



**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: 777 000 000 επιβεβαιωμένα κρούσματα, περισσότεροι από 7 000 000 θάνατοι (WHO, Απρίλιος 2025)) - οι κοινωνικές, οικονομικές και γεωπολιτικές επιπτώσεις της πανδημίας δεν έχουν ακόμη εκτιμηθεί πλήρως.

Στην οικογένεια **Coronaviridae** ανήκουν τρεις παθογόνοι ιοί:

- SARS-CoV
- MERS-CoV (σύνδρομο Middle East Respiratory Syndrome)
- SARS-CoV2.

Αντίθετα με τους προηγούμενους κορωνοϊούς που προκαλούν περιορισμένες λοιμώξεις και επανεμφανίζονται σποραδικά, ο SARS-CoV2 εμφάνισε εξ αρχής απειλητικά χαρακτηριστικά και **η πανδημία φάνηκε ότι θα διαρκέσει**. Αργότερα, ο ιός εντάχθηκε στα συνήθη παθογόνα και παρασιτεί στον άνθρωπο (ενδημικός).

**Η μελλοντική εμφάνιση 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 **ζωνοσογόνων 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

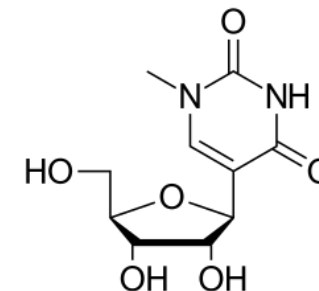
### Drug Discovery & Development Pipeline



Η ανάπτυξη των m-RNA εμβολίων βασίστηκε στην χρήση N1-μεθυλοψευδοουριδίνης ως δομικού λίθου νουκλεϊνικού οξέος αυξημένης αντιγονικότητας. Η εισαγωγή των εμβολίων μείωσε θεαματικά:

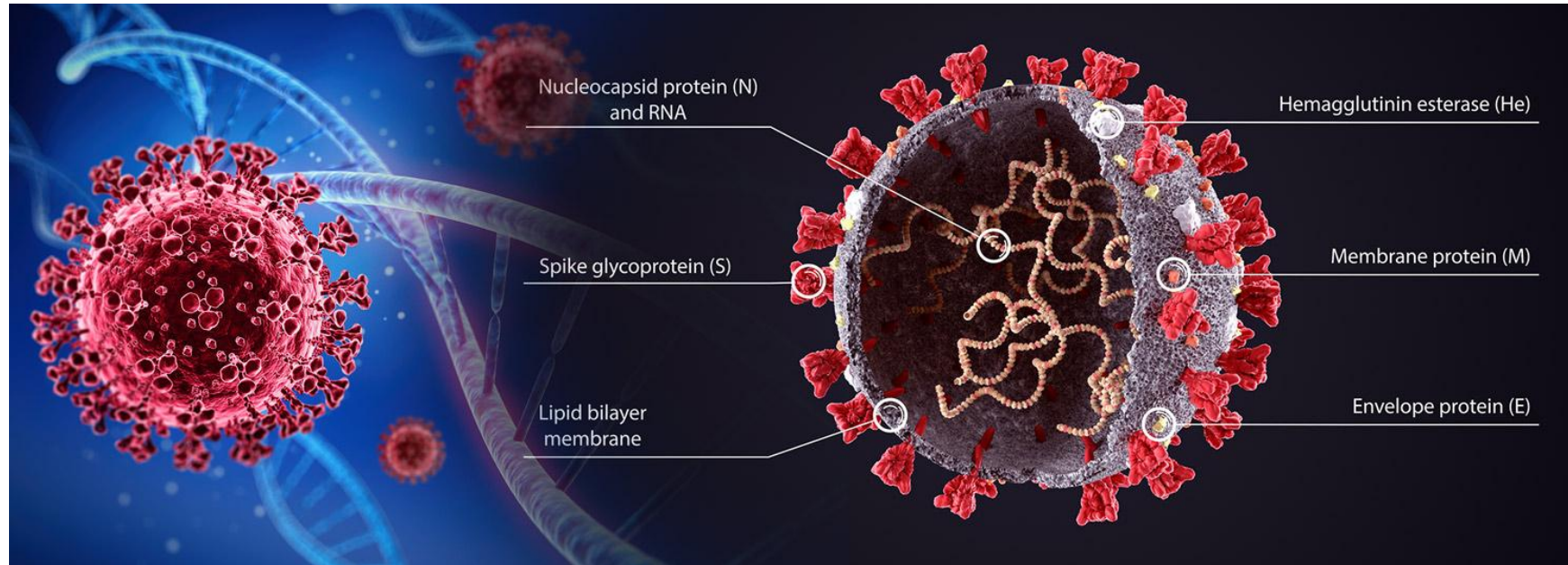
- κρούσματα
- εισαγωγές στο νοσοκομείο
- θνησιμότητα

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 ιϊκό πολλαπλασιασμό**.

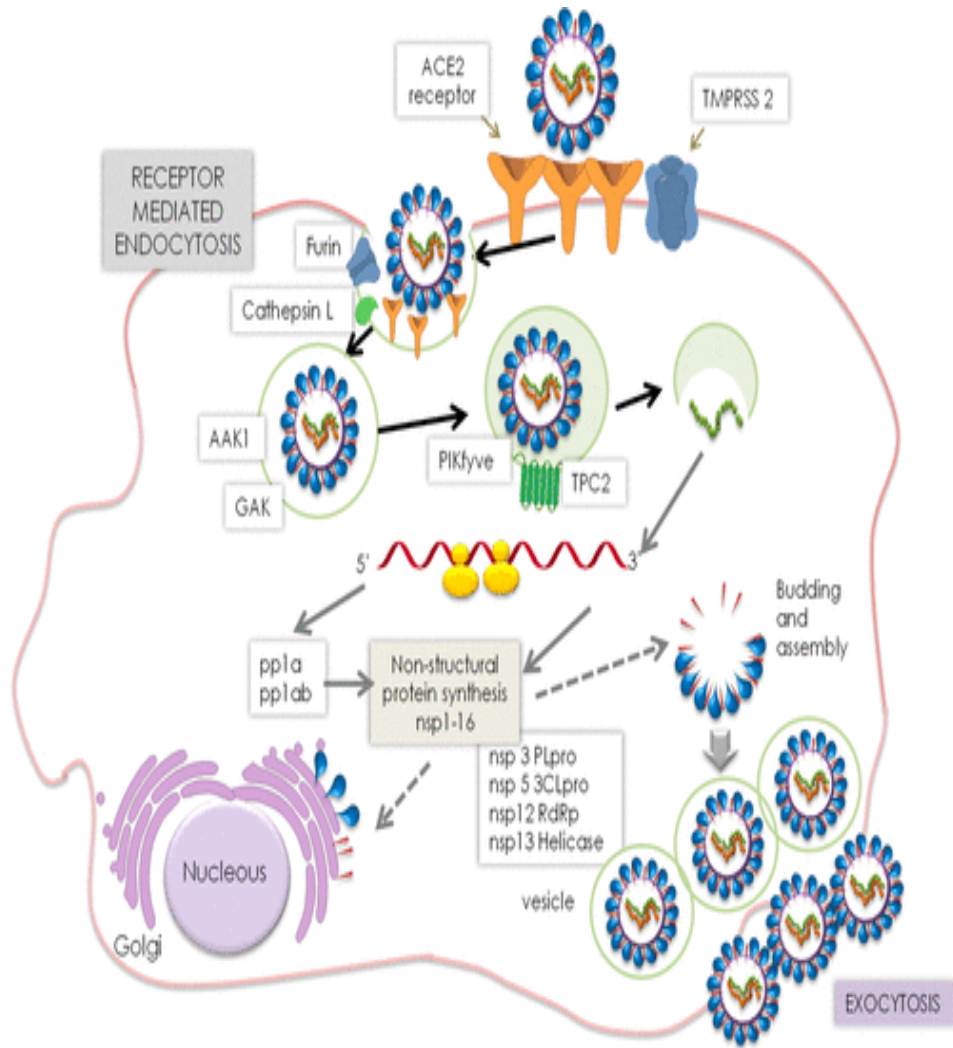


Οι κορωνοϊοί διαθέτουν **λιπιδικό περίβλημα** και γονιδίωμα **(+ssRNA)**. **Μεταλλάσσονται εύκολα**: ενδεχόμενη ανάπτυξη μολυσματικότερων, ή ικανότερων διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα στελεχών.

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

**Μέγεθος γενετικού υλικού 30,000 νουκλεοτίδια → 29 πρωτεΐνες:**

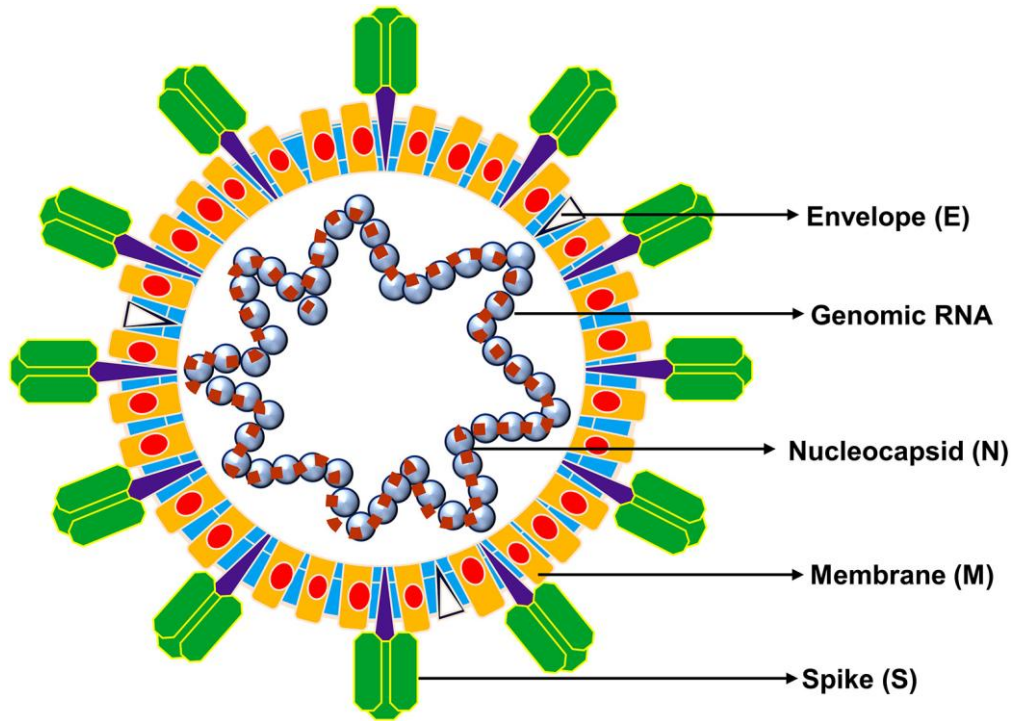
- **4 δομικές πρωτεΐνες**
- **16 λειτουργικές πρωτεΐνες (non structural proteins, NSPs)**
- **9 επικουρικές πρωτεΐνες.**



Το ιικό ss-(+)-RNA πλαισιώνεται από αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions - UTRs) στα 5' και 3' άκρα, με δευτερογενείς δομές RNA, απαραίτητες για τη σύνθεση του. Τα 14 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames - ORFs) κωδικοποιούν τις 29 ιικές πρωτεΐνες. Τα 2/3 του γονιδιώματος στο 5'-άκρο (ORF1a και ORF1b) μεταφράζονται στις **πολυπρωτεΐνες 1a** και **1ab** που με τη συνδυαστική δράση δύο πρωτεασών κυστεΐνης θα διασπασθούν με μεταμεταφραστικές διαδικασίες προς τις λειτουργικές (μη δομικές, NSP) πρωτεΐνες.

- Η πρωτεάση τύπου χυμοθρυψίνης **Mpro (main protease)** διασπά την **πολυπρωτεΐνη 1ab** σε **11** διακριτές θέσεις, αρχίζοντας από την αυτοκατάλυση της δικής της διάσπασης.
- 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.

## Δομικές πρωτεΐνες



- **Πρωτεΐνη-ακίδα (Spike - S):** γλυκοπρωτεΐνη (~150 kDa) προεξέχει από την επιφάνεια του ιού, σχηματίζοντας τη χαρακτηριστική "κορώνα". Υπεύθυνη για τη πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς και βασικός δομικός παράγοντας για τη παρασκευή των mRNA εμβολίων. Η κυτταρική πρωτεάση TMPRSS2 (Transmembrane Protease, Serine 2) την διασπά στις υπομονάδες S1 και S2, από τις οποίες η S1 χρησιμεύει ως περιοχή σύνδεσης με τον υποδοχέα (receptor-binding domain)
- **Πρωτεΐνη μεμβράνης (Membrane - M):** με κεντρικό ρόλο στην ιική συναρμολόγηση
- **Πρωτεΐνη περιβλήματος (Envelope - E):** συμμετέχει στη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων από το κύτταρο
- **Πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (Nucleocapsid - N):** Συμπλέκεται με το ιικό RNA, σχηματίζοντας το ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο που προστατεύει το γονιδίωμα. Συμβάλλει στην παθογένεια του ιού, αναστέλλοντας την έκκριση ιντερφερόνης (IFN) από τον ξενιστή

## Μη δομικές πρωτεΐνες (Non Structural Proteins)

Οι NSP 12-16 συμμετέχουν (με παράγοντες του ξενιστή) στο Σύμπλεγμα Αντιγραφής-Μεταγραφής (Replication-Transcription Complex - RTC) για τη σύνθεση του ιικού γονιδιώματος:

Η Nsp12 δρα ως RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) με συμπαράγοντες τις Nsp7 και Nsp 8.

Η Nsp13 είναι ελικάση που εκτυλίσσει το δίκλωνο RNA κατά την αντιγραφή.

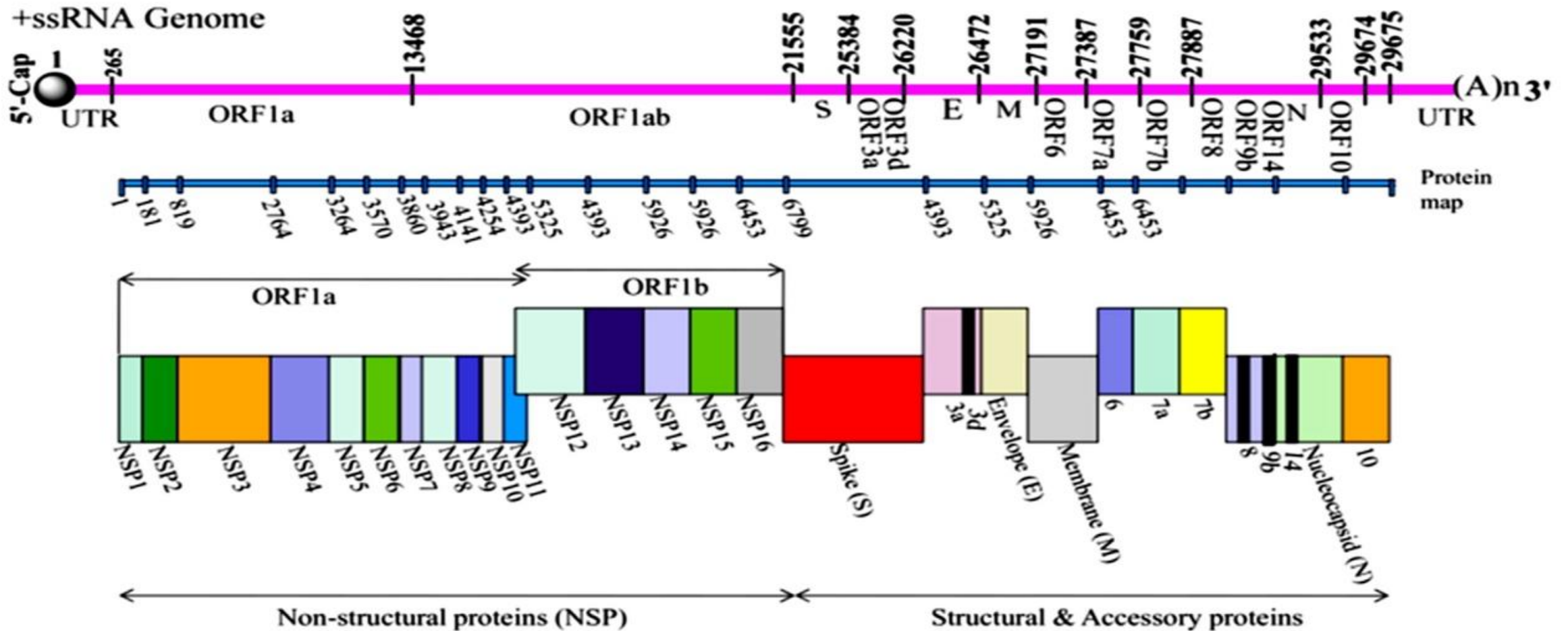
Η Nsp14 είναι εξωνουκλεάση, για τη διόρθωση σφαλμάτων (proof reading).

Η Nsp15 είναι ενδοριβονουκλεάση που αποικοδομεί το ιικό RNA.

Η Nsp16 είναι μεθυλοτρανσφεράση που τροποποιεί το ιικό mRNA, επιτρέποντάς του να μιμείται το mRNA του ξενιστή για την αποφυγή αντίδρασης από το ανοσοποιητικό σύστημα.

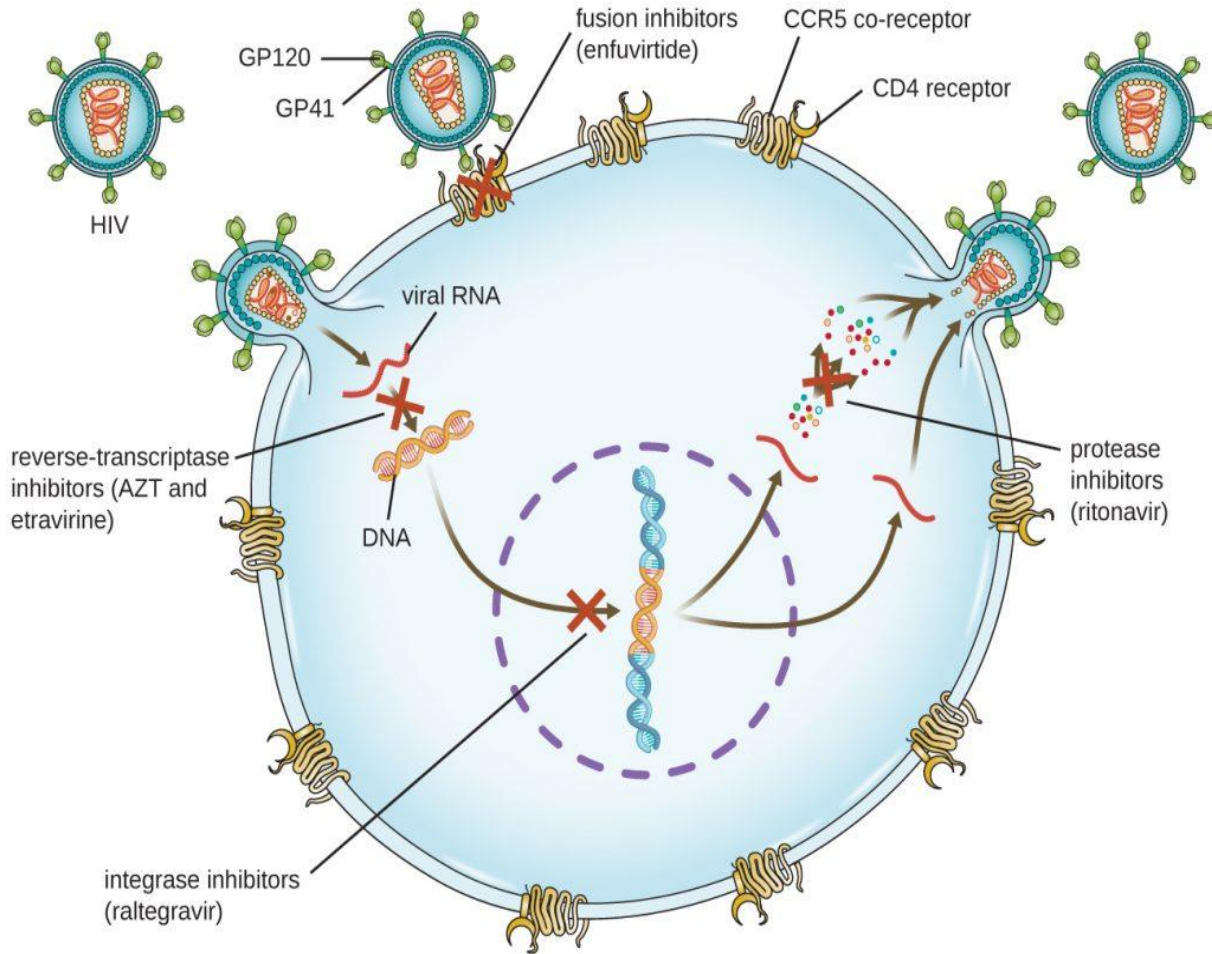
Η **Nsp1**, που απελευθερώνεται ταχύτατα προσδένεται στην υπομονάδα 18S του ριβοσώματος και εμποδίζει την είσοδο του κυτταρικού mRNA, αναστέλλοντας έτσι τη πρωτεϊνοσύνθεση του ξενιστή.

