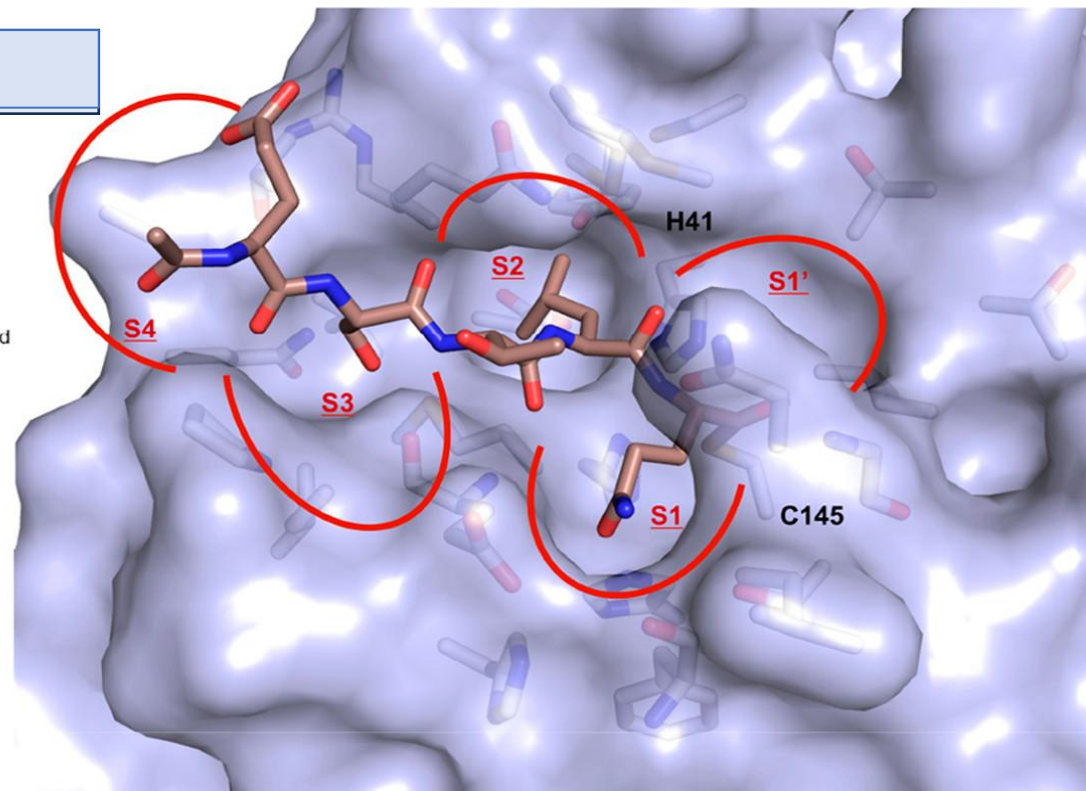
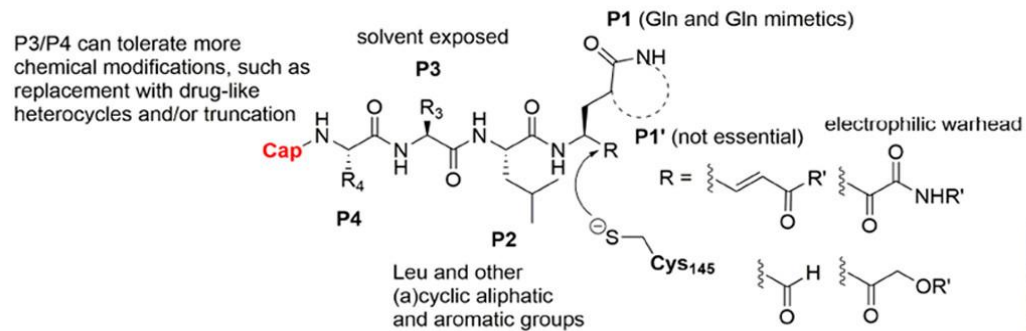
- Το N1 της **His41** σχηματίζει δ.Η με το μόριο του νερού (**Wat** στο σχήμα, συνδέεται και με **Asp187** και **His164**). Η διάταξη αυτή αυξάνει τη βασικότητα της **His41**, που ενεργοποιεί την **Cys145** για την πυρηνόφιλη προσβολή.



Η πυρηνόφιλη προσβολή του υποστρώματος ή του πεπτιδομιμητικού αναστολέα από την καταλυτική **Cys145** είναι συγχρονισμένη διαδικασία:

- Ο σχηματισμός ανιόντος στη θειολομάδα της **Cys145** υποβοηθείται από τη βασική **His41**.
- Το ανιόν της θειολομάδας της **Cys145** προσβάλλει τον άνθρακα του αμιδικού δεσμού σχηματίζοντας θειοημικεταλικό ενδιάμεσο.
- Η πρωτονιωμένη **His41** διευκολύνει την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού (**N-τελικό πεπτίδιο**).
- Ένα μόριο νερού προσβάλλει ακολούθως τον καρβονυλικό άνθρακα του θειοεστέρα, η **His41** επαναπρωτονιώνεται και απελευθερώνεται η **Cys145** και το **C-τελικό πεπτίδιο**.

Σχεδιασμός μη αντιστρεπτών αναστολέων της Mpro



Πεπτιδομιμητικά παράγωγα που δρουν με μηχανισμό δύο σταδίων: στο πρώτο στάδιο δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η **Cys145** βρίσκεται κοντά σε μια ενσωματωμένη στη δομή τους **ηλεκτρονιόφιλη ομάδα ("warhead group")**. Στο δεύτερο στάδιο η ομάδα αυτή αντιδρά με την **Cys145** για τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού.