Οι **Nsp 2-11** επιτελούν υποστηρικτικούς ρόλους, όπως τροποποίηση των ενδοκυτταρικών μεμβρανών για την υποβοήθηση της ιική αντιγραφή και την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης.





Περισσότερα από 90 αντιικά 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 σημειώθηκε ραγδαία πρόοδος στα πλαίσια της προσπάθειας για την αντιμετώπιση του **HIV**. Η επιτυχία της ART υπογράμμισε τα πλεονεκτήματα της χορήγησης συνδυαστικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων (**combination therapy**) έναντι της μονοθεραπείας.

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

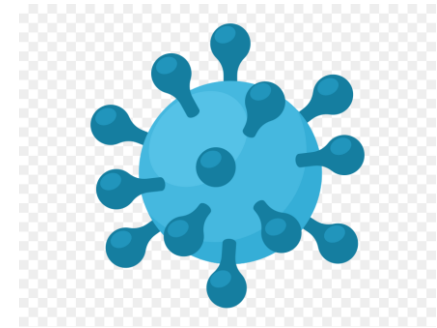
Πρόσφατα, η εντατική διεπιστημονική έρευνα σε ακαδημαϊκό χώρο και βιομηχανία έναντι του **SARS-CoV-2** συγκέντρωσε μεγάλο όγκο πληροφοριών που θα αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη των επόμενων αντιϊκών φαρμάκων.

**Το ιδεώδες αντιϊικό φάρμακο αναστέλλει μια κρίσιμη και συντηρημένη ιική λειτουργία, διασφαλίζοντας θεραπευτικό εύρος.**

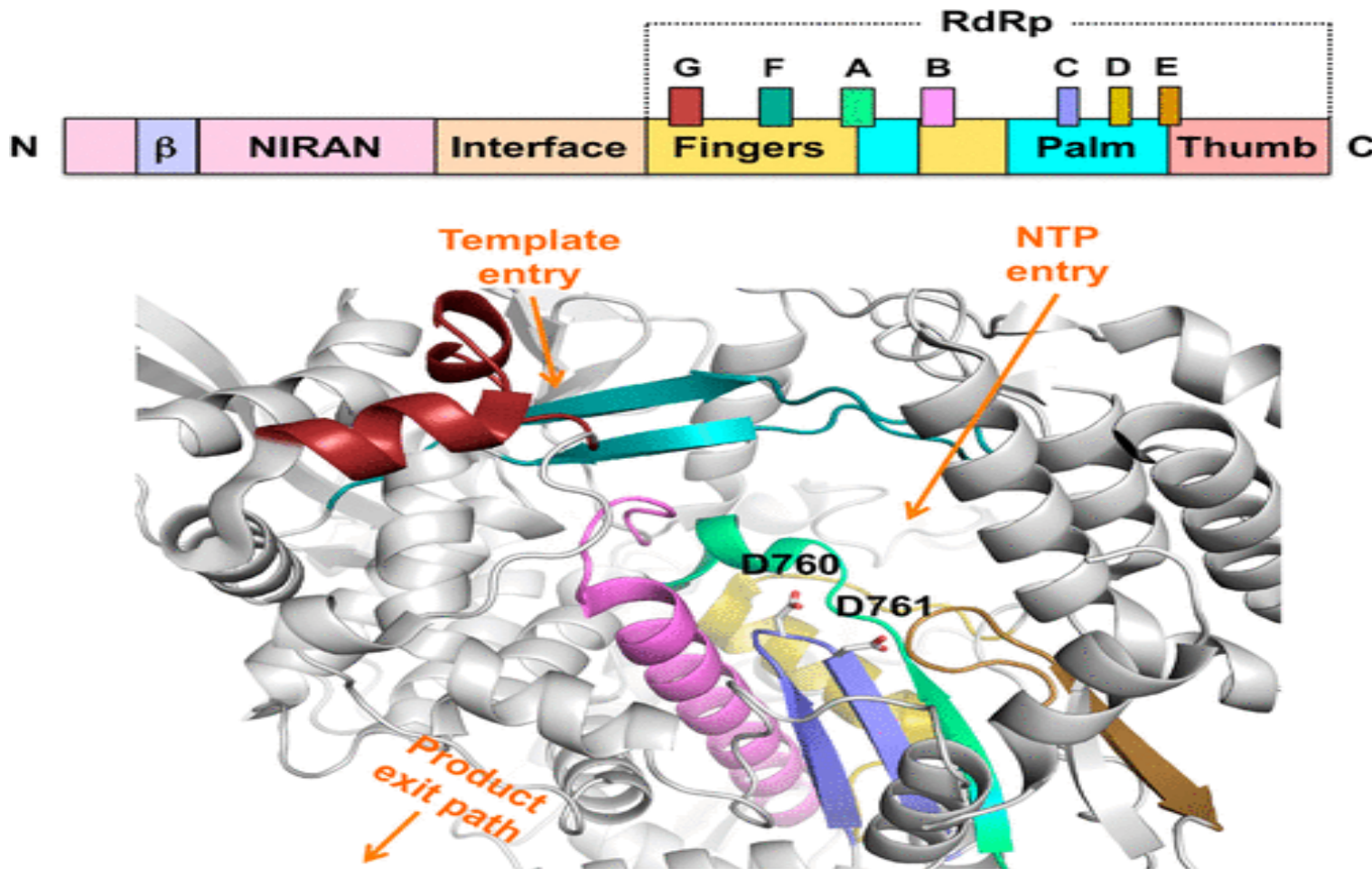
Προτιμάται μικρό μόριο με ελέγξιμες, βελτιστοποιημένες φ/χ, φ/κ και μεταβολικές ιδιότητες.

Στη διαδικασία ανάπτυξης λαμβάνονται υπόψη:

- **Η βιοδιαθεσιμότητα, ανάλογα με την οδό χορήγησης.**
- **Το φάσμα δραστηριότητας (κατά προτίμηση ευρύ *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.

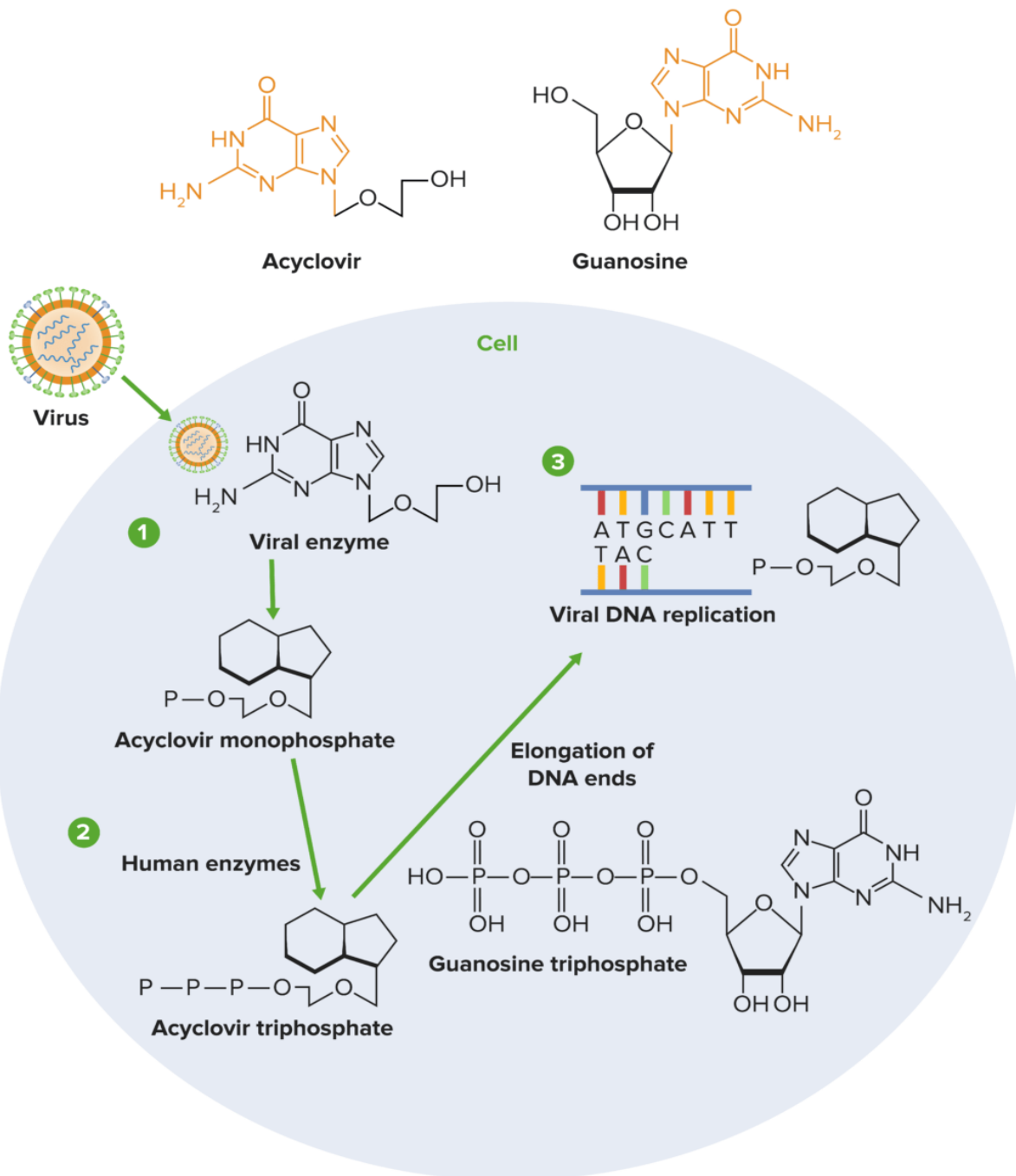
Τα διατηρημένα μοτίβα (A-G) του ενεργού κέντρου χρωματίζονται όπως στο διάγραμμα. Τα καταλυτικά ασπαρτικά υπόλοιπα **D760** και **D761** συνδέονται με τα αντισταθμιστικά ιόντα.

## A gold standard

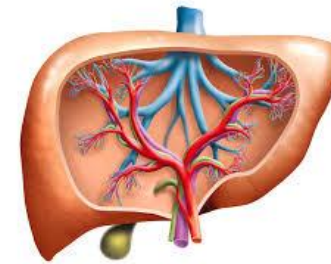
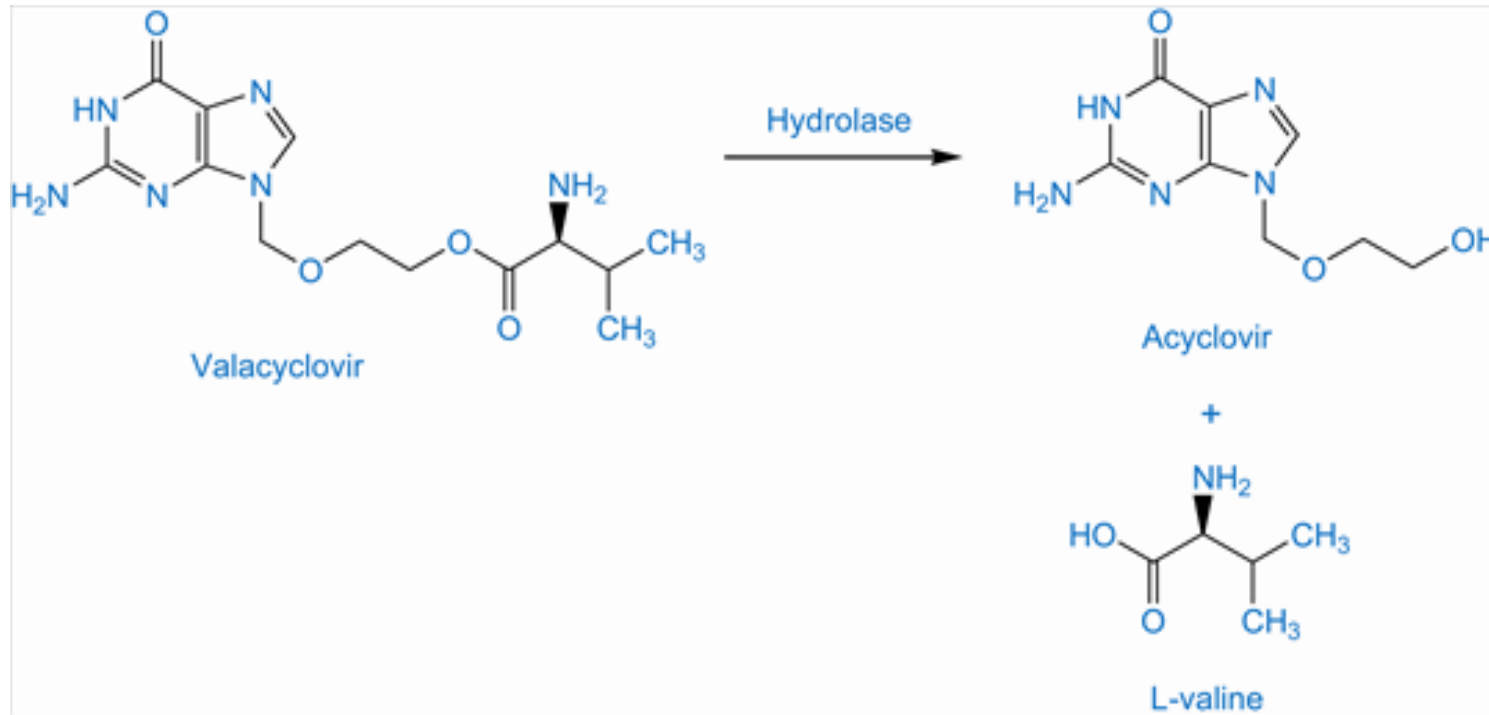
Το **Acyclovir**, συνθετικό «άκυκλο» ανάλογο της γουανοσίνης, υπήρξε το πρώτο συστηματικά χορηγούμενο αντιϊικό φάρμακο, έναντι μολύνσεων με DNA ερπητοϊούς (HSV-1, HSV-2, VZV).

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.

Το Acyclovir triphosphate δεν διαθέτει 3'-OH και δρα ως **chain terminator**.

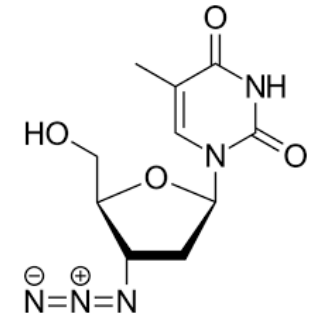
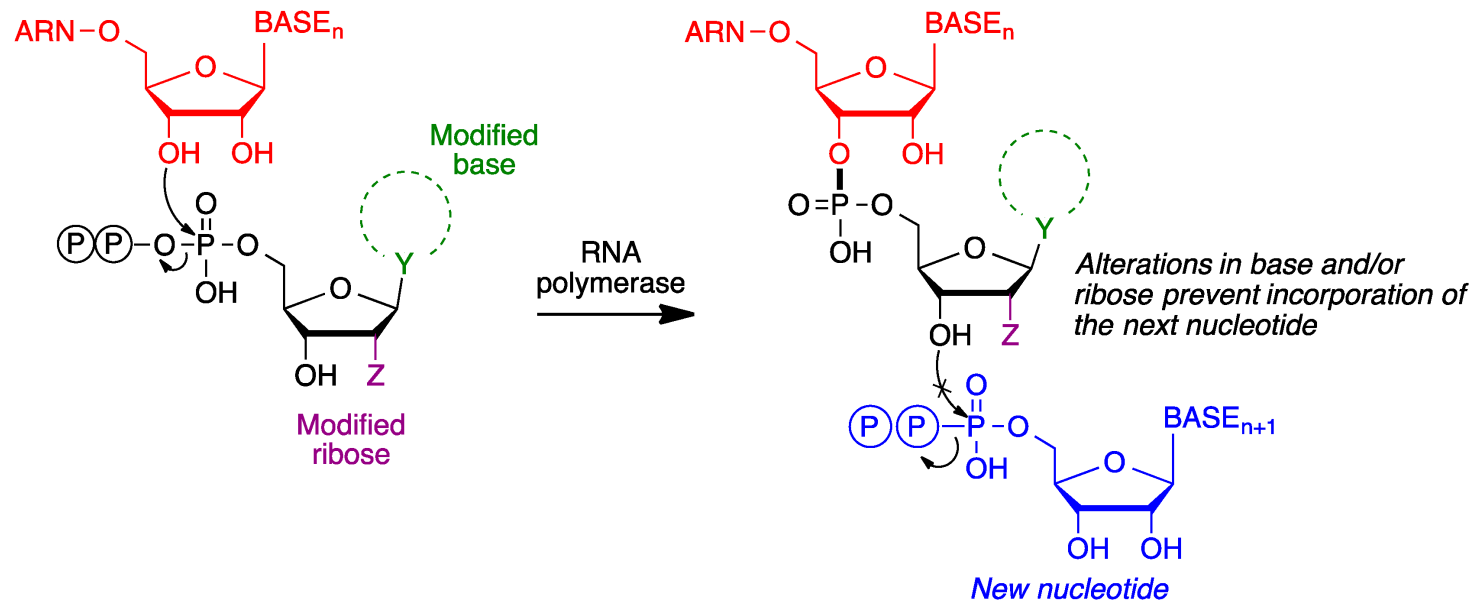


## Μειονέκτημα: μέτρια φαρμακοκινητική συμπεριφορά



→ **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.