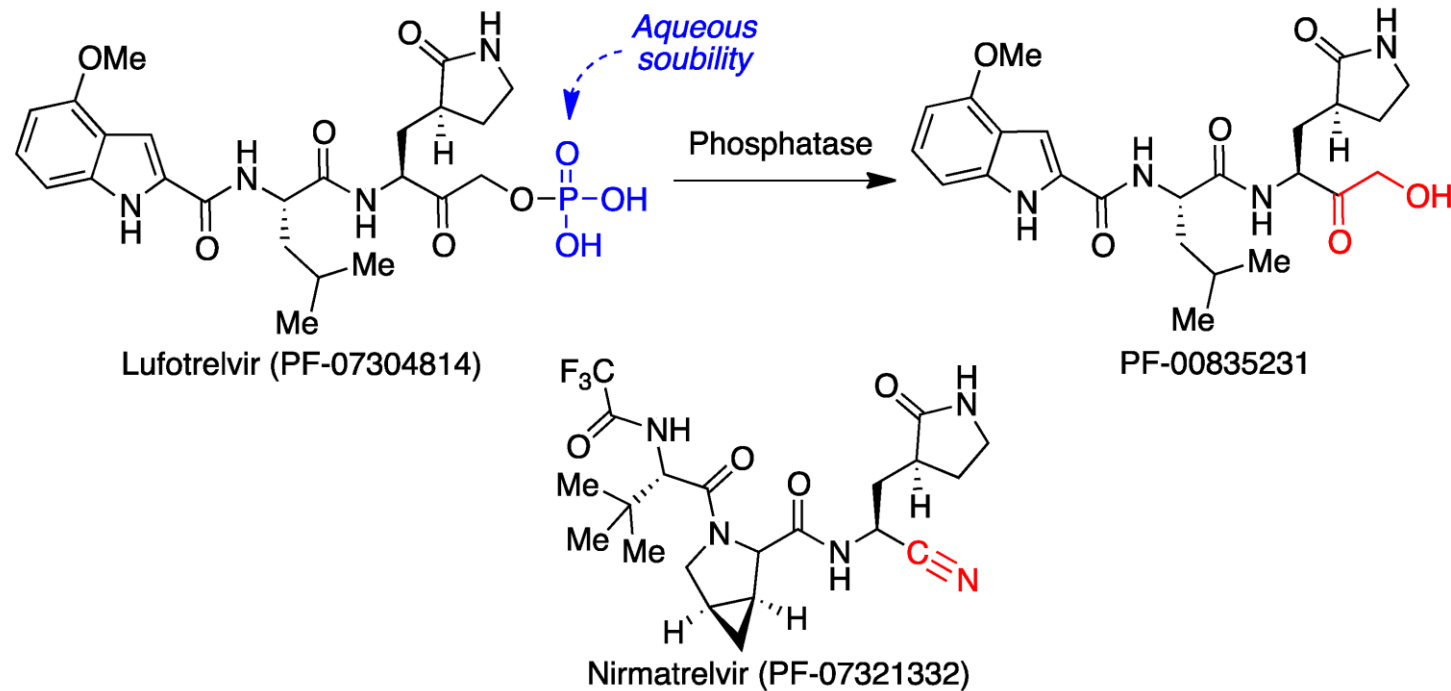
Η συγγένεια του υποστρώματος καθορίζεται κυρίως από τις περιοχές:

S1, που εμφανίζει συγγένεια προς κατάλοιπα Gln και

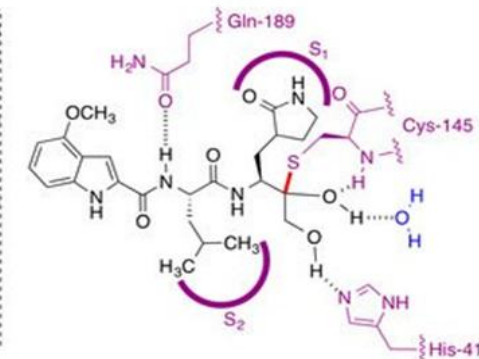
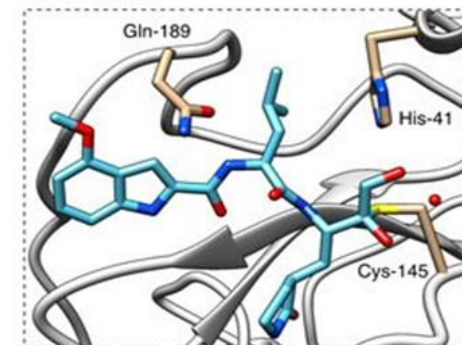
S2, που οριοθετείται από υδρόφοβα αμινοξέα. Οι S3/S4 είναι περισσότερο εκτεθειμένες στον διαλύτη.

Στη περιοχή P1 η παρουσία γ-λακτάμης (πυρρολιδόνης) μιμείται μια συντηρημένη Gln δίπλα στη θέση υδρόλυσης P1' που αποτελεί σημαντικό στοιχείο αναγνώρισης για την Mpro.

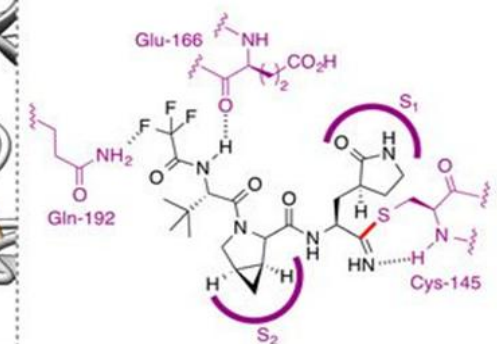
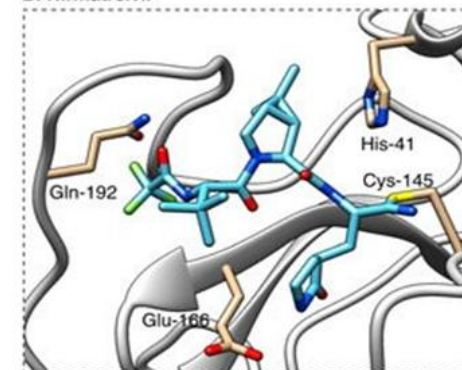
Στη περιοχή P2 οι υδρόφοβες ομάδες (ισοβουτυλο-, κυκλοεξυλο-, κυκλοπροπυλο-, αρωματικές) αλληλεπιδρούν με υδρόφοβα αμινοξέα (λευκίνη).



A. PF-00835231

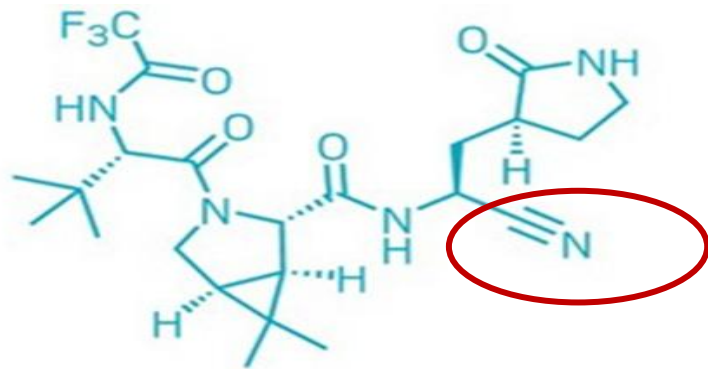


B. Nirmatrelvir



Ο αναστολέας πρωτεάσης του SARS-CoV **PF-00835231** λειτουργεί *in vitro* ως αναστολέας της **Mpro**. Ως πολικό μόριο δεσμεύεται ισχυρά στο εντερικό βλεννογόνο και χορηγείται **ενδοφλεβίως** ως υδατοδιαλυτός φωσφορικός εστέρας **PF-07304814 (Lufotrelvir)**. Χρησίμευσε για την ανάπτυξη των βιοχημικών δοκιμών αναστολής της **Mpro** και των δοκιμών αναστολής του SARS-CoV2 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.