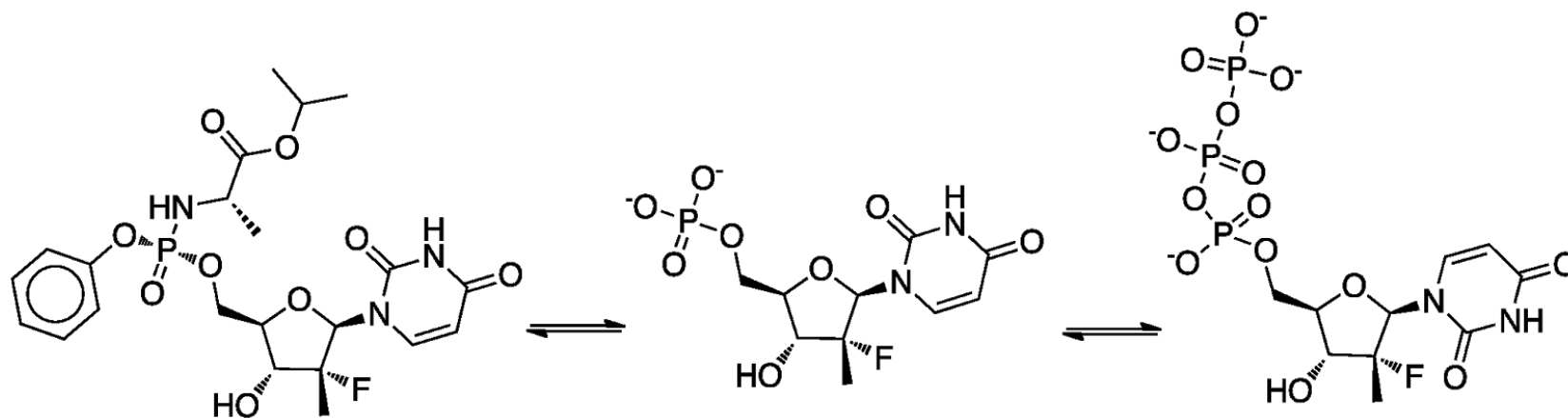
### Growing RNA chain



**Νουκλεοζιτικοί αναστολείς:** επιτρέπονται μόνο μικρές τροποποιήσεις στην ετεροκυκλική βάση, ή στο σακχαρικό τμήμα που δεν αναιρούν την ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ μεταβολική ενεργοποίηση. Μηχανιστικά, εμπίπτουν στις εξής κατηγορίες:

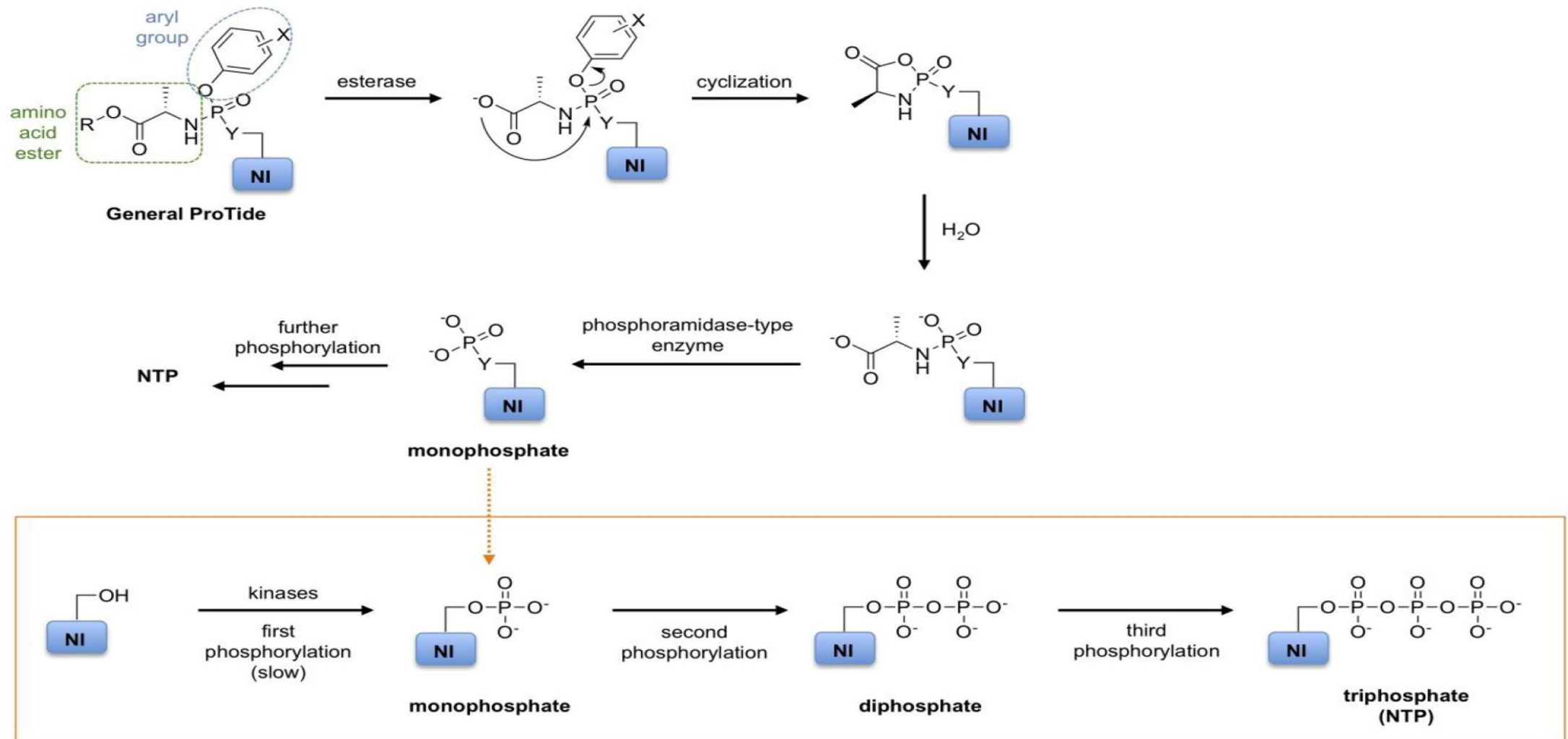
- **Υποχρωτικοί αναστολείς της επιμήκυνσης (obligate chain terminators):** όταν δεν διαθέτουν 3'-OH.
- **Μη υποχρωτικοί αναστολείς της επιμήκυνσης (nonobligate chain terminators):** αν και διαθέτουν 3'-OH, η διπλανή υποκατάσταση εμποδίζει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο.
- **Μεταλλαξιγόνοι παράγοντες:** όταν ενσωματωθούν προκαλούν λάθη στη προσθήκη των δομικών λίθων της συμπληρωματικής αλυσίδα (mismatch in base pairing). Η αύξηση του ρυθμού μετάλλαξης προκαλεί γονιδιωματική αστάθεια και την εμφάνιση μη βιώσιμων ιικών γονιδιωμάτων.

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

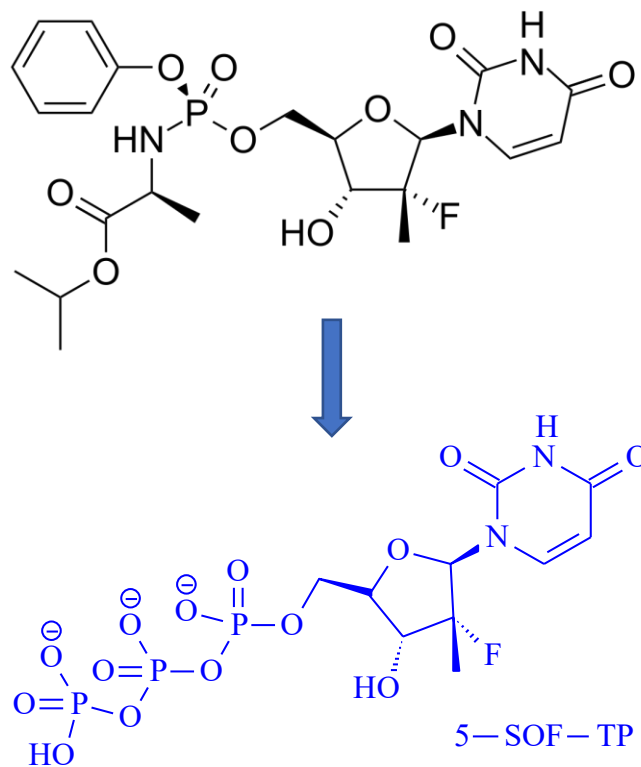


**Σχεδιασμός προφαρμάκων ProTide (Prodrug nucleotide):** είναι ουδέτερα **αρυλοξυφωσφοραμιδικά** παράγωγα, που αναγνωρίζονται από τους μεταφορείς LAA και μεταβολίζονται ενδοκυτταρικά προς το αντίστοιχο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο.

Η τεχνική εφαρμόστηκε επιτυχώς στην ανάπτυξη φαρμάκων έναντι της ηπατίτιδας.



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



**Sofosbuvir: το φάρμακο που απέδειξε 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

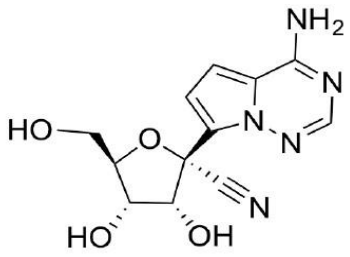


## Αναστολείς της SARS-CoV-2 RdRp: ένα επιτυχές drug repurposing.

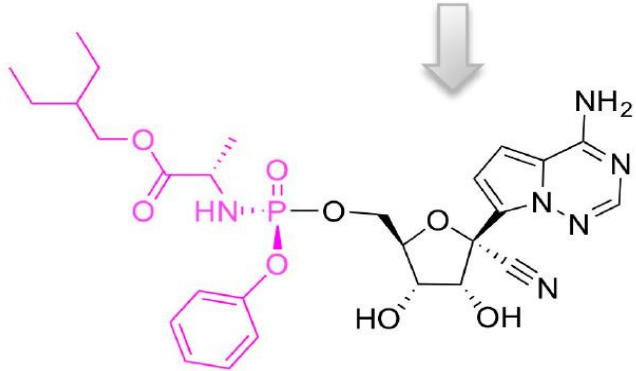
Το **Remdesivir** είναι αντίστοιχο νουκλεοτιδικό φωσφοραμιδικό παράγωγο με δράση ευρέως φάσματος έναντι RNA ιών (HCV, RSV, Ebola, SARS-CoV). Επιλέχθηκε

- 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).

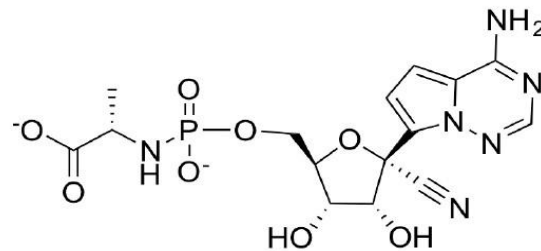
Τον **Οκτώβριο 2020** έλαβε άδεια κυκλοφορίας (FDA) ως ενέσιμη θεραπεία ασθενών με **SARS-CoV-2**. Αποτελεσματικό αν ληφθεί έγκαιρα (<7 ημέρες από την έναρξη συμπτωμάτων).



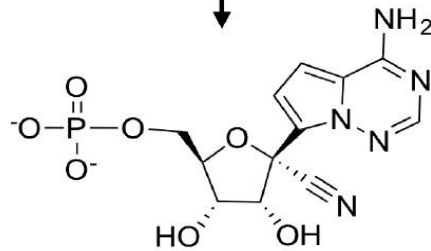
19



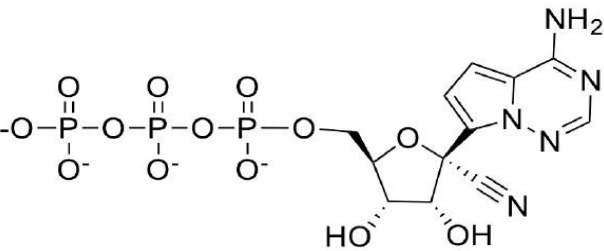
Remdesivir



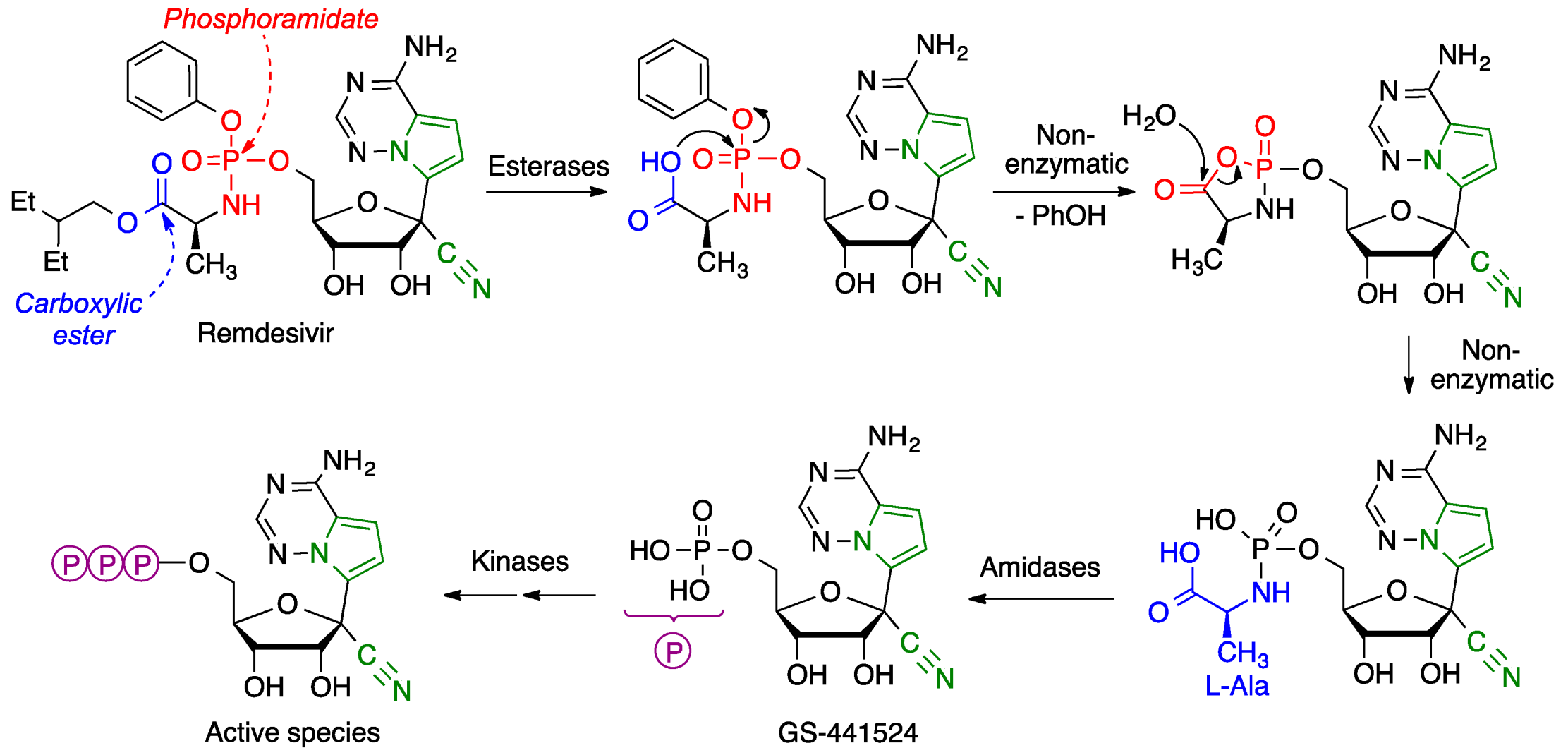
20



21



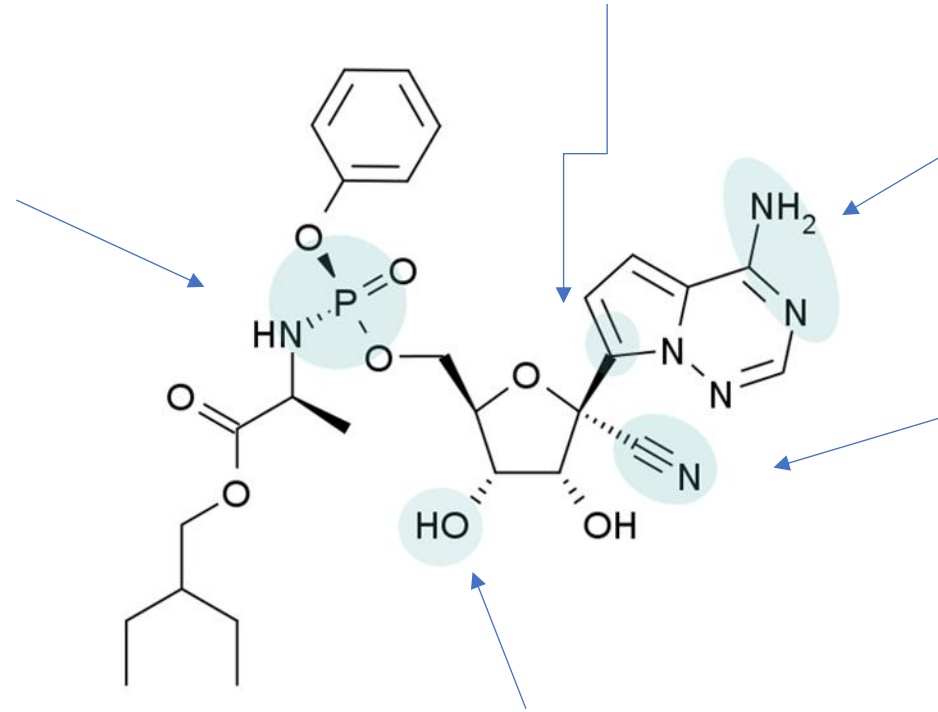
22



Μηχανισμός μεταβολικής ενεργοποίησης του Remdesivir

Φωσφοραμιδικό  
προφάρμακο

C-νουκλεοζίτης

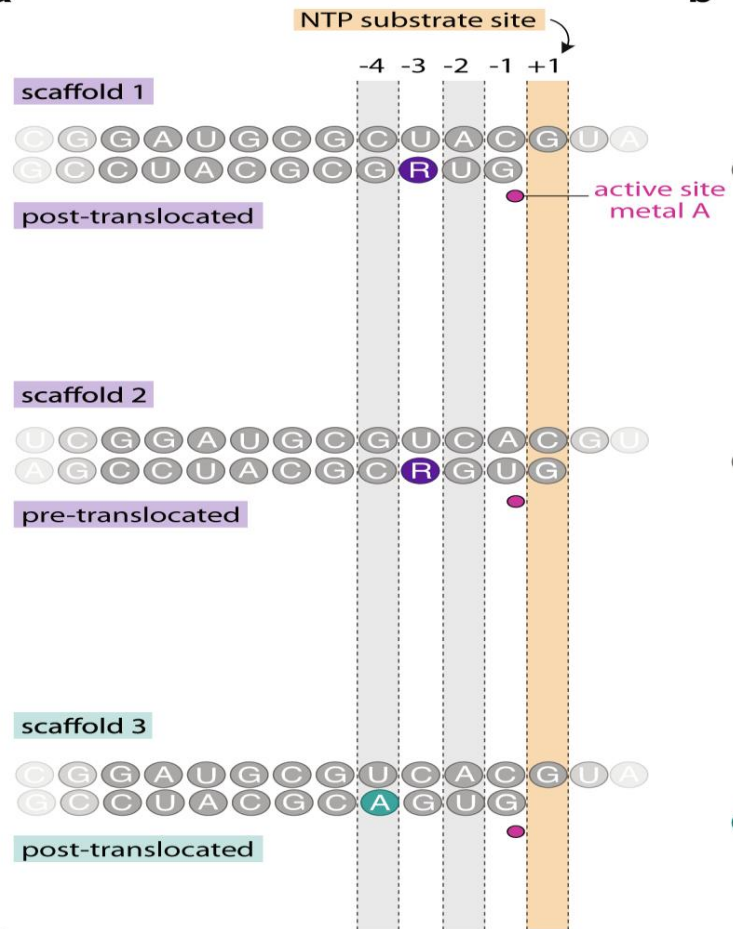
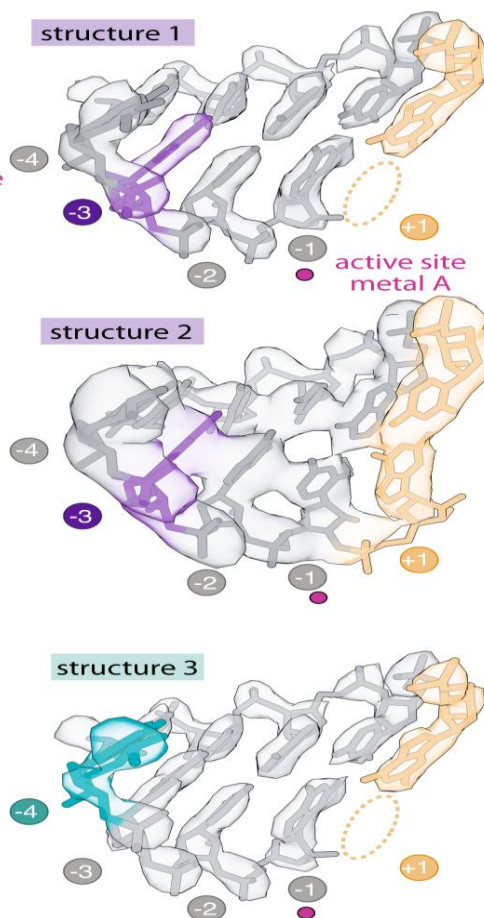
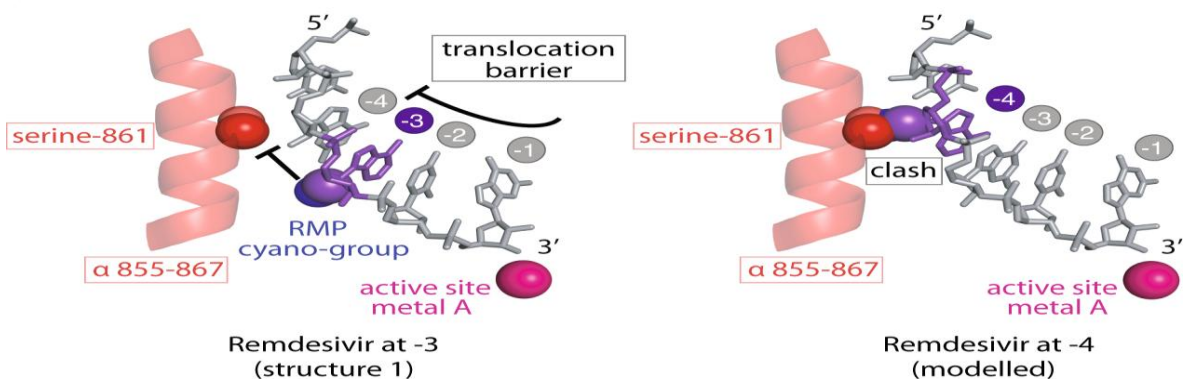


Η πυρρολοτριαζίνη είναι βιοϊσοστερής της αδενίνης. Η πρωτοταγής αμινομάδα δίπλα στο ετεροκυκλικό άζωτο αποτελεί μοτίβο αναγνώρισης και ανάπτυξης δH με την ουρακίλη

Αύξηση εκλεκτικότητας: η παρουσία του ογκώδους 1'-CN ευνοεί τη μεταγραφή του μικτού RNA, ενώ 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

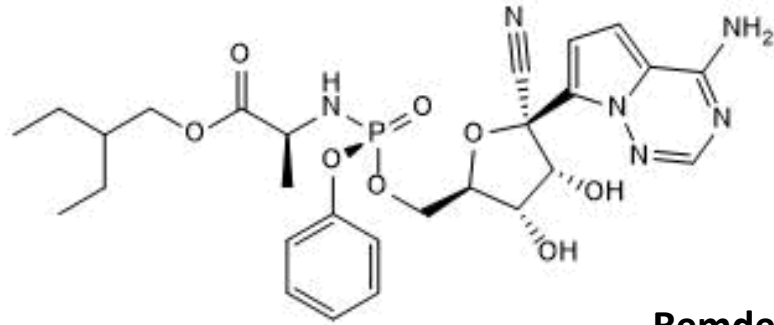
**a****b****c**

**Μηχανισμός δράσης του remdesivir.** Μετά την ενσωμάτωση η RdRp προσθέτει τρία πρόσθετα νουκλεοτίδια, αλλά στη συνέχεια σταματά, καθώς η παρουσία του νιτριλίου στη 3-θέση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας δημιουργεί στεreoχημική παρεμπόδιση με μια σερίνη (Ser861) του ιικού ενζύμου των κορωνοϊών (άλλος μηχανισμός ισχύει για άλλους ιούς).

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

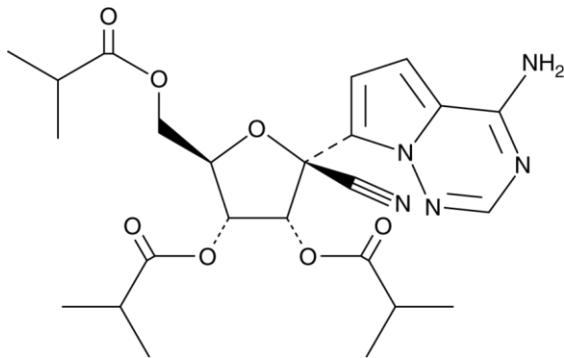
**Στο επόμενο βήμα ελέγχονται κλινικά:**

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

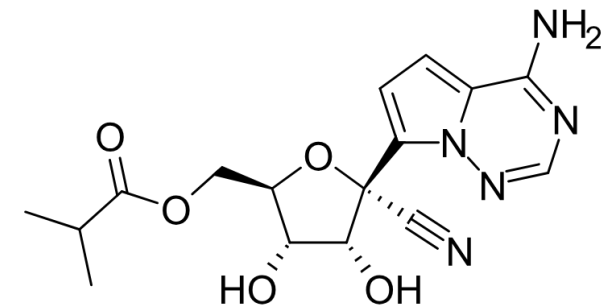


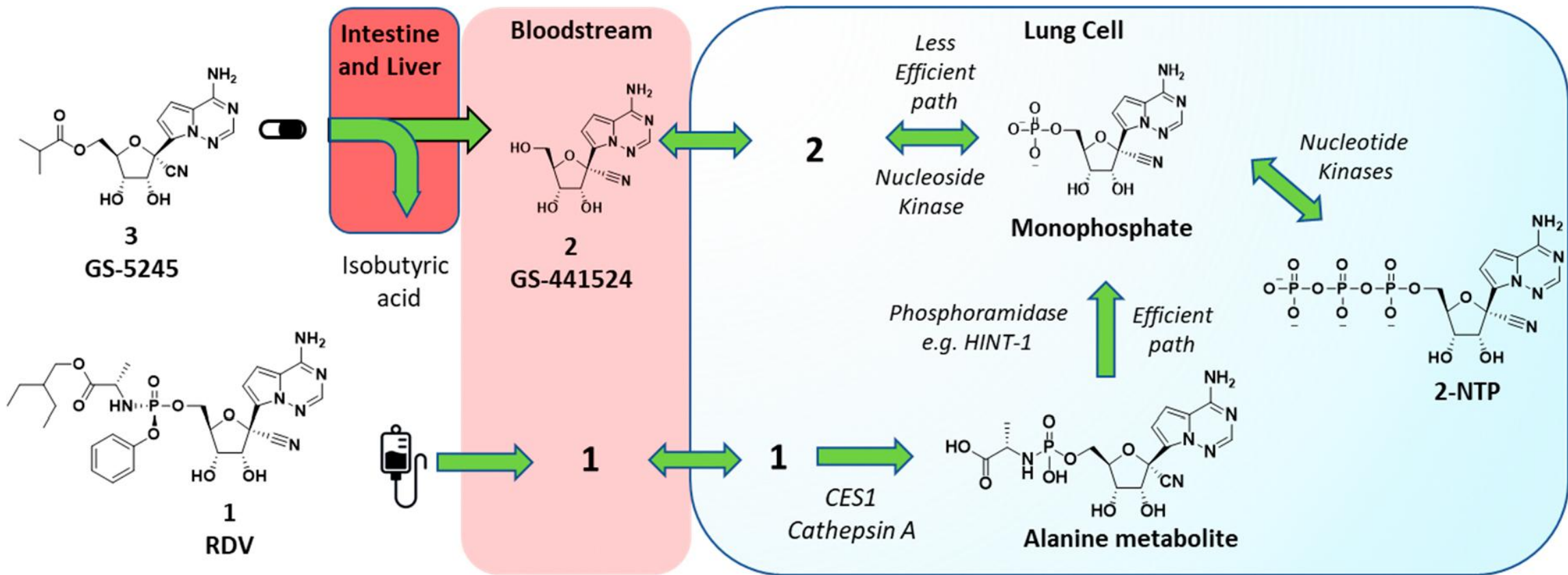
**Remdesivir**

**Mindeudesivir  
(appr. China)**

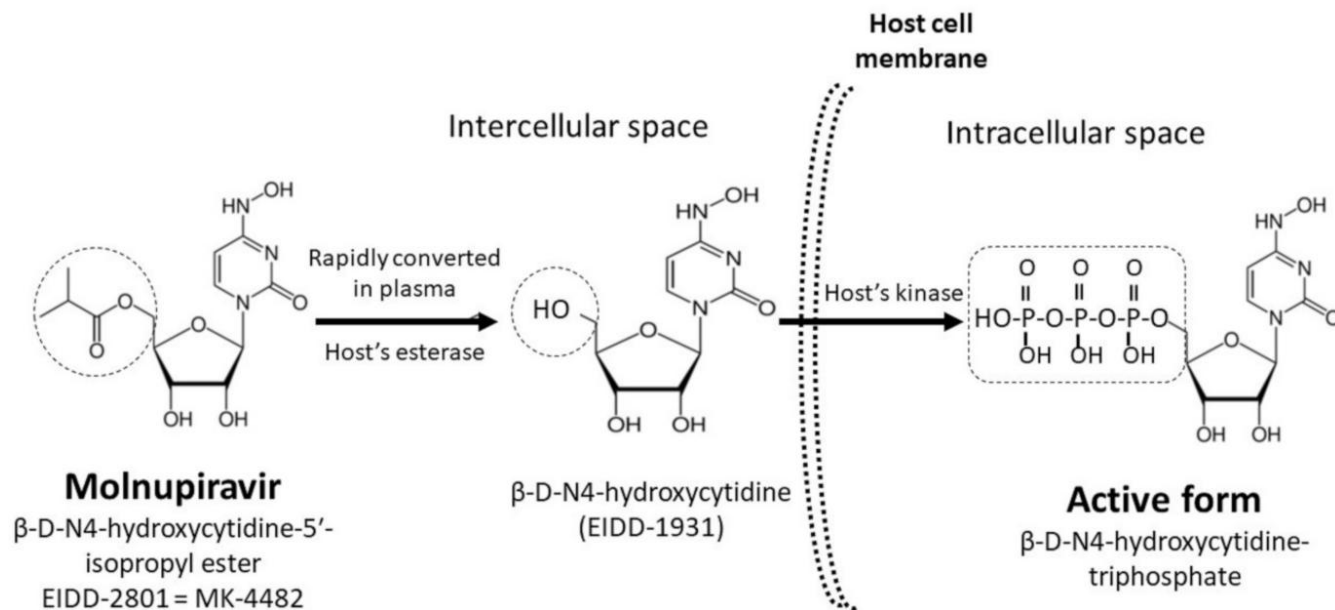


**Obeldesivir  
(φάση III)**





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



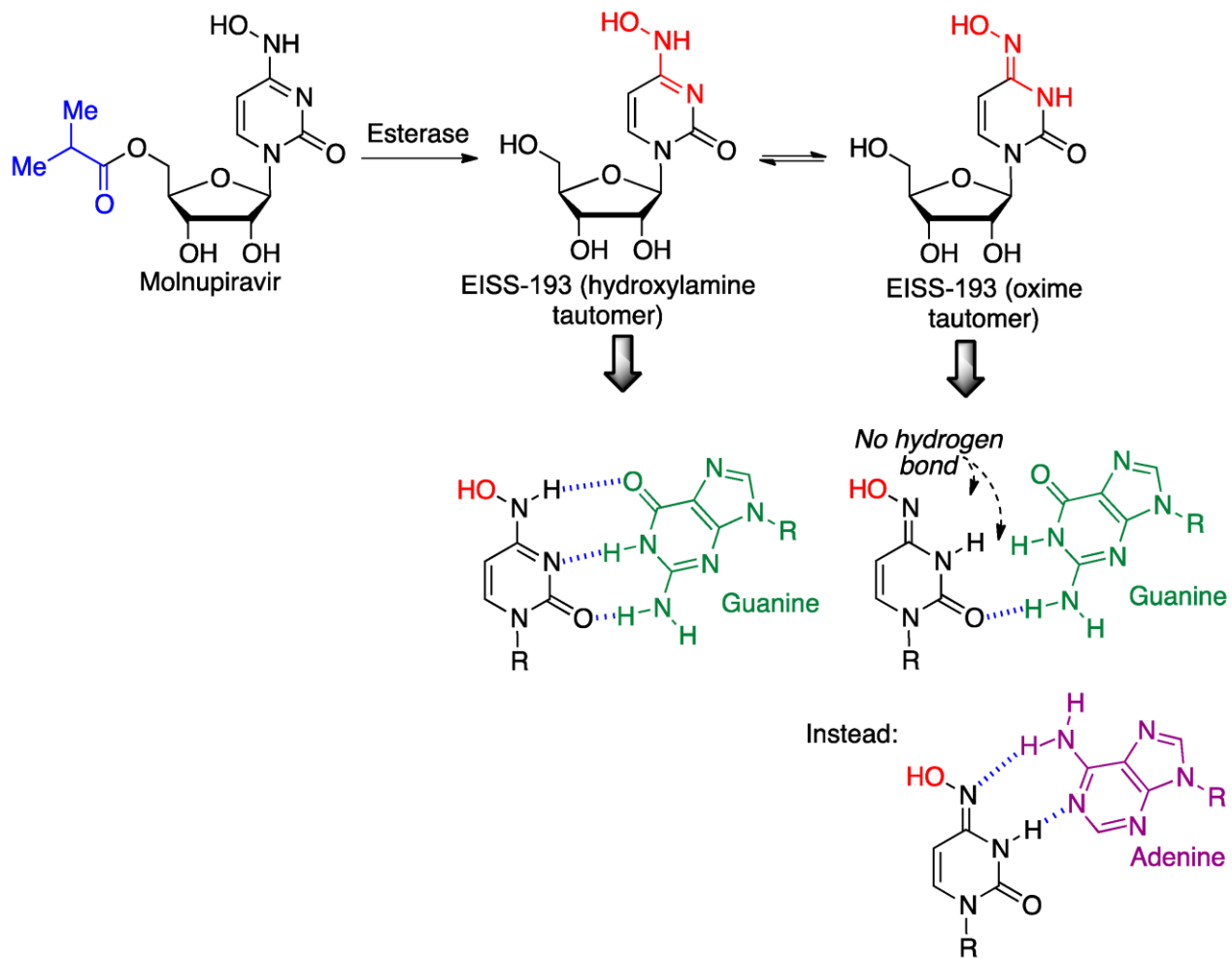
**Φάρμακο για την influenza, με δράση ευρέως φάσματος έναντι RNA ιών.**

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

**Μετά από επιτυχείς κλινικές δοκιμές πήρε (FDA: 12/2021) άδεια κυκλοφορίας 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.

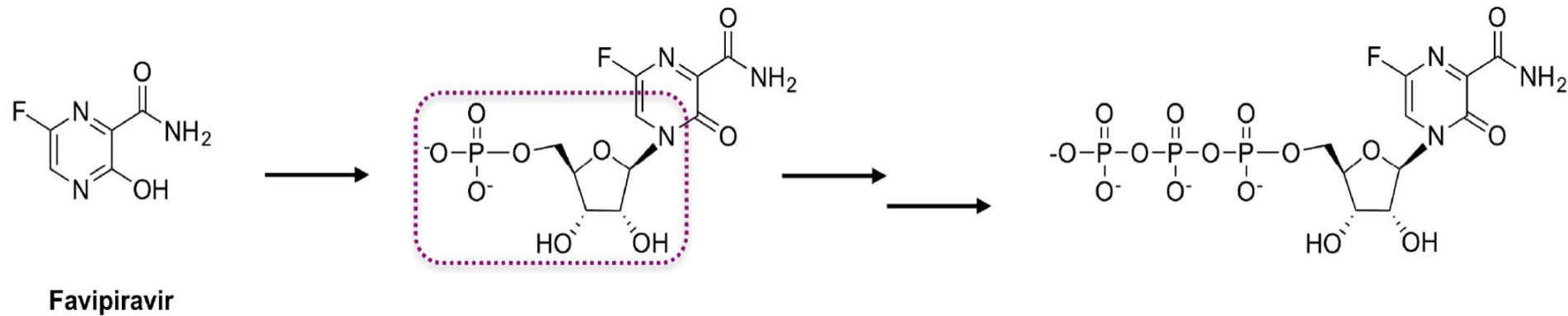
Το Molupiravir ενσωματώνεται στη θέση C ή U και βρίσκεται σε δύο ταυτομερείς δομές:

- 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)

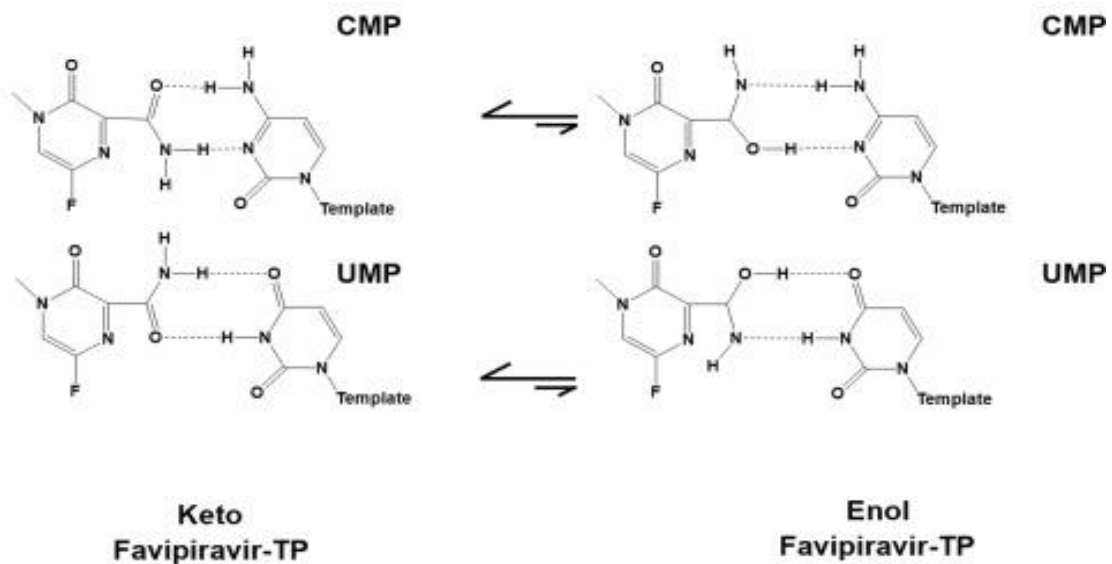


Φάρμακο (στην Ιαπωνία) για την influenza με δράση ευρέως φάσματος έναντι RNA ιών. Μεταλλαξιγόνο παράγοντας.

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

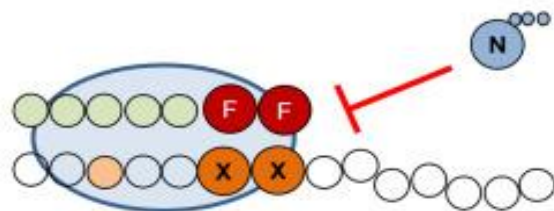
Έλαβε επείγουσα έγκριση σε Ιαπωνία, Κίνα, Ινδία, Ρωσία έναντι του **SARS-CoV-2**.

A



B

Inhibition



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

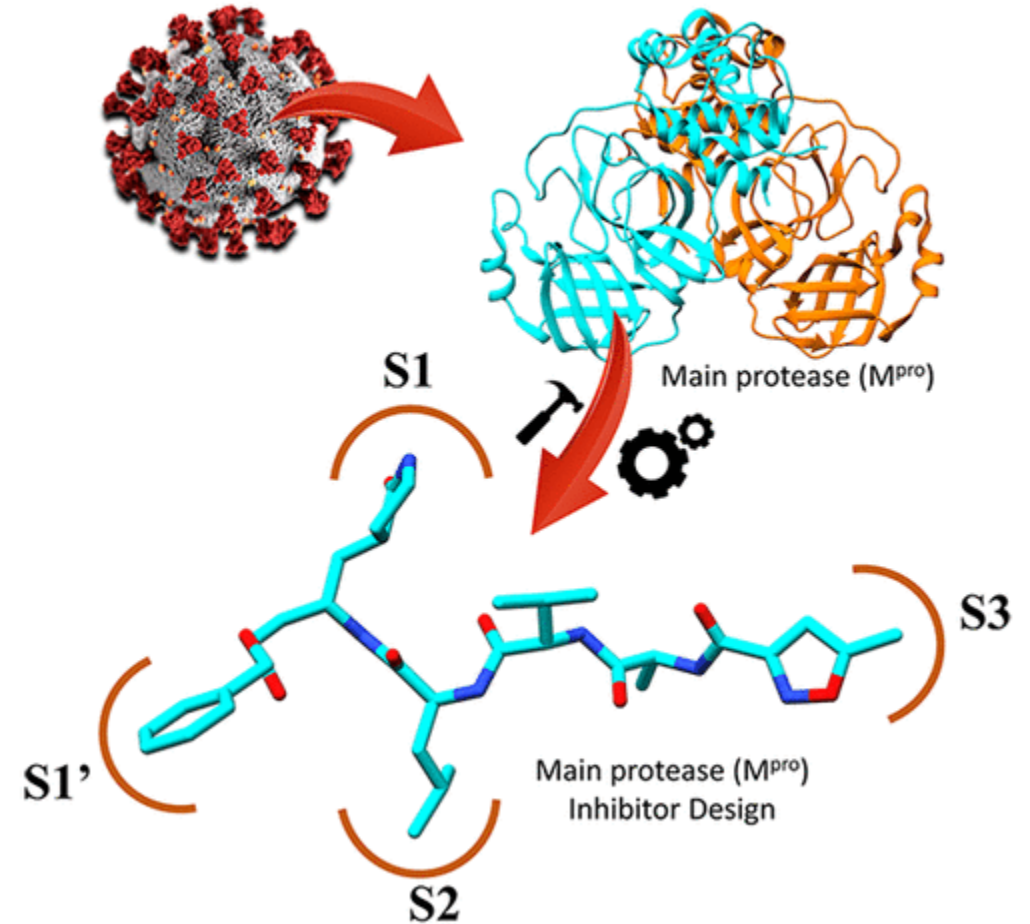
## Αναστολείς πρωτεασών του SARS-CoV2

### Αναστολείς της SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>.

Η M<sup>pro</sup> είναι ελκυστικότερος στόχος από την PL<sup>pro</sup>:

- μικρότερη
- διαφορετικής εκλεκτικότητας (Leu-Gln) από τις ανθρώπινες πρωτεάσες (η PL<sup>pro</sup> 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.