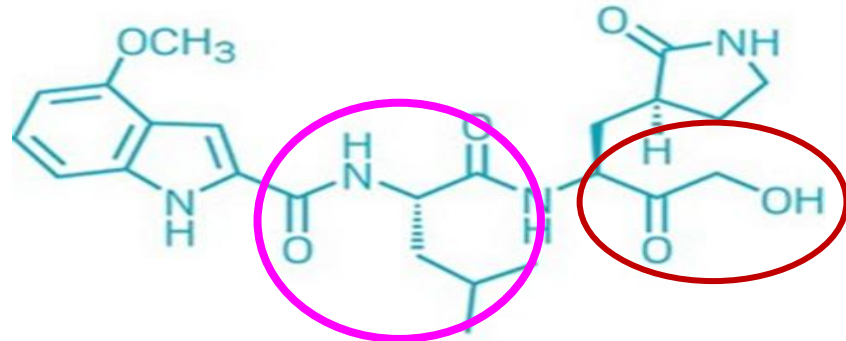
Το **Lufotrelvir** εγκρίθηκε (FDA), αλλά αντικαταστάθηκε σύντομα από το **δραστικό από το στόμα Nirmatrelvir** της ίδιας εταιρείας (Pfizer), **το οποίο είναι πιθανό να ληφθεί εγκαίρως από τον ασθενή, πριν χρειασθεί εισαγωγή του σε νοσοκομείο.**



**Nirmatrelvir
(PF-07321332)**

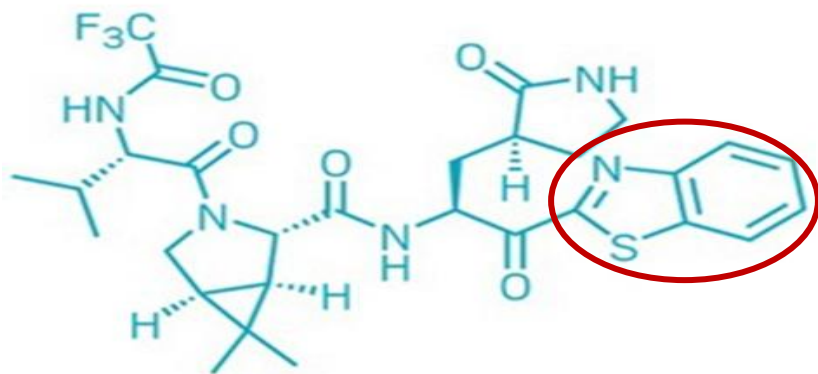
Ελαχιστοποιήθηκε η παρουσία πολλών ομάδων που συμμετέχουν σε δΗ, επειδή εμποδίζουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Η **α-υδροξυμεθυλοκετόνη** αντικαταστάθηκε από τη λιπόφιλη **βενζοθειαζολ-2-υλο κετόνη**, ή από νιτρίλιο.

Η κεντρική **ομάδα λευκίνης** αντικαταστάθηκε από **6,6-διμεθυλ-3-αζαδικυκλο[3.1.0]εξάνιο**, καταργώντας ένα δότη δ.Η. Τα 2 gem-Me του διμεθυλοκυκλοπροπανικού δακτυλίου επιτυγχάνουν ικανοποιητική σύνδεση με το ένζυμο, όμως χάνεται μια σημαντική αλληλεπίδραση του αναστολέα με **Gln (S2/S3)**. Η ισχυρή σύνδεση επανήλθε με **αντικατάσταση του ινδολικού δακτυλίου από τριφθοροακεταμίδιο**, με ταυτόχρονη βελτίωση της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς.

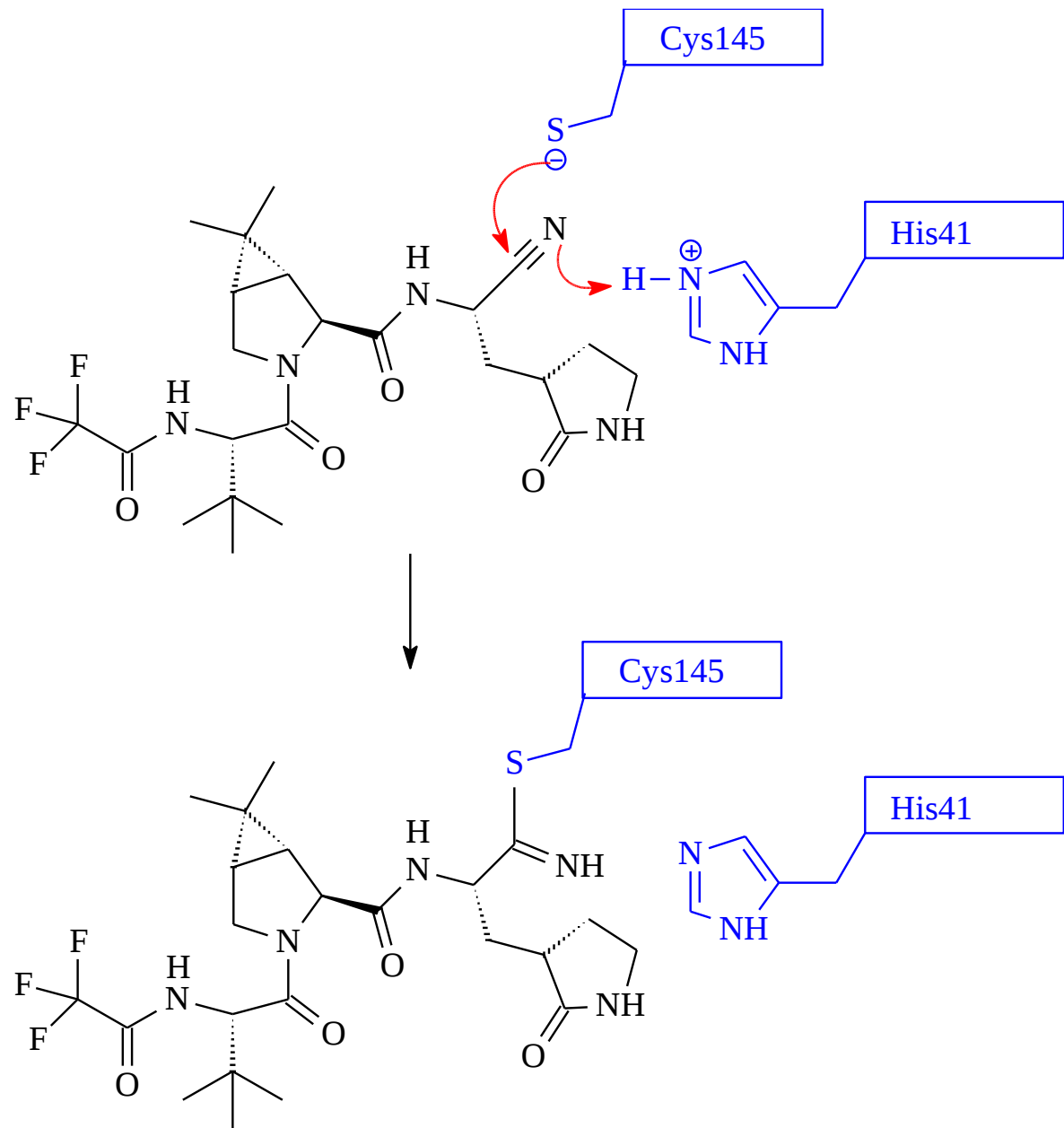


PF-00835231

Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης, η παρουσία του θειαζολίου συνδέθηκε με τοξικές παρενέργειες (όπως αύξηση παραγόντων φλεγμονής, αιμόλυση) και υποχρεωτικά αντικαταστάθηκε **από νιτρίλιο** (μέτριο ηλεκτρονιόφιλο) που **μειώνει την επιμερίωση** και **βελτιώνει την εκλεκτικότητα, τη σταθερότητα, τη διαλυτότητα και συνολικά τη βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα**.



Benzothiazol-2-yl ketone candidate



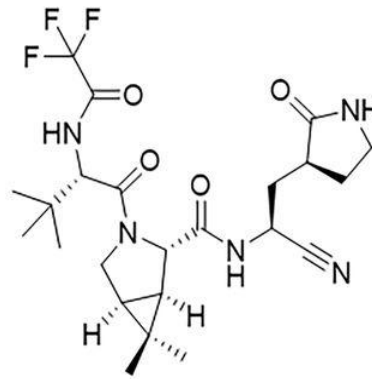
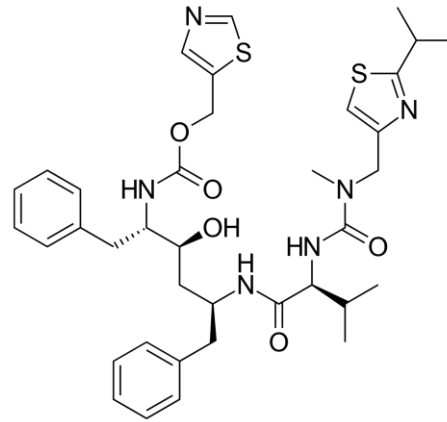
Η αναστολή της **SARS-CoV-2 Mpro** από το **nirmatrelvir** συμβαίνει σε δύο στάδια:

- Η αρχική δέσμευση στο ενεργό κέντρο οδηγεί στο σχηματισμό ιοντικού ζεύγους στην καταλυτική δυάδα **Cys145-His41** (ανιόντος θειολομάδας και ιμιδαζολικού κατιόντος).
- Ακολουθεί η πυρηνόφιλη προσβολή της θειολομάδας επί του νιτριλίου για την ομοιοπολική σύνδεση του φαρμάκου με την **Cys145**.

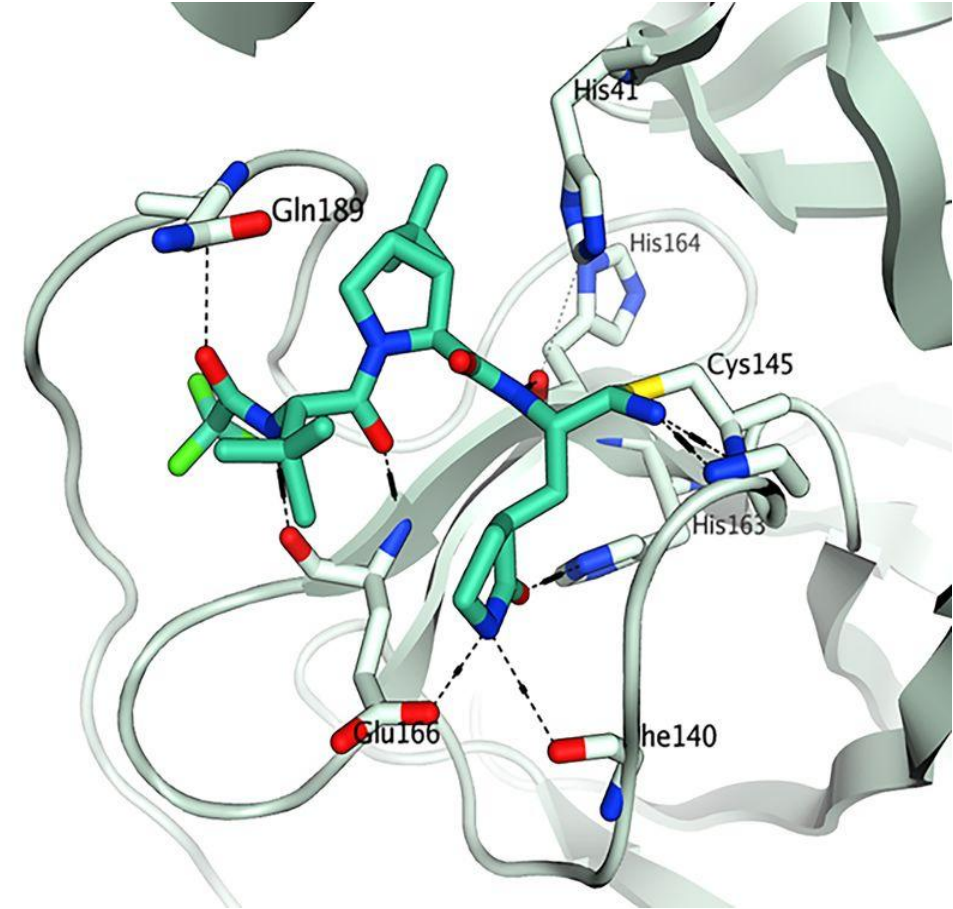
Για τη μορφοποίηση του σκευάσματος **Paxlovid**, το **Nirmatrelvir** συνδυάστηκε με **Ritonavir** αναστολέα του CYP3A4, που μεταβολίζει τη πλειονότητα των αναστολέων πρωτεάσης.