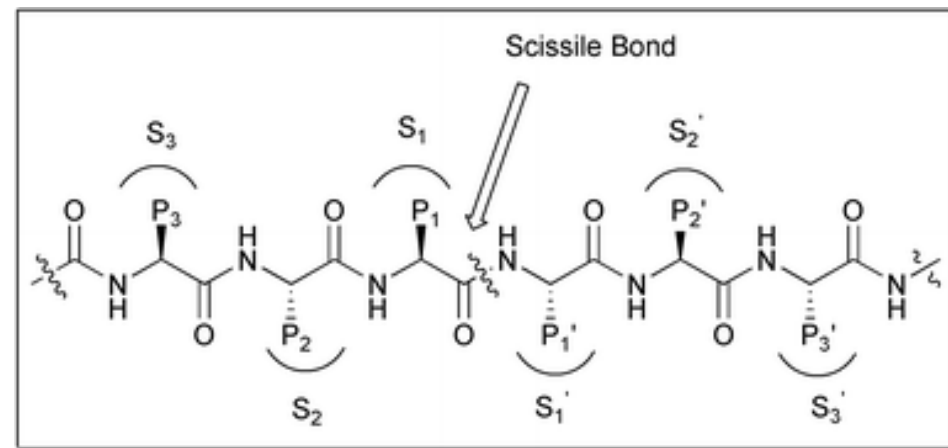
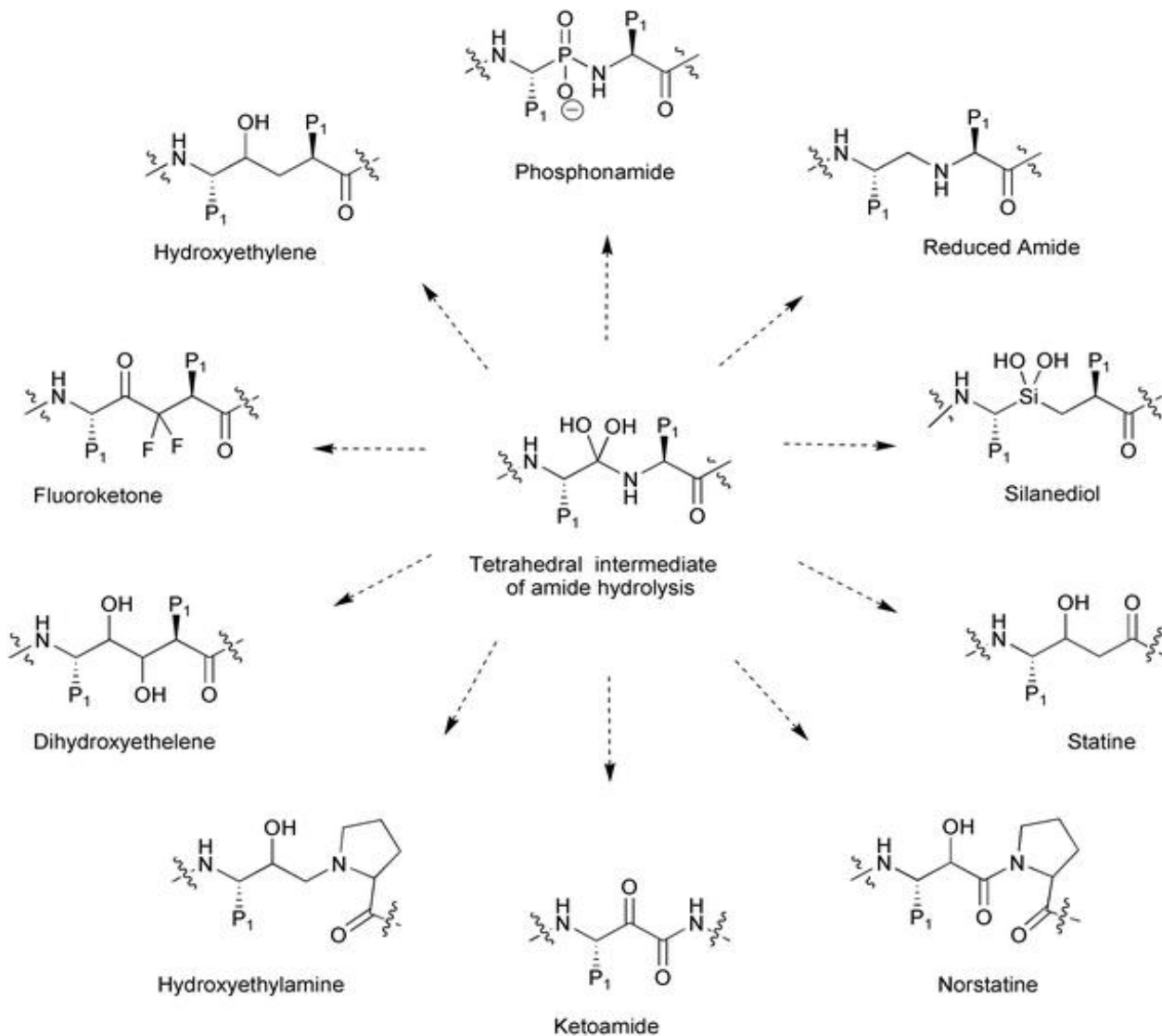
*J. Phys. Chem.* 13(25), 5776–5786, 2022.

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

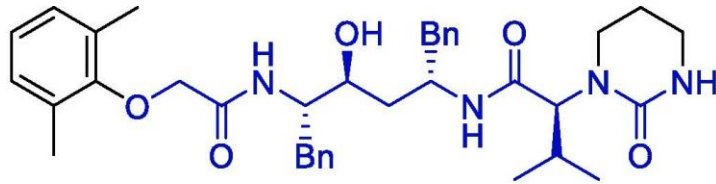
Οι πεπτιδομιμητικοί αναστολείς μιμούνται και ανταγωνίζονται το φυσικό υπόστρωμα (transition-state isosteres) χωρίς να προσφέρουν δυνατότητα υδρόλυσης (ισοστερή πεπτιδικού δεσμού). Οι νεότερες γενιές είναι «λιγότερο πεπτιδικές» ενσωματώνοντας μη φυσικά αμινοξέα ή άλλα δομικά στοιχεία που συνεισφέρουν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

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

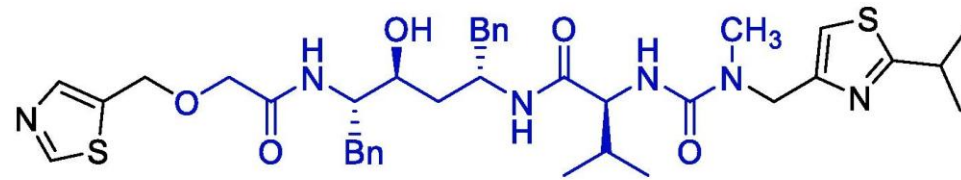
αυξάνοντας όμως συχνά το κόστος της σύνθεσης.



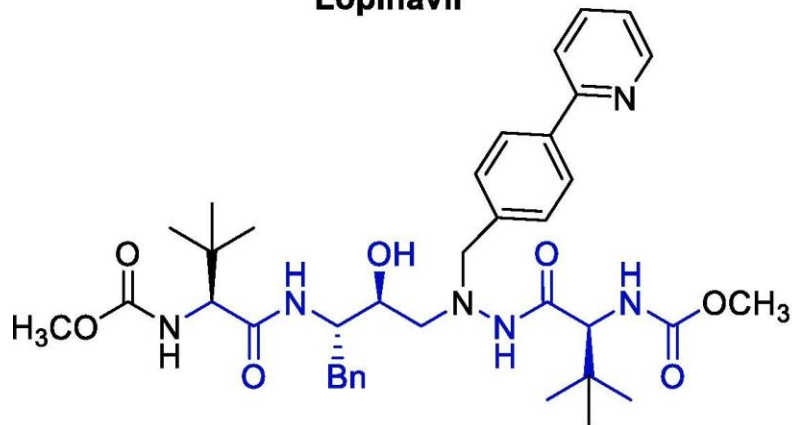
Drug repurposing: αναστολείς της HIV πρωτεάσης → Μη ομοιοπολικοί αναστολείς SARS-CoV-2 Mpro



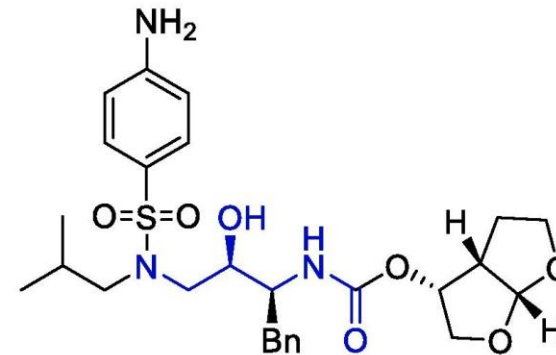
Lopinavir



Ritonavir



Atazanavir

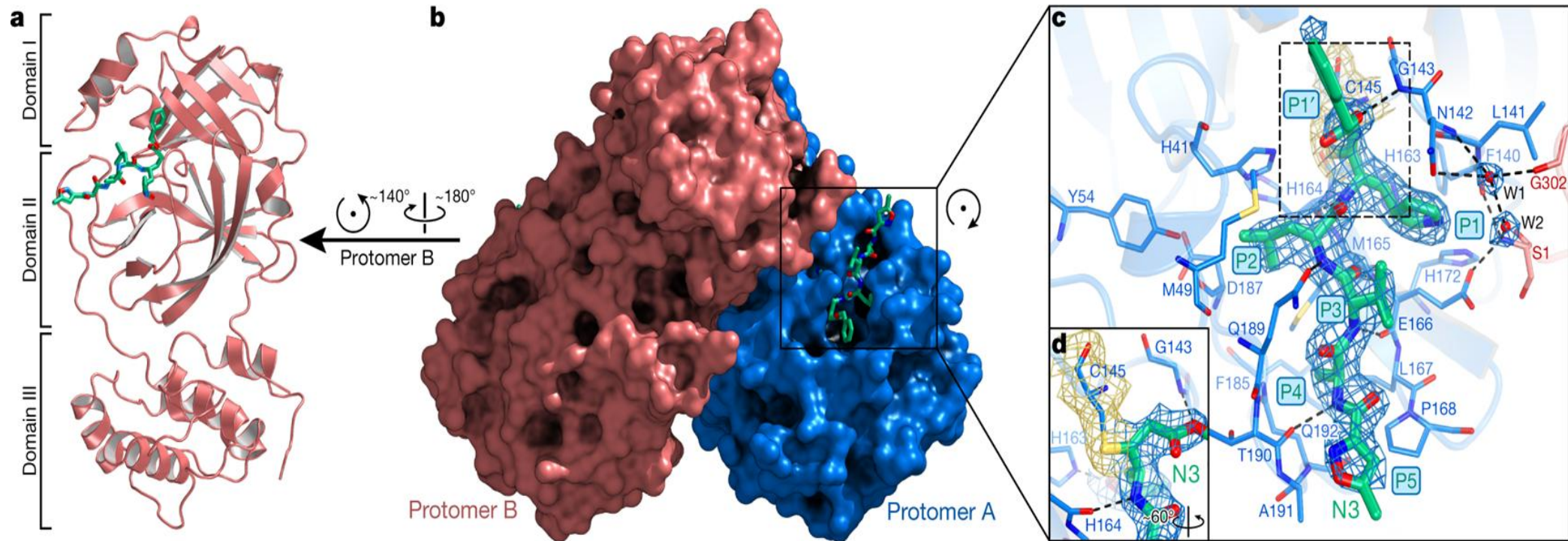


Darunavir

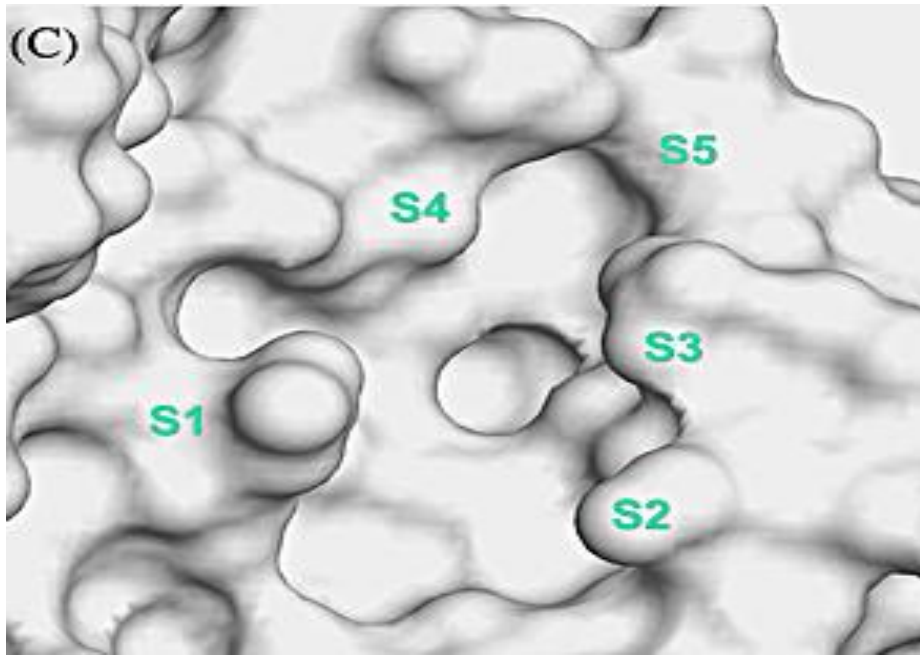
Συνδεόμενοι ανταγωνιστικά στην καταλυτική θέση με δH και μη πολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλούν παραμορφώσεις στους θύλακες και εκτοπίζουν βασικά μόρια νερού, εμποδίζοντας τη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.

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

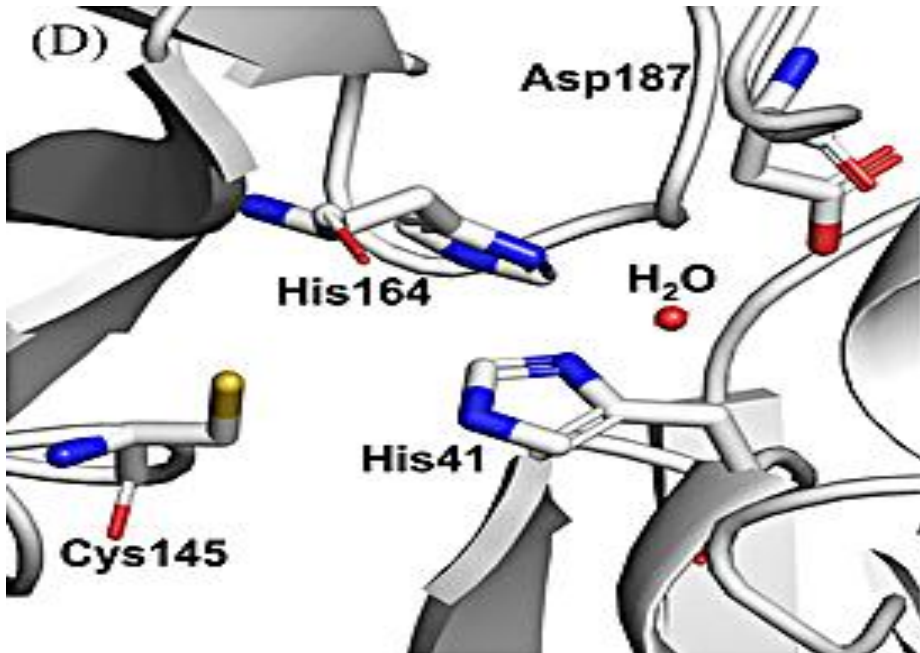
Τα ειδικά σχεδιασμένα φάρμακα είναι αποτελεσματικότερα από τα φάρμακα επαναστόχευσης (repurposed therapeutics).



Η **Mpro** είναι ομοδιμερής υδρολάση κυστεΐνης με 100% ομόλογο ενεργό κέντρο με την **Mpro** του SARS COVID 1. Τα δύο πρωτομερή της (34.21 kDa) έχουν περίπου κάθετη διεύθυνση και αποτελούνται από 3 τομείς (I, II, III). Το ενεργό κέντρο εντοπίζεται στη σχισμή μεταξύ των β πτυχωτών επιφανειών των I και II. Ο III που αποτελείται κυρίως από α-έλικες σταθεροποιεί το ομοδιμερές (γέφυρα άλατος Glu-Arg), ενώ συμβάλλει και στη καταλυτική διαδικασία.



Οι ομάδες του υποστρώματος εκατέρωθεν του δεσμού που διασπάται (P1', P1, P2, P3, P4, P5) αλληλεπιδρούν με έξι κοιλάδες του ενεργού κέντρου (S1', S1, S2, S3, S4 και S5). Η S1 σχηματίζει εκτεταμένο δίκτυο δ.Η με σημαντικά κατάλοιπα γλουταμίνης της P1. Η S2 είναι βαθύς υδρόφοβος θύλακας με προτίμηση για λευκίνη, ενώ η επίσης υδρόφοβη S4 είναι ρηχή και αλληλεπιδρά με μικρά αλειφατικά κατάλοιπα.



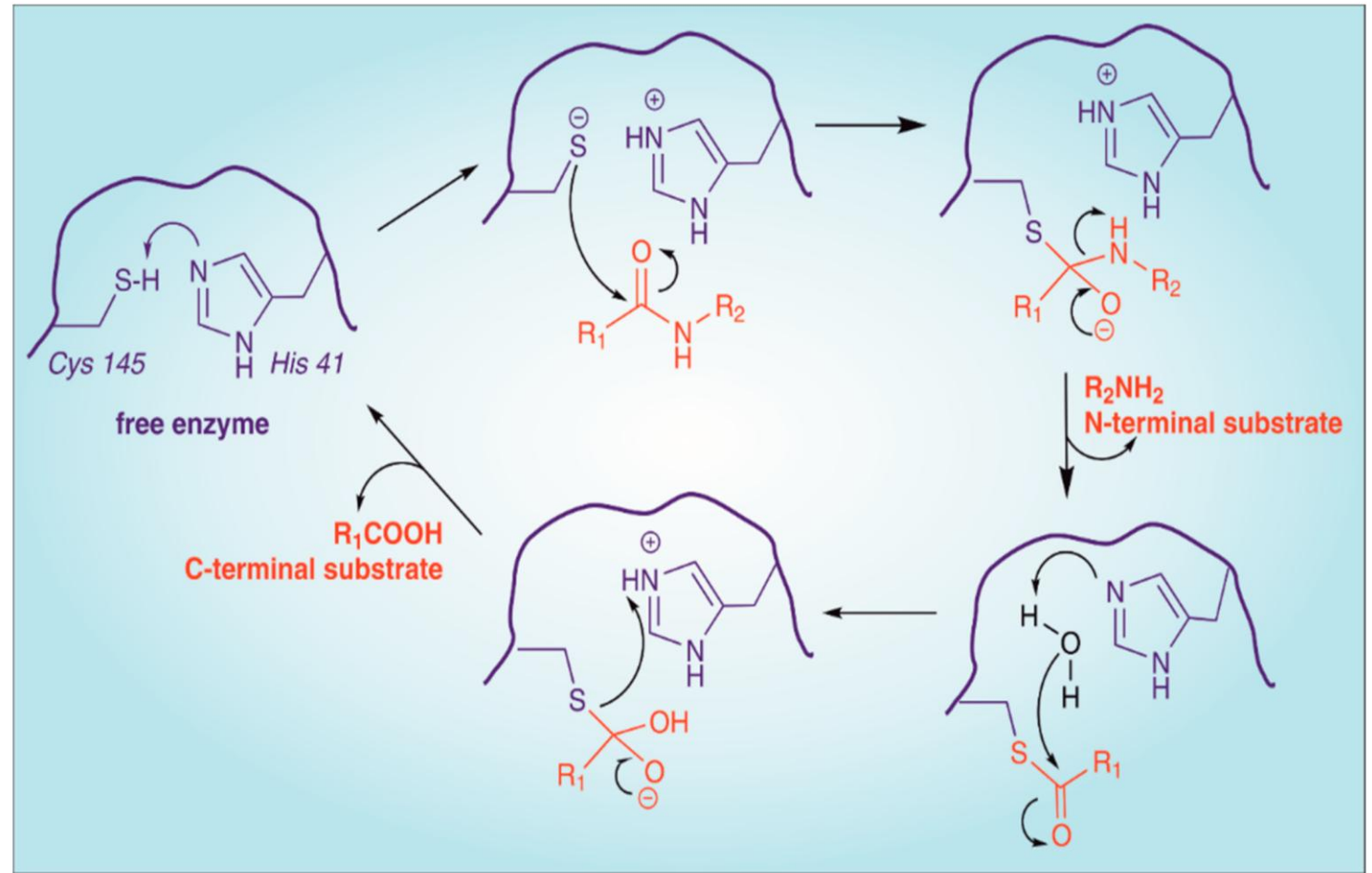
Η διάσπαση των ικών πολυπρωτεϊνών πραγματοποιείται μεταξύ P1'-P1. Το ζεύγος **Cys145-His41** της S1 συμπληρώνεται από ένα H<sub>2</sub>O για τη σύσταση καταλυτικής τριάδας. Το N1 της **His41** σχηματίζει δ.Η με το H<sub>2</sub>O, που συνδέεται επίσης με τα **Asp187** και **His164**. Αυξάνεται η βασικότητα της **His41** που ενεργοποιεί την **Cys145** για την πυρηνόφιλη προσβολή. Ένα δεύτερο H<sub>2</sub>O συνδέεται επίσης ισχυρά με άλλα αμινοξέα (Phe140, His163, Glu166).