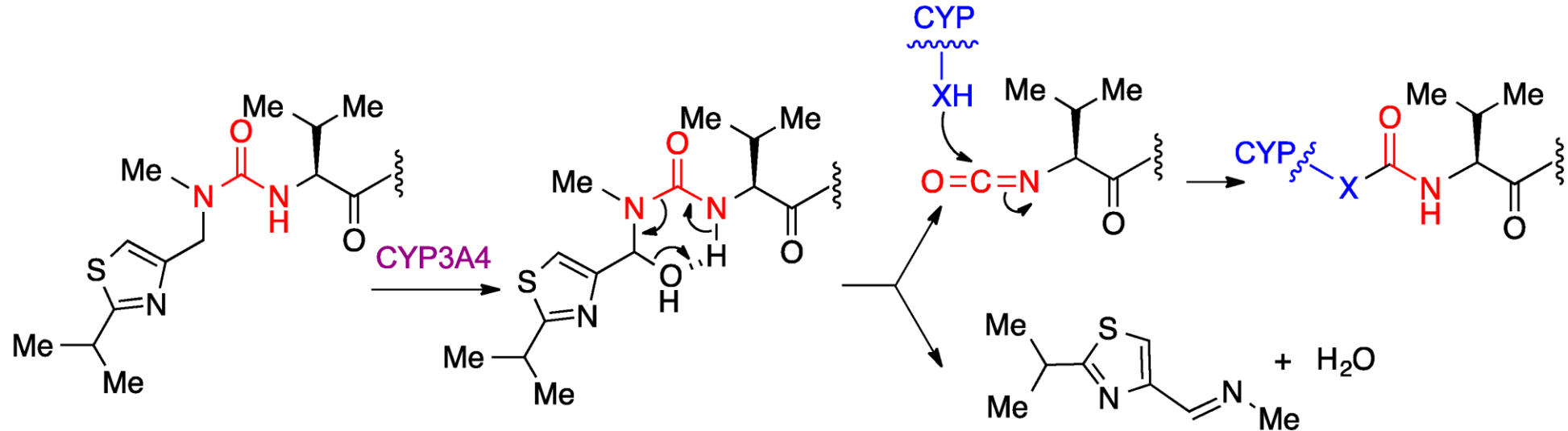
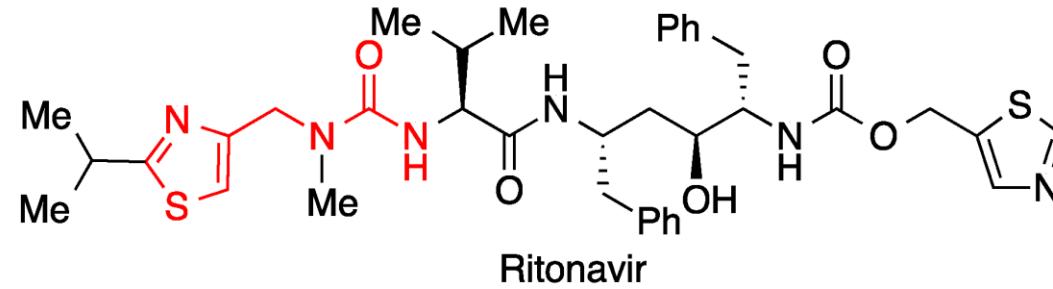
Το συνδυαστικό σχήμα **Paxlovid** είναι δραστικό από το στόμα και αποτελεσματικό, χωρίς σημαντικές παρενέργειες.

Αν χορηγηθεί κατά το πρώτο 5/μερο από την έναρξη των συμπτωμάτων, μειώνει τη πιθανότητα εισαγωγής σε νοσοκομείο και τη πιθανότητα θανάτου από COVID-19, κατά 88%, σε σύγκριση με το placebo.



Nirmatrelvir (PF-07321332)

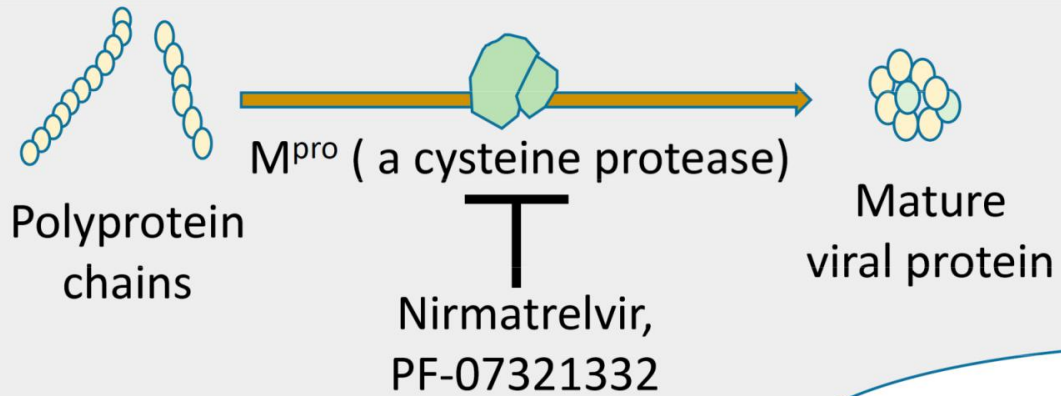




Το Ritonavir αναστέλλει μη αντιστρεπτά το CYP3A4.

Αρχικά η ομάδα ουρίας οξειδώνεται και διασπάται προς ισοκυανικό ενδιάμεσο, το οποίο προσβάλλεται εύκολα από ομάδα του κυτοχρώματος και σχηματίζεται τελικά καρβαμιδικός εστέρας.