→ Μικρά μόρια που σχεδιάζονται ως αναστολείς του ενζύμου όταν εισέλθουν αντί του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο εκτοπίζουν αυτά τα 2 H<sub>2</sub>O: προκύπτει σημαντικό εντροπικό κέρδος για τη σύνδεση τους => επιτυχής ανταγωνισμός του φυσικού υποστρώματος.

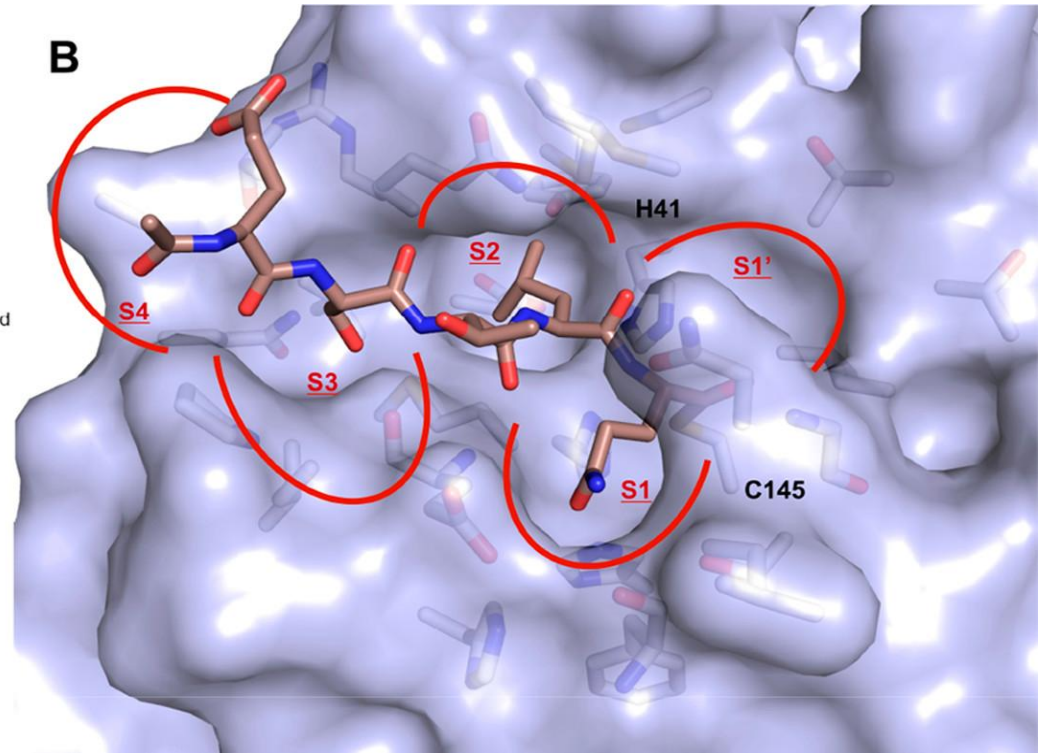
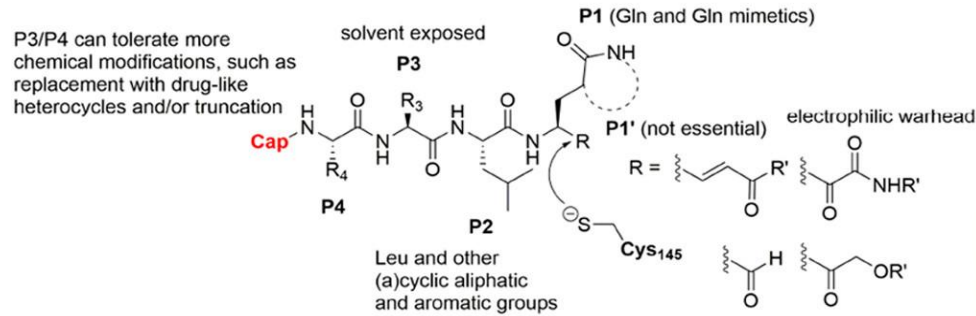
Η πυρηνόφιλη προσβολή του υποστρώματος ή του πεπτιδομιμητικού αναστολέα από την καταλυτική **Cys145** είναι συγχρονισμένη διαδικασία:

- 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**.

- 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:** πρώτα δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο με τη **Cys145** να πλησιάζει σε μια ενσωματωμένη στη δομή τους ηλεκτρονιόφιλη ομάδα (“warhead group”) και σε δεύτερο στάδιο οι ομάδες αντιδρούν για τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού.

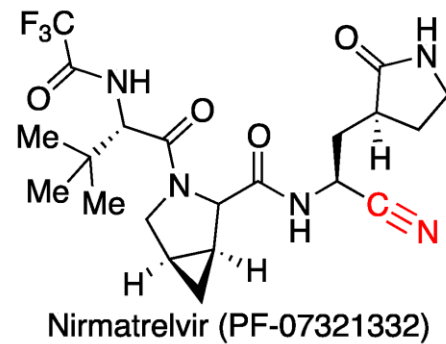
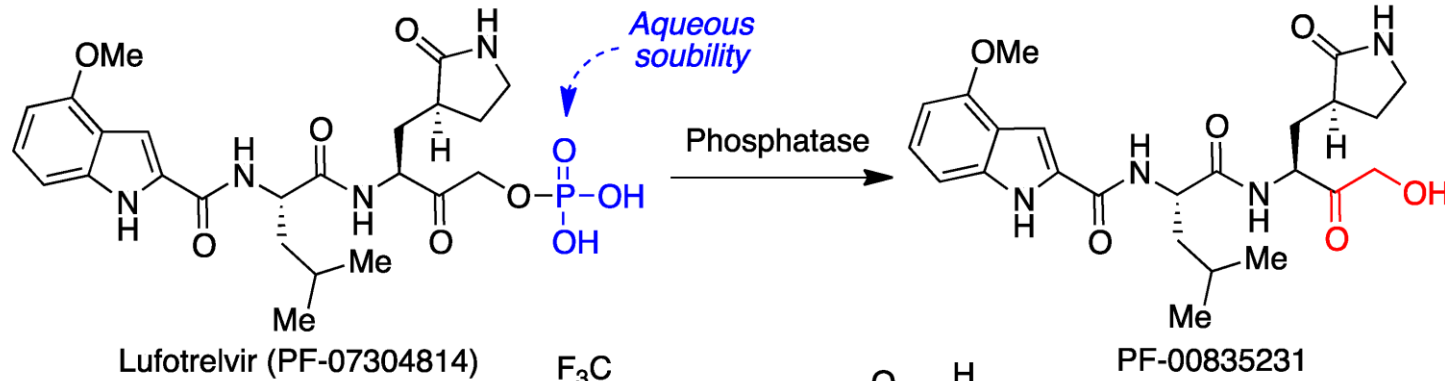
Η συγγένεια του υποστρώματος καθορίζεται κυρίως από τις περιοχές:

**S1**, που εμφανίζει συγγένεια προς κατάλοιπα **Gln** και

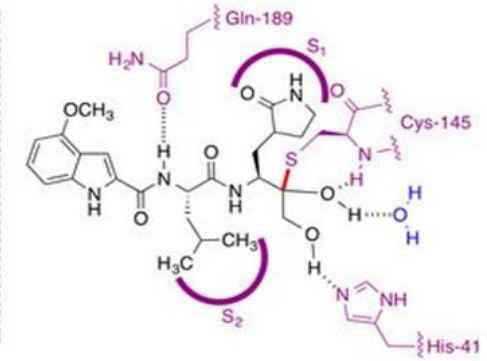
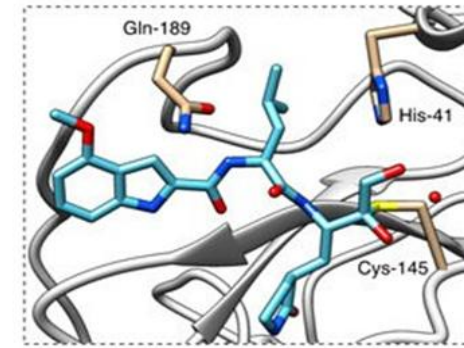
**S2**, που οριοθετείται από υδρόφοβα αμινοξέα. Οι S3/S4 είναι περισσότερο εκτεθειμένες στον διαλύτη.

Στην αντίστοιχη περιοχή **P1** η παρουσία 5- ή 6-μελούς λακτάμης (πυρρολιδόνης) μιμείται τη συντηρημένη **Gln** δίπλα στη θέση υδρόλυσης **P1'** που αποτελεί σημαντικό στοιχείο αναγνώρισης για την **Mpro**.

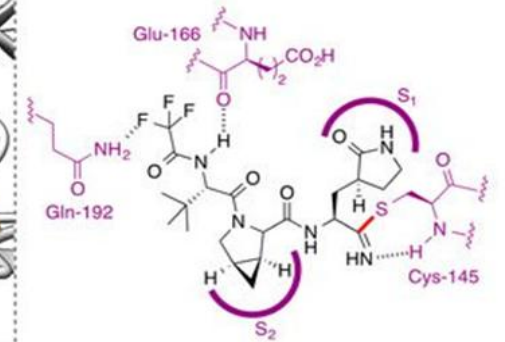
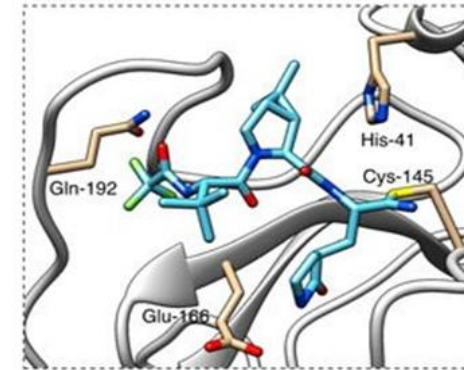
Στην αντίστοιχη περιοχή **P2** υδρόφοβες ομάδες (ισοβουτυλο-, κυκλοεξυλο-, κυκλοπροπυλο-, αρωματικές) μιμούνται την αλληλεπίδραση υδρόφοβων αμινοξέων (**Leu**, **Pro**).



A. PF-00835231



B. Nirmatrelvir

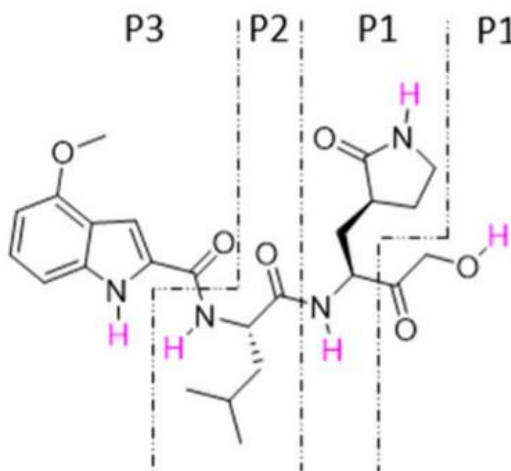


Ο αναστολέας της SARS-CoV1 **Mpro** PF-00835231 λειτουργεί *in vitro* και ως αναστολέας της SARS-CoV2 **Mpro**. Ως πολικό μόριο δεσμεύεται ισχυρά στο εντερικό βλεννογόνο. Χορηγείται **ενδοφλεβίως** ως προφάρμακο ο υδατοδιαλυτός φωσφορικός εστέρας PF-07304814 (Lufotrelvir).

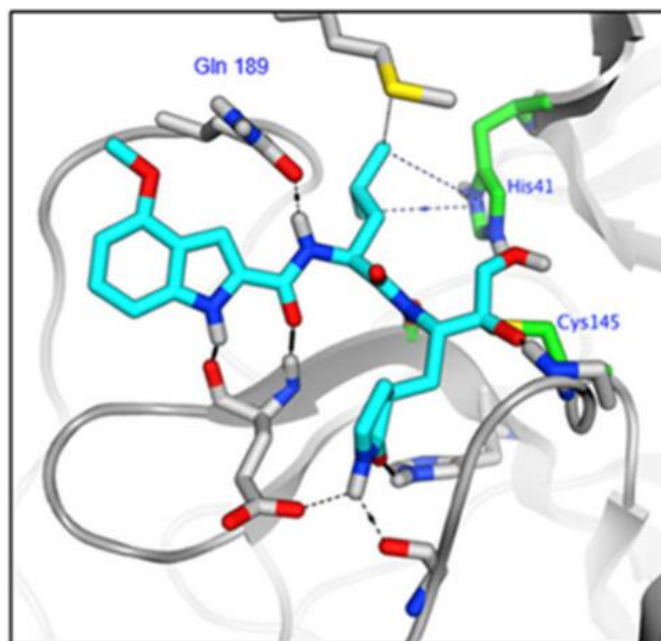
Χρησίμευσε για την ανάπτυξη των βιοχημικών δοκιμών αναστολής της **Mpro** και των δοκιμών αναστολής του SARS-CoV2 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού.

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.**

**PF-00835231, 1**  
Potent MPro inhibitor  
Poor oral bioavailability



|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| H-Bonds          | 5                                    |
| <u>Enz</u> $K_i$ | 0.271 nM                             |
| Cell $EC_{50}$   | 231nM                                |
| HLM              | 7 $\mu$ l/min/mg                     |
| RRCK             | 0.2 $P_{app}$ AB ( $10^{-6}$ cm/sec) |
| <u>LogD</u>      | 1.7                                  |
| Rat $F_{oral}$   | <0.5%                                |

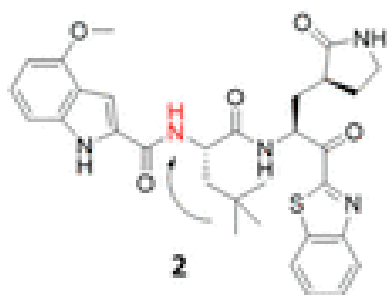


Crystal structure of **1** bound to the MPro via a reversible covalent bond with Cys 145

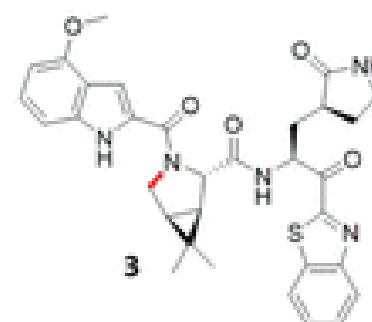
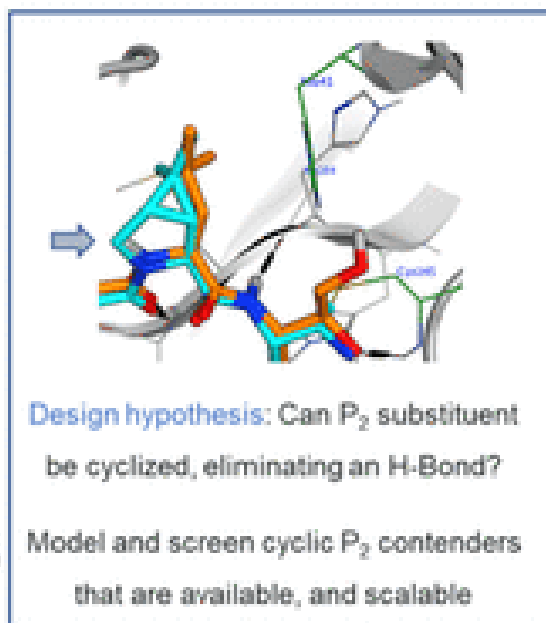
**Strategy to Improve Oral Bioavailability/**

- Systematically remove H-bond donors
- Reduce peptide character
- Improve passive permeability

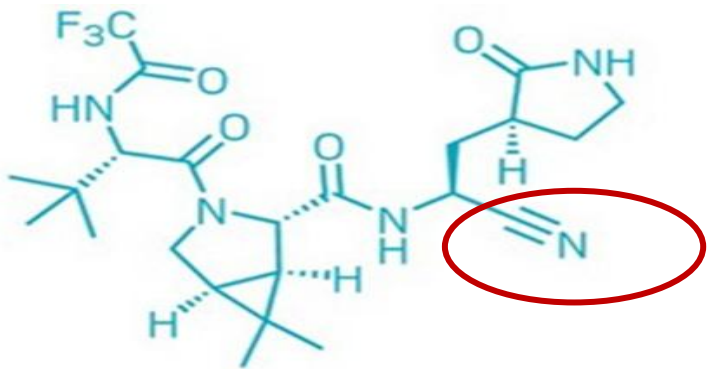
## Challenging Need For Certain H-Bonds in Benzothiazoles



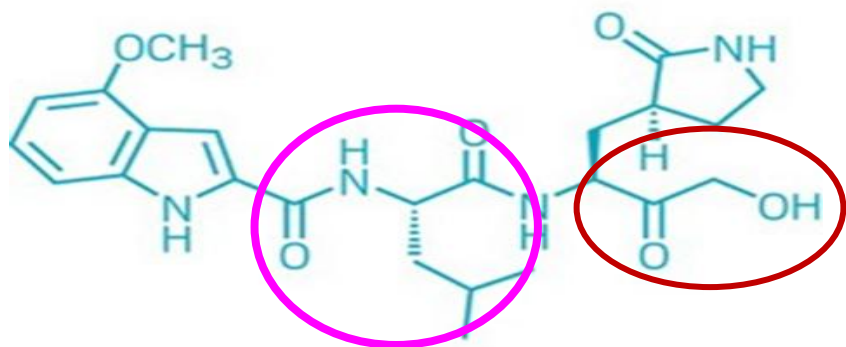
|                            |   |
|----------------------------|---|
| H Bonds                    | 4   |
| Enz Ki                     | 17 nM   |
| Vero Cell EC <sub>50</sub> | 383 nM  |
| HLM                        | <b>350 µl/min/mg</b>                              |
| RRCK                       | 4.3 P <sub>app</sub> AB (10 <sup>-6</sup> cm/sec) |
| LogD                       | 4.0   |
| Rat F <sub>oral</sub>      | <1%   |



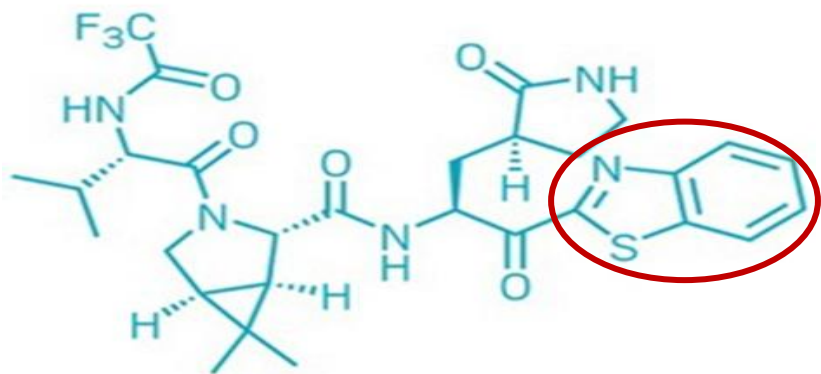
|                            |   |
|----------------------------|---|
| H Bonds                    | 3   |
| Enz Ki                     | 230 nM  |
| Vero Cell EC <sub>50</sub> | 5590 nM   |
| HLM                        | <b>337 ± 9 µl/min/mg</b>                          |
| RRCK                       | 7.3 P <sub>app</sub> AB (10 <sup>-6</sup> cm/sec) |
| LogD                       | 4.2   |
| Rat F <sub>oral</sub>      | NT  |