Mechanism: an inhibitor of M^{pro}, a protease critical in viral replication



Efficacy: reduce hospitalization rate and mortality

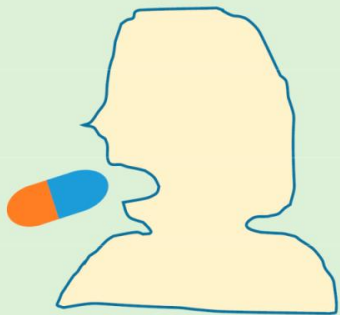
6.3% (66/1046) of the control group were hospitalized with **12** subsequent deaths

vs.

0.3% (8/1039) of the Paxlovid™ group were hospitalized with **no** deaths

Paxlovid™
= Nirmatrelvir/ritonavir

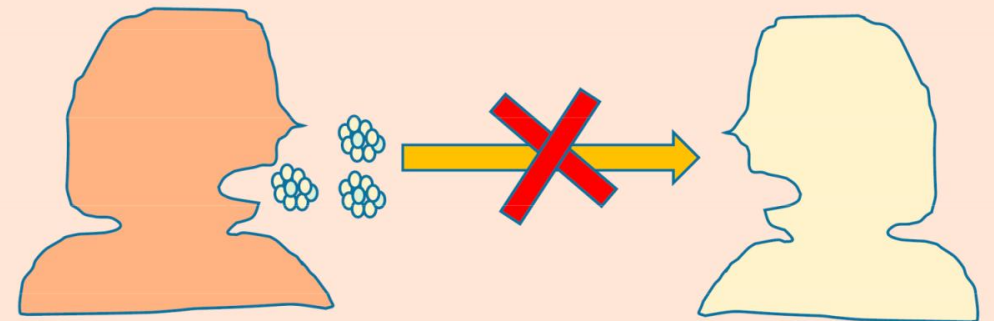
Convenience: orally bioavailable

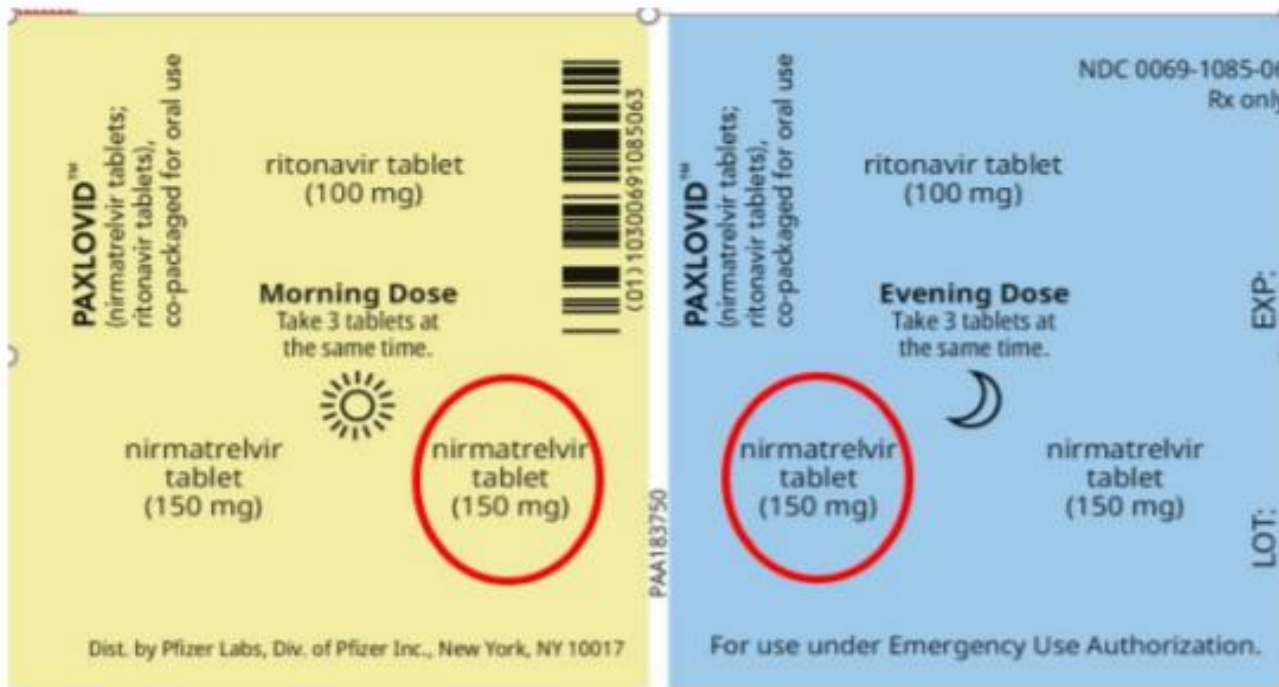


Oral bioavailability (F) = **50%** in rat

Fraction of oral dose absorbed from the gastrointestinal tract (Fa × Fg) = **95%** in rat