**Nirmatrelvir  
(PF-07321332)**



**PF-00835231**

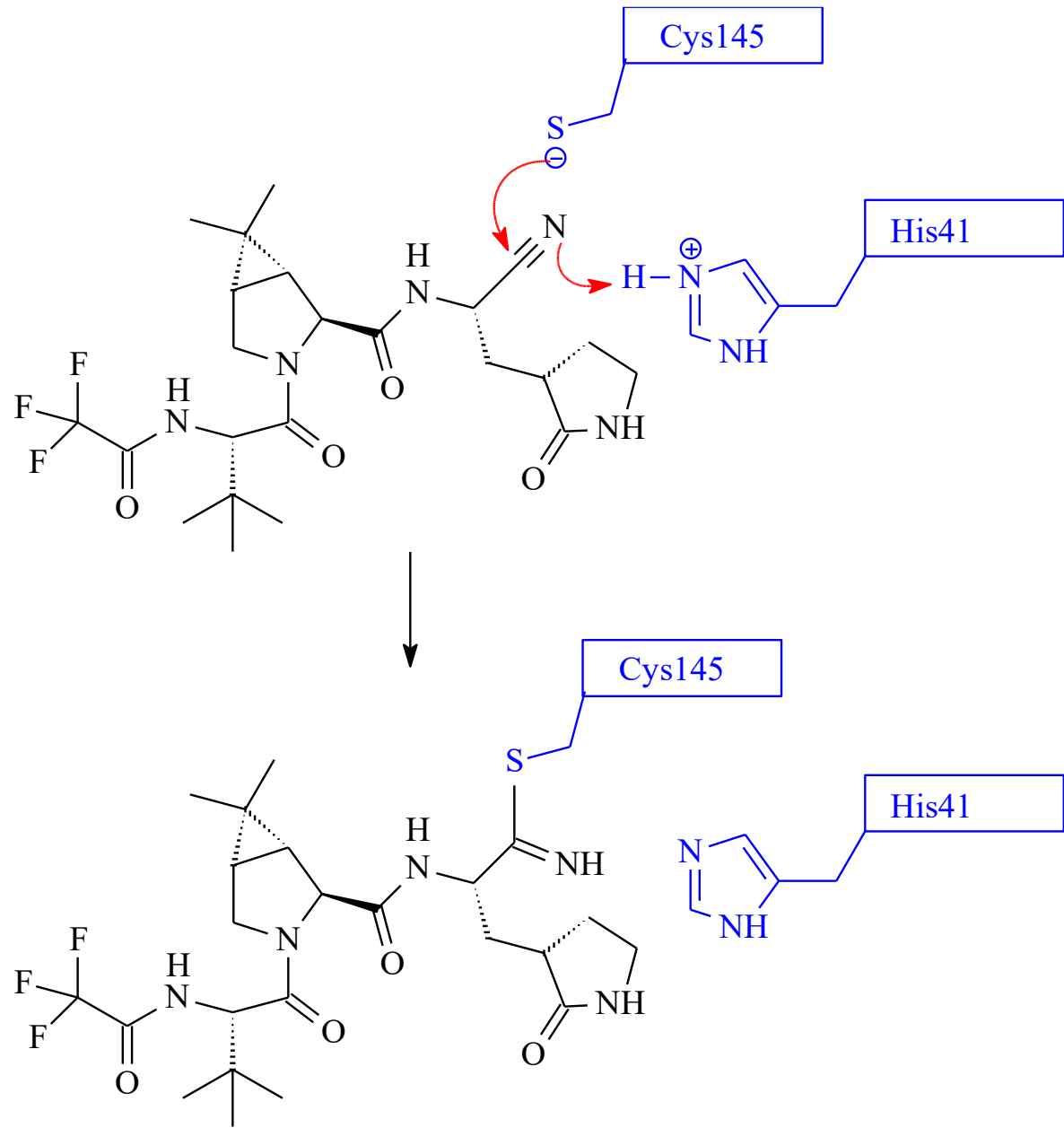


**Benzothiazol-2-yl ketone candidate**

Ελαχιστοποιήθηκε η παρουσία πολλών ομάδων που συμμετέχουν σε δH, 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.H. 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 το πιο ευκίνητο τριφθοροακεταμίδιο που είχωρεί στη κοιλότητα**, με ταυτόχρονη βελτίωση και της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς.

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**.



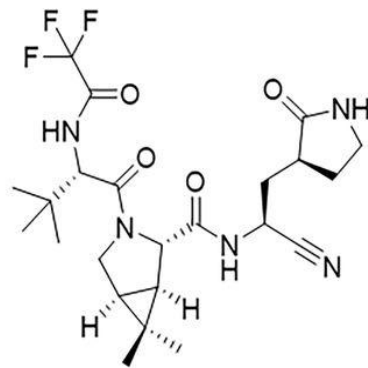
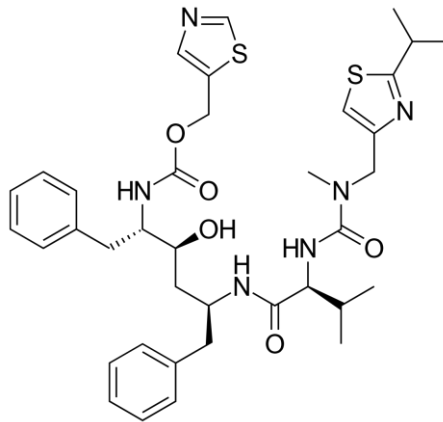
Η αναστολή της **SARS-CoV-2 Mpro** από το **nirmatrelvir** συμβαίνει σε δύο στάδια:

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

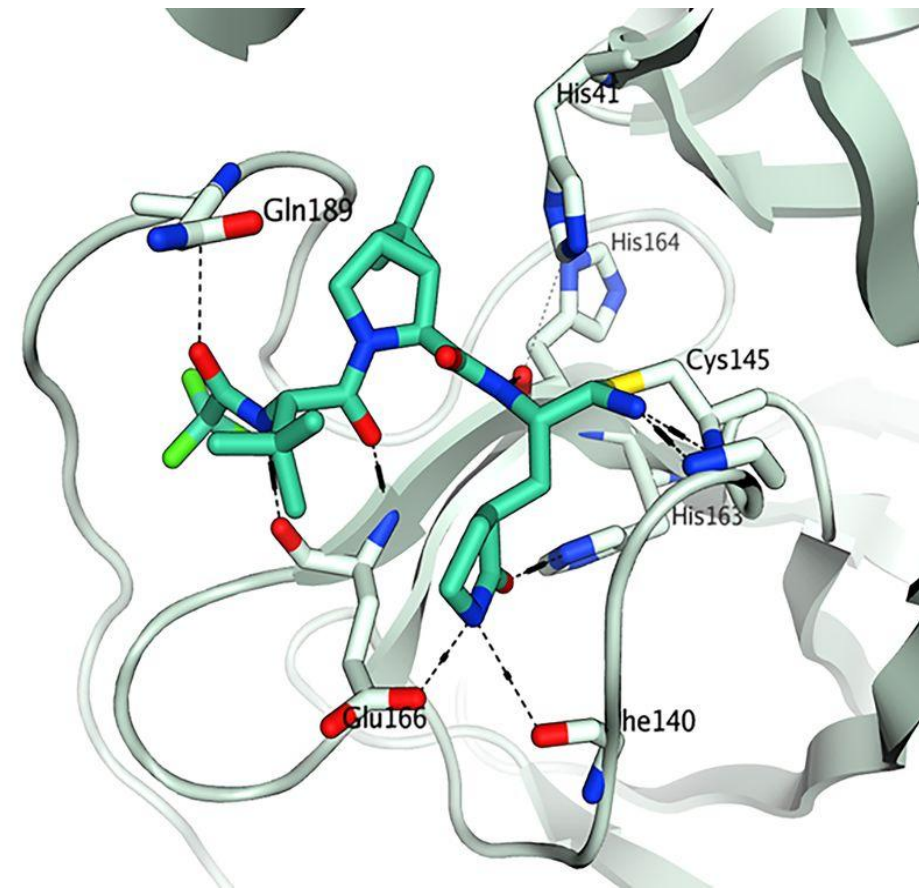
Για τη μορφοποίηση του σκευάσματος **Paxlovid**, το **Nirmatrelvir** συνδυάστηκε με **Ritonavir** αναστολέα του CYP3A4, που μεταβολίζει τη πλειονότητα των αναστολέων πρωτεάσης. Κυκλοφόρησε τον Μάρτιο 2021, **μόλις 12 μήνες μετά την ολοκλήρωση της πρώτης σύνθεσης του nirmatrelvir** – συντομεύοντας σημαντικά το χρόνο ανάπτυξης νέων φαρμάκων.

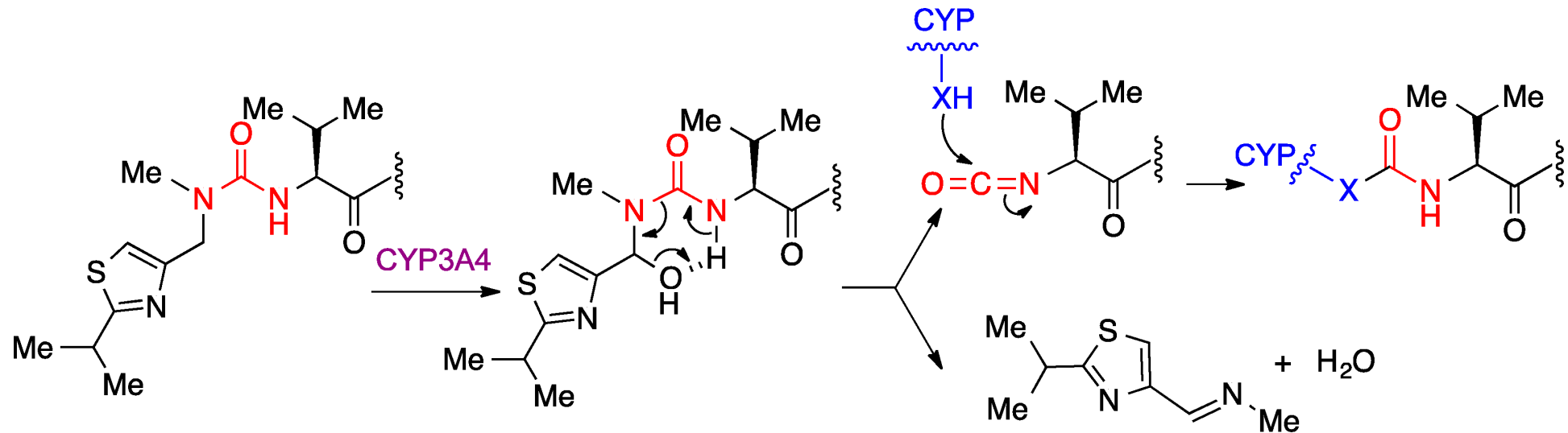
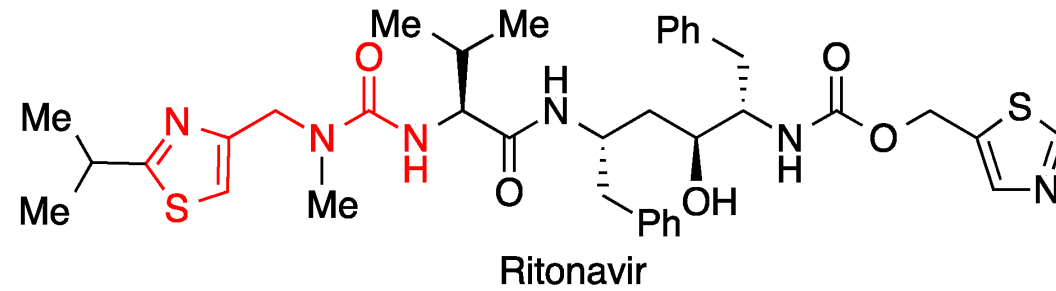
Το συνδυαστικό σχήμα **Paxlovid** είναι δραστικό από το στόμα και αποτελεσματικό, χωρίς σημαντικές παρενέργειες.

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)**

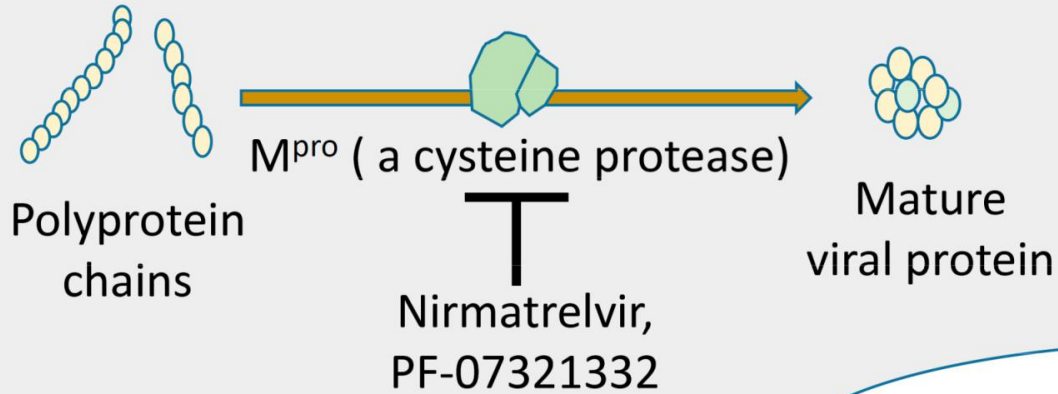




**Το Ritonavir αναστέλλει μη αντιστρεπτά το CYP3A4.**

Η ομάδα ουρίας οξειδώνεται και διασπάται προς ισοκυανικό ενδιάμεσο, το οποίο προσβάλλεται εύκολα από ομάδα του κυτοχρώματος το οποίο δεσμεύεται στον σχηματιζόμενο καρβαμικό εστέρα.

## Mechanism: an inhibitor of M<sup>pro</sup>, a protease critical in viral replication



## Efficacy: reduce hospitalization rate and mortality

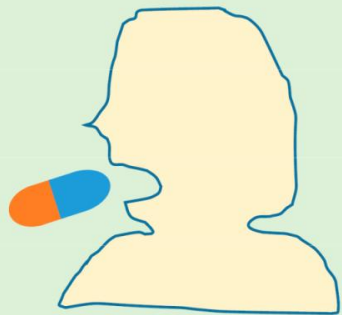
**6.3%** (66/1046) of the control group were hospitalized with **12** subsequent deaths

vs.

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

**Paxlovid™**  
= Nirmatrelvir/ritonavir

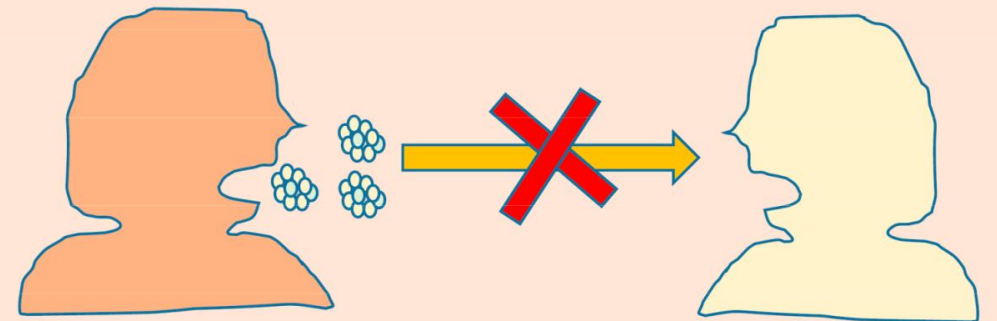
## Convenience: orally bioavailable

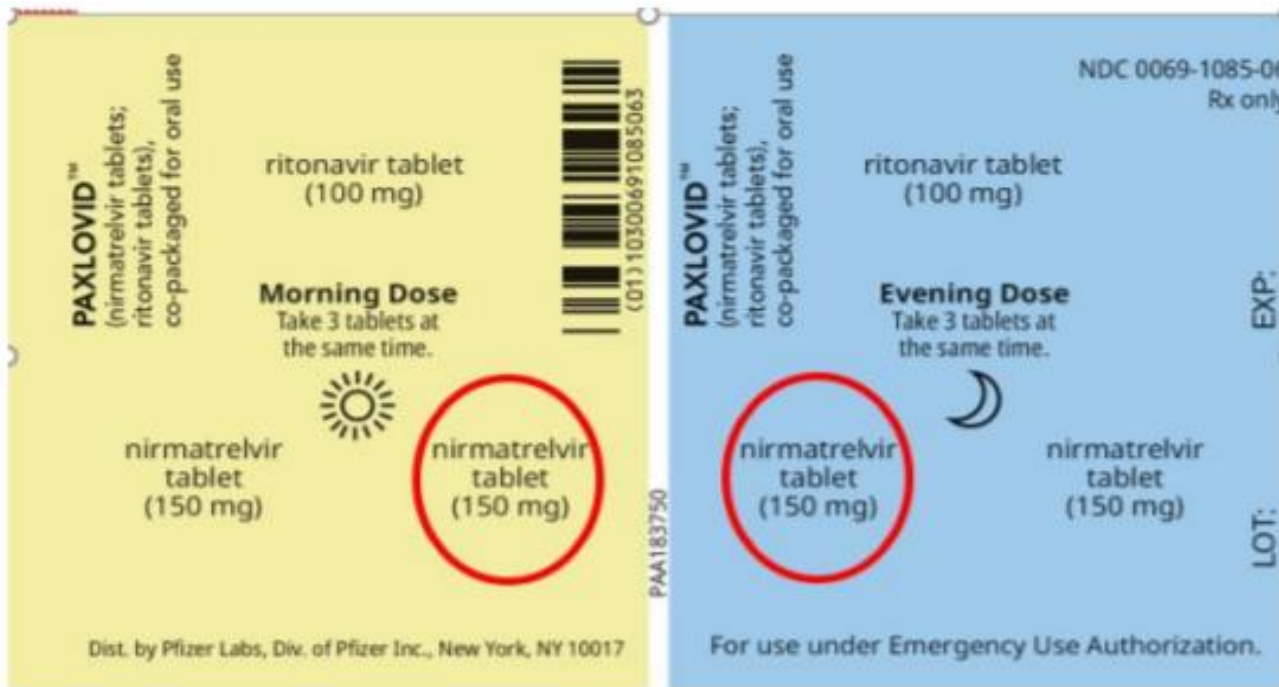


Oral bioavailability (F)  
= **50%** in rat

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.

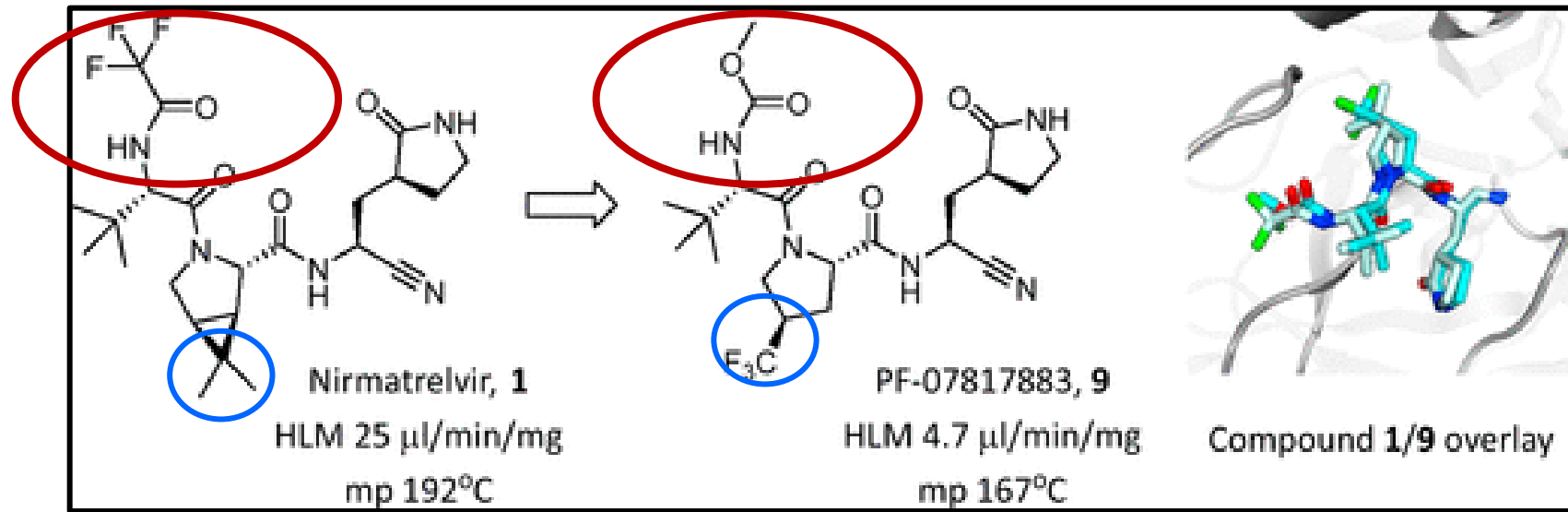
Συνιστάται μειωμένη δοσολογία σε ασθενείς με μέτρια νεφρική ανεπάρκεια.