Prevention: prevent transmission to untreated sentinels

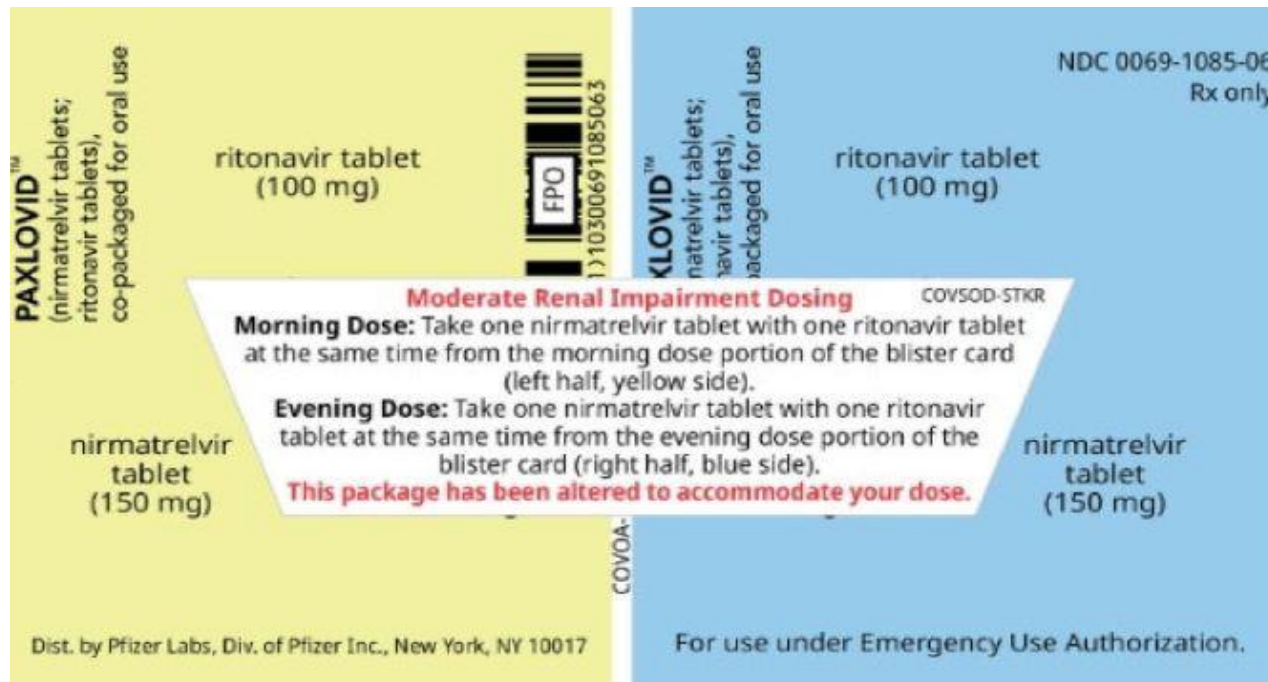




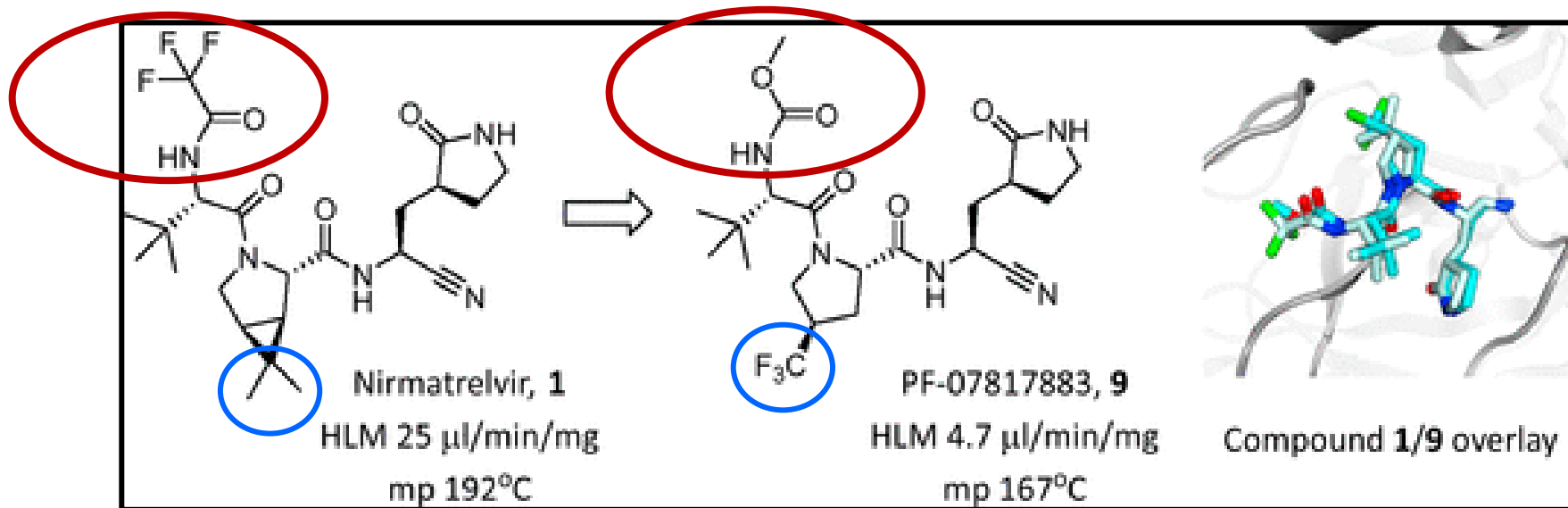
Εξ αιτίας της παρουσίας του ritonavir αυξάνεται η πιθανότητα φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων.

Συνιστάται μειωμένη δοσολογία σε ασθενείς με μέτρια νεφρική ανεπάρκεια.

Απαγορεύεται η χορήγηση του φαρμάκου σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια.



Βελτιωμένοι μη αντιστρεπτοί Mpro αναστολείς: μεταβολικά σταθεροί



Journal of Medicinal Chemistry 67, 13550–13571, 2024

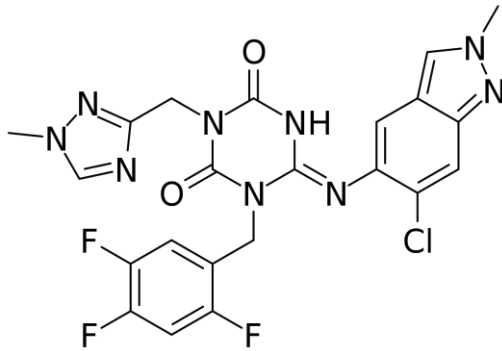
Στόχος: μείωση της συνάφειας με το CYP3A4, διατήρηση ανασταλτικής δράσης έναντι της SARS-CoV-2 M^{pro}.

Αντικατάσταση του τριφθοροακεταμιδίου της P4 με καρβαμιδικό εστέρα μειώνει τη λιποφιλία.

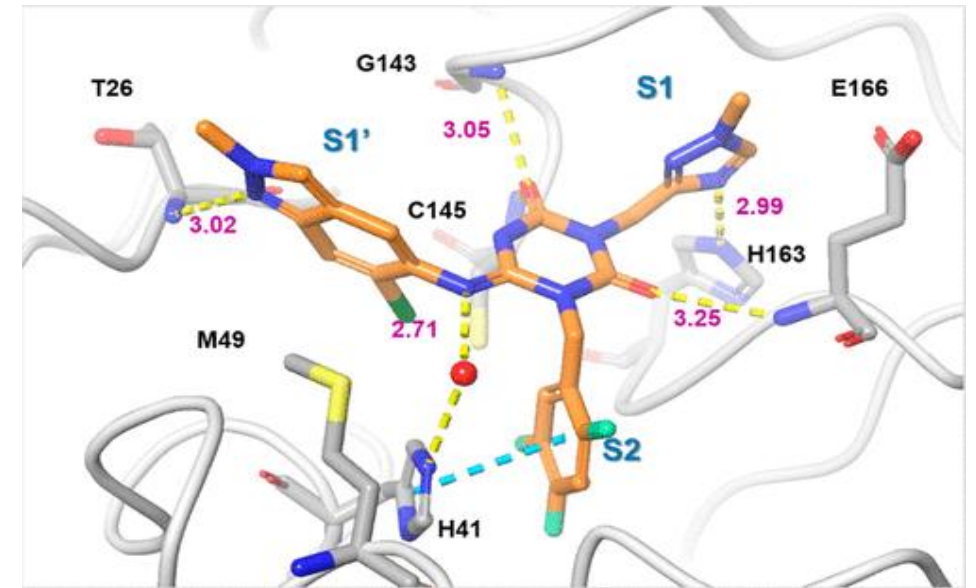
Κατάργηση της ευκόλως οξειδούμενης gem-διμεθυλομάδας της P2 καθυστερεί την οξείδωση.