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



Μόνο στο 23.2% των ασθενών που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από τη χορήγηση του Paxlovid το έλαβαν τελικά, καθώς η συνταγογράφηση δεν κρίθηκε δυνατή, λόγω κινδύνου φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων του ritonavir (αποτελέσματα Δεκεμβρίου 2022) με φαρμακα που μεταβολίζονται από το CYP3A4, ή επάγουν το CYP3A4.

Αναστολείς 2<sup>ης</sup> γενιάς – αξιοποίηση AI στην εύρεση και δομική βελτιστοποίηση νέων αναστολέων  
Μεταβολικά σταθεροί μη αντιστρεπτοί αναστολείς της SARS-CoV-2 Mpro.



*Journal of Medicinal Chemistry* 67, 13550–13571, 2024

Στόχος: μεταβολική σταθεροποίηση (μείωση συνάφειας με το CYP3A4) με διατήρηση ανασταλτικής δράσης έναντι της SARS-CoV-2 Mpro. Δεν είναι απαραίτητη η ομοιοπολική σύνδεση με το ένζυμο.

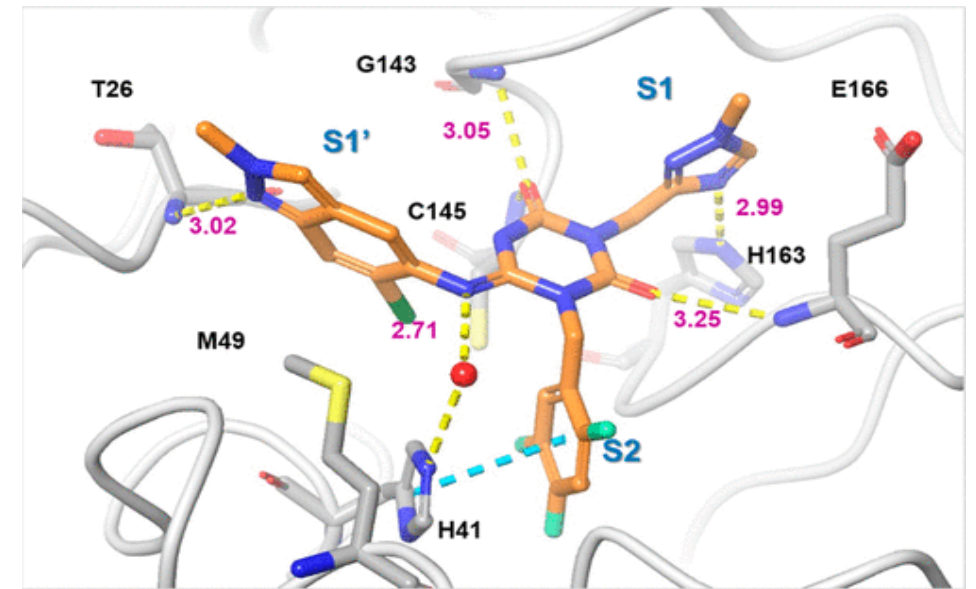
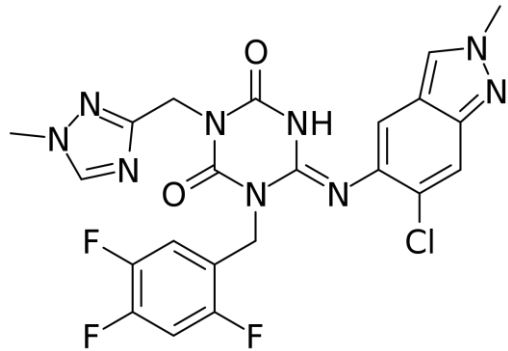
**Η αντικατάσταση του τριφθοροακεταμιδίου** της P4 με καρβαμιδικό εστέρα μειώνει τη λιποφιλία και τη συνάφεια με ένζυμα του κυτοχρώματος

**Η λιποφιλία επαναρυθμίζεται με αντικατάσταση της ευκόλως οξειδούμενης gem-διμεθυλομάδας** του δικυκλικού συστήματος της P2 από τριφθορομεθυλοπρολίνη, με αποτέλεσμα να **καθυστερεί η οξείδωση**.

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

## Αναστολείς 2<sup>ης</sup> γενιάς

### Μη πεπτιδική αντιστρεπτοί Mpro αναστολείς:



*J. Med. Chem.* **2022** 65, 6499–6512

Το **Ensitrelvir** σχηματίζει εντός του ενεργού κέντρου ανάλογο δίκτυο δH με το **Nirmatrelvir**, αλλά συνδέεται αντιστρεπτά. Είναι ο πρώτος εγκεκριμένος μη πεπτιδικός αναστολέας της **Mpro** (Ιαπωνία 2022, ΗΠΑ 2023). Οι αντιστρεπτοί αναστολείς θεωρούνται ασφαλέστερα φάρμακα, με μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης παρενεργειών.

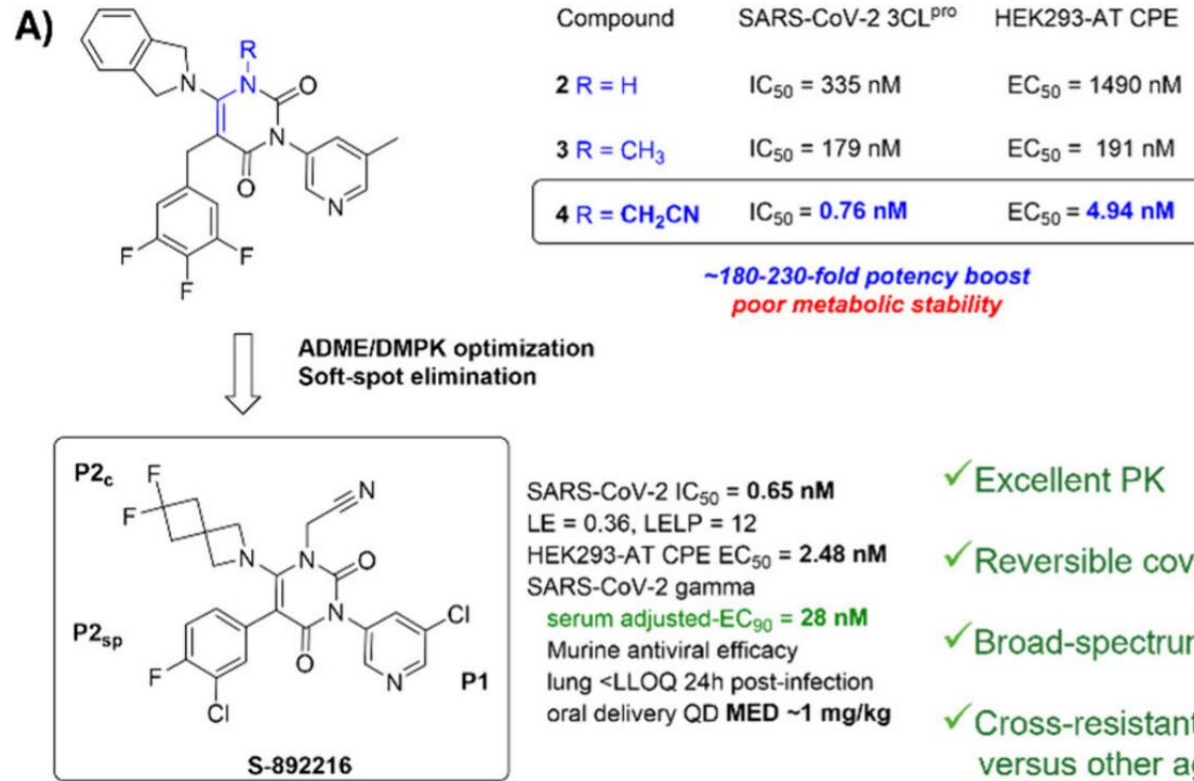
Η μετάβαση από τα πεπτιδομιμητικά στα μικρά μόρια είναι πολύπλοκη διαδικασία, που απαιτεί βαθιά κατανόηση της χημείας των πεπτιδίων και του σχεδιασμού φαρμάκων, για την αξιοποίηση πληροφοριών από τους πεπτιδομιμητικούς αναστολείς.

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.

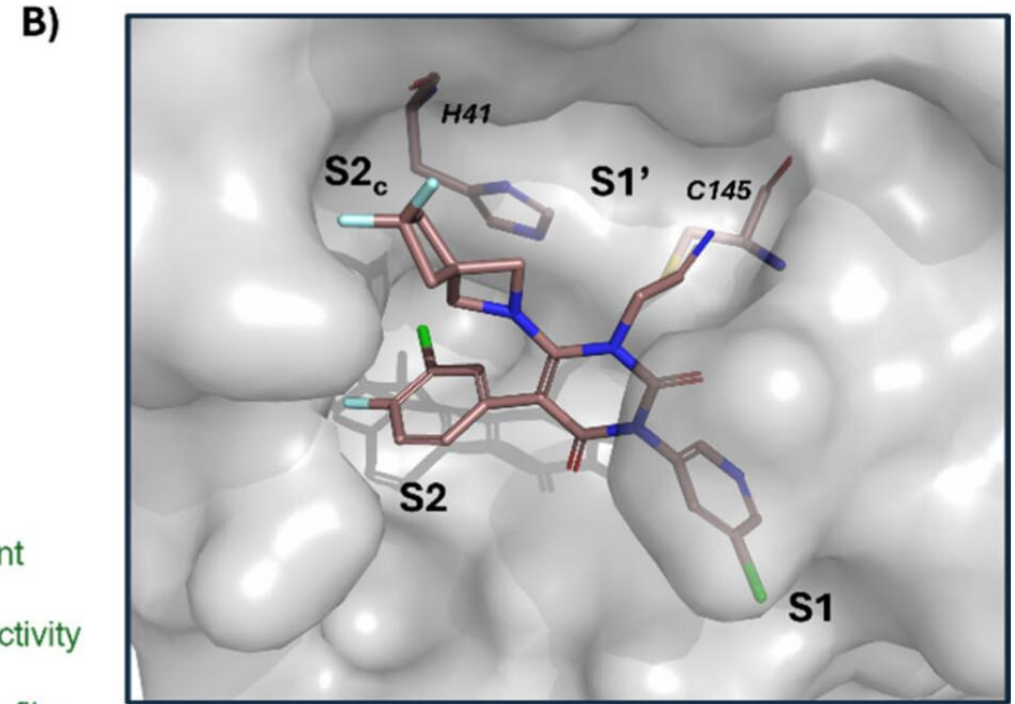
Μελετάται η αποτελεσματικότητά του για πρόληψη νόσησης και στην πρόληψη της «long COVID».



## Αναστολείς 2<sup>ης</sup> γενιάς: Μη πεπτιδική ομοιοπολική αναστολείς της Mpro – σχεδιάζοντας για μελλοντικές απειλές.



- ✓ Excellent PK
- ✓ Reversible covalent
- ✓ Broad-spectrum activity
- ✓ Cross-resistant profile versus other agents



*J. Med. Chem.* 2025, 68, 20, 21095-21098

Αντικατάσταση κεντρικής τριαζινοδιόνης από πυριμιδινοδιόνη.

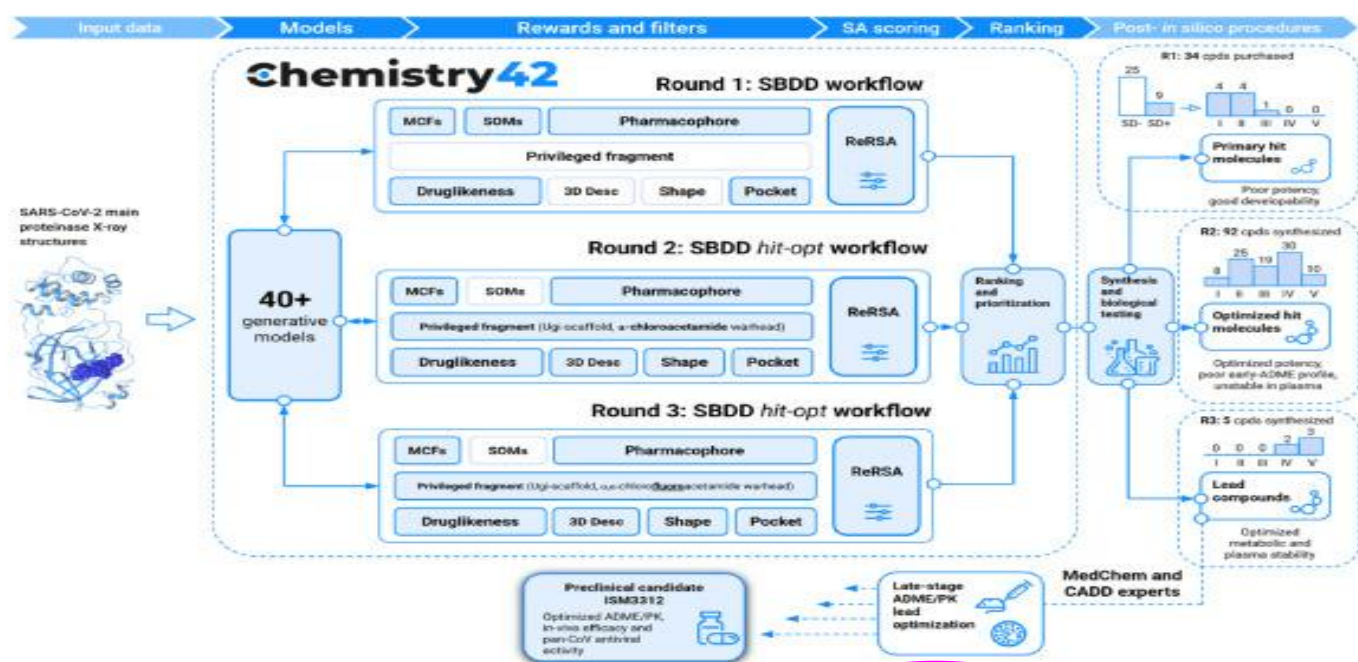
Η εισαγωγή του νιτριλίου μεταξύ της καταλυτικής δυάδας **H41** και **C145** επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση του αναστολέα με το ένζυμο, μετά τη εισαγωγή στο ενεργό κέντρο και τη πρόσδεση στις θέσεις **S1** και **S2**: αύξηση ανασταλτικής δράσης (X180).

Οι υπόλοιπες αλλαγές υποκαταστατών βελτιστοποιούν:

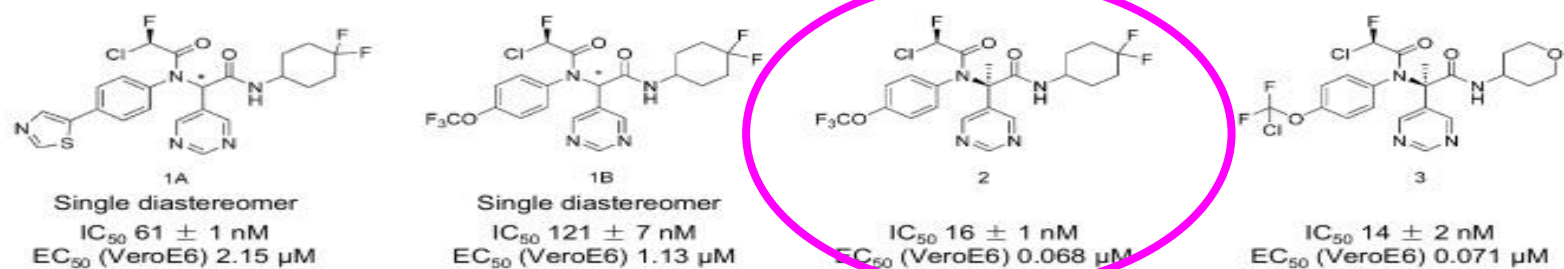
- τη μεταβολική σταθερότητα
- τη λιποφιλία (φ/κ συμπεριφορά).

Χωρίς συγκεκριμένη τροποποίηση, το **S-892216** εμφανίζει μεγάλη εκλεκτικότητα και θεραπευτικό εύρος.

a



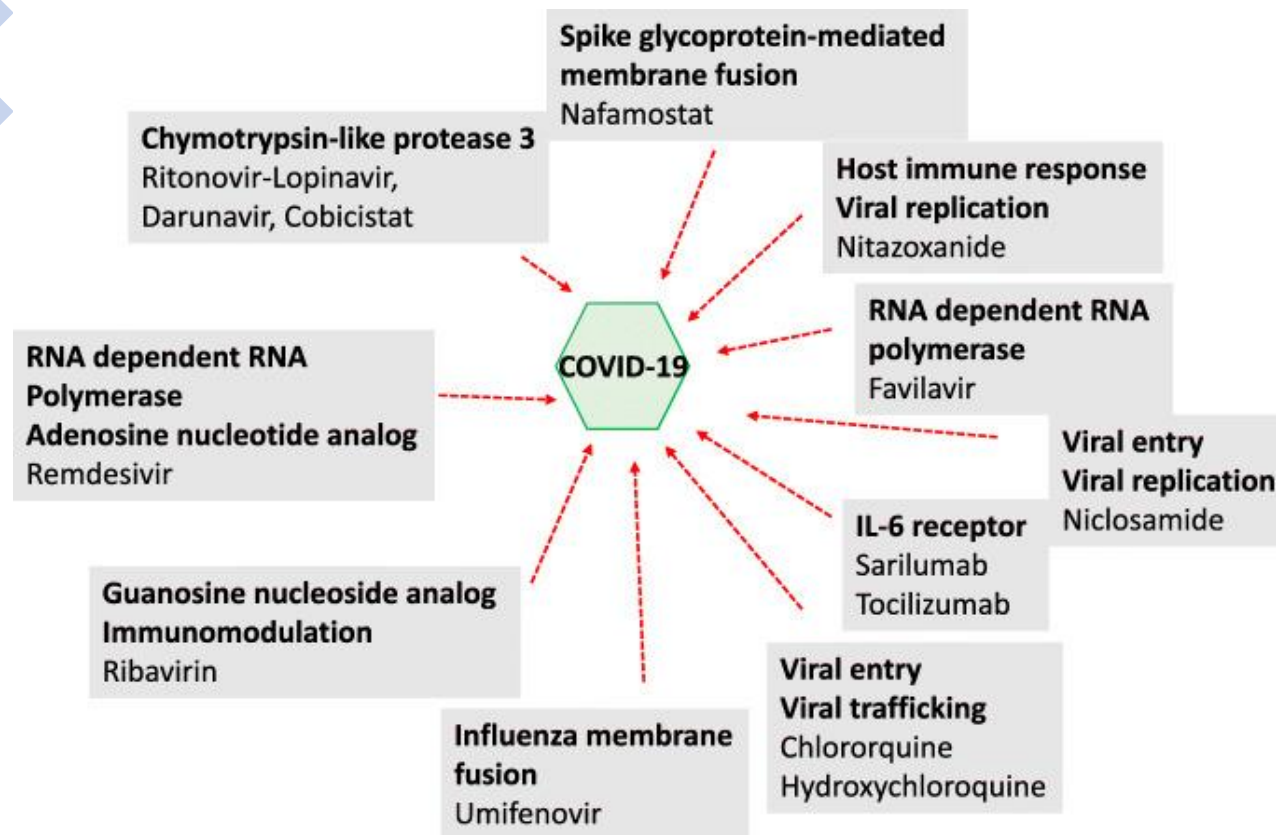
b



c

| Compound  | 1A                         | 1B                          | 2                         | 3                       |
|---|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Caco-2 permeability $10^{-6}$ cm/s (ER)   | 0.50 (48)                  | 1.56 (13.2)                 | 1.61 (11.3)               | 1.34 (23.5)             |
| CYP1A2/ 2C9/2C19/2D6/3A4 $IC_{50}$ $\mu\text{M}$                                | 24.3/15.6/<br>9.5/6.5/1.45 | >50/36.6/<br>40.4/44.5/37.8 | >50/>50/<br>>50/32.8/15.6 | >50/>50<br>/>50/>50/>50 |
| GSH trapping $t_{1/2}$ min @ 10 $\mu\text{M}$ compound conc.                    | ND                         | ND                          | 361                       | 1127                    |
| Liver microsome $Cl_{int}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) (Human/Mouse) | 29.6/38.9                  | <9.6/<9.6                   | 107.1/71.6                | 94.8/31.0               |
| PPB unbound fraction % (Human/Mouse)  | 29.4/16.2                  | 18.0/10.4                   | 23.0/17.9                 | 34.7/35.5               |
| Mouse $Cl_p$ (mL/min/kg)  | 112                        | 171                         | 80                        | 150                     |
| Mouse oral F (%)  | 9%                         | 101.68%                     | 75.8%                     | 72.0%                   |
| Dog oral F (%)  | ND                         | ND                          | ND                        | 49.0%                   |

ND= Not determined



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.**