Χορηγούμενο από το στόμα το **PF-07817883** έχει αποδεκτή φαρμακοκινητική συμπεριφορά και μεταβολική σταθερότητα. Δεν απαιτείται συγχορήγηση **Ritonavir**, μειώνοντας τον κίνδυνο φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων.

Μη πεπτιδικοί αντιστρεπτοί Mpro αναστολείς:



Journal of Medicinal Chemistry 65 6499–6512, 2022



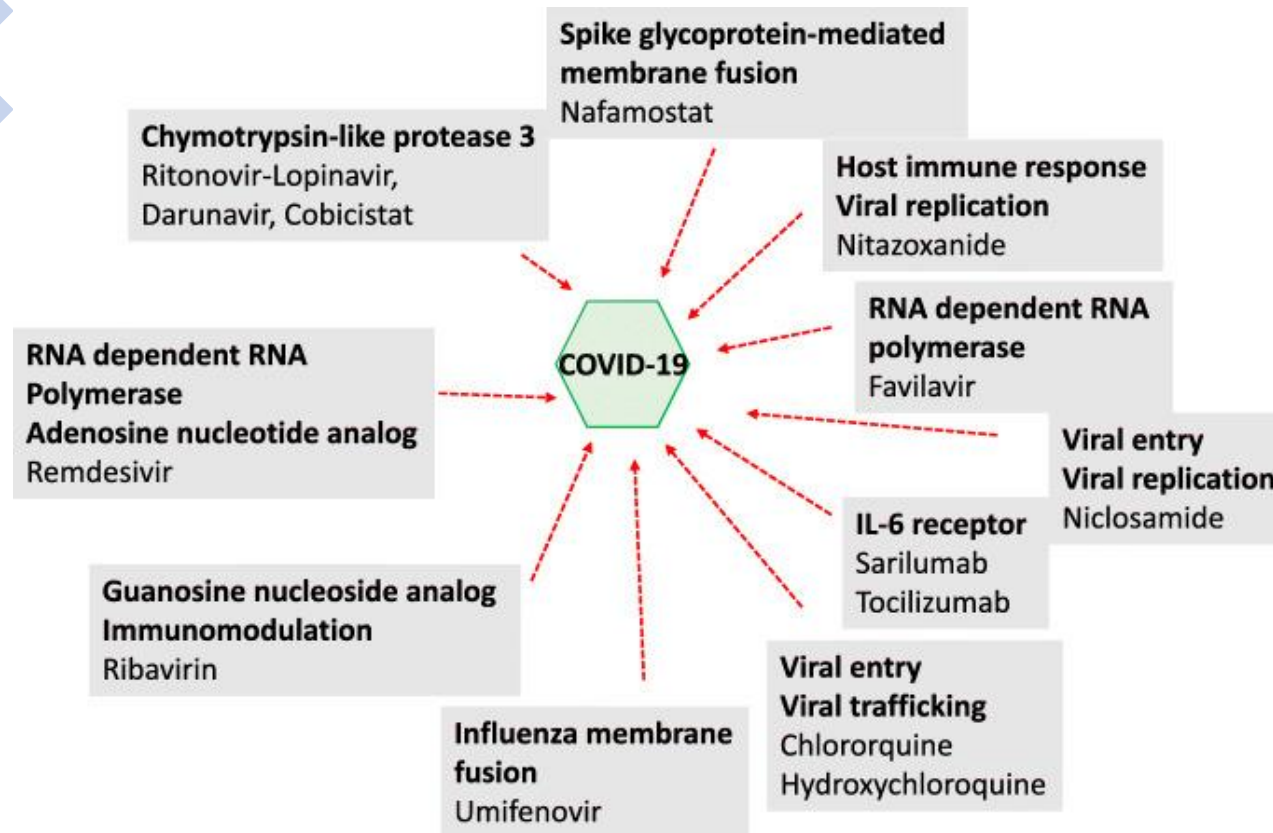
Το **Ensitrelvir** είναι ο πρώτος εγκεκριμένος **μη πεπτιδικός αντιστρεπτός αναστολέας της Mpro** (Ιαπωνία 2022, ΗΠΑ 2023). Οι αντιστρεπτοί αναστολείς θεωρούνται πιο ασφαλή φάρμακα, με μικρότερη πιθανότητα για εμφάνιση παρενεργειών.

Η μετάβαση από τα πεπτιδομιμητικά στα μικρά μόρια είναι πολύπλοκη διαδικασία, που απαιτεί βαθιά κατανόηση της χημείας των πεπτιδίων και του σχεδιασμού φαρμάκων, για την αξιοποίηση των πληροφοριών από τους πεπτιδομιμητικούς αναστολείς.

Το **Ensitrelvir** είναι **δραστικό από το στόμα**, μειώνει τα συμπτώματα σε μέτρια και υψηλής σοβαρότητας νόσηση. Μεταβολικά σταθερό, δεν απαιτεί συγχορήγηση με αναστολέα του κυτοχρώματος.

Μελετάται η αποτελεσματικότητά του για πρόληψη νόσησης και στην πρόληψη της «long COVID».





Tardiora sunt remedia quam mala

Remedies are slower in their operation than diseases.

Cornelius Tacitus

Συνολικά, τα θεραπευτικά μέσα έναντι του COVID-19 παρουσιάζουν μέτρια αποτελεσματικότητα. Η ανάπτυξη φαρμάκων με επείγουσες διαδικασίες και το drug repurposing έσωσαν πολλές ζωές, ωστόσο υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης, ενώ είναι απαραίτητο να τηρούνται αυστηρά τα κλινικά πρωτόκολλα.

Ο κίνδυνος δεν έχει περάσει. **Η ταχύτητα ανάπτυξης της πανδημίας απέδειξε ότι κανείς δεν μπορεί να αισθάνεται ασφαλής αν δεν είναι όλοι ασφαλείς.**