

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**Paxlovid: farmaco antivirale orale che agisce sulla Main protease
(Mpro) di SARS-CoV-2**

Relatrice: Prof.ssa Alice Susic

Laureanda: Angelica Brunino
2008628

Anno Accademico 2023/2024

Indice

Abstract	I
1. Introduzione	1
2. Scopo della tesi	2
3. Caratteristiche che contraddistinguono i coronavirus	2
3.1. <i>Genoma virale, proteine non strutturali e strutturali</i> ..	2
3.2 <i>Replicazione virale</i>	4
3.3. <i>Main protease (M^{pro})</i>	6
4. Paxlovid	10
4.1. <i>Panoramica generale</i>	10
4.2. <i>Nirmatrelvir e ritonavir</i>	12
4.3. <i>Sviluppo razionale di nirmatrelvir</i>	14
4.4. <i>Interazione farmaco-target</i>	21
4.5. <i>Metabolismo di nirmatrelvir</i>	25
5. Conclusioni	26
Abbreviazioni	27
Bibliografia	29

Abstract

Il virus SARS-CoV-2, responsabile dell'insorgenza della patologia COVID-19, si è diffuso a livello globale generando una pandemia, che ha mobilitato numerosi ricercatori per poter giungere a ottenere terapie efficaci. La pandemia si è protratta dall'inizio dell'anno 2020 sino al 5 maggio 2023, quando lo stato d'emergenza sanitario pubblico di interesse internazionale è stato dichiarato concluso dall'OMS.

Nella ricerca di una terapia adeguata a contrastare la patologia, emerse Paxlovid. Esso, ha rappresentato il primo antivirale orale in grado di inibire l'attività proteolitica di Mpro di SARS-CoV-2, ostacolando la replicazione virale.

La finalità di questo elaborato è analizzare diversi aspetti di questo farmaco, costituito da due molecole che presentano scopi differenti: nirmatrelvir e ritonavir. La prima ne costituisce il principio attivo, mentre la seconda è stata aggiunta con l'obiettivo di migliorarne la biodisponibilità. L'attenzione è stata posta sulla delucidazione del suo bersaglio molecolare, sullo sviluppo razionale del farmaco, sul suo meccanismo d'azione e su alcuni aspetti della sua farmacocinetica.

1. Introduzione

La patologia Coronavirus Disease-19 (COVID-19) ha messo in seria difficoltà la sanità pubblica globale, generando un'emergenza sanitaria che ha mobilitato numerosi ricercatori per far sì di giungere a ottenere terapie efficaci.

La diffusione è stata tale, che l'OMS ha dichiarato l'inizio di una vera e propria pandemia l'11 marzo 2020, che si è poi ufficialmente conclusa il 5 maggio 2023.

Il microrganismo responsabile è stato riconosciuto essere il Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), appartenente alla famiglia dei *Coronaviridae*.¹ Tale virus è risultato condividere il 79.5% di materiale genetico con il Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV), responsabile della Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS).² Questa patologia si è diffusa tra il 2002 e il 2003, quando poi è stata arginata, avendo come luogo d'origine la Cina e giungendo a numerosi altri Paesi.^{3,4}

Un ulteriore coronavirus, che condivide con SARS-CoV-2 circa il 50% del genoma, è il Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) responsabile della Middle East Respiratory Syndrome (MERS) diagnosticata per la prima volta nel 2012.^{3,4} Questo microrganismo, secondo quanto riportato in data 29 agosto 2023 dall'OMS, ha un tasso di letalità approssimativamente pari al 36%, nettamente superiore a quello di SARS-CoV-2 (circa 2-3%) e a quello di SARS-CoV (intorno all'11%) ed è, perciò, uno dei virus più letali conosciuti.³

Le epidemie causate negli ultimi vent'anni da questi tre virus, che sono tutti betacoronavirus, non hanno tutte condotto all'insorgenza di una pandemia. Questo è avvenuto esclusivamente per il virus responsabile di COVID-19, che è quindi risultato essere il più infettivo dei tre.³

Per quanto riguarda la sintomatologia associata all'infezione da SARS-CoV-2, questa può essere rappresentata da febbre, tosse secca, dispnea, ma anche da mal di testa, vertigini, debolezza generalizzata, vomito e diarrea.⁵ Nei casi più gravi si può giungere addirittura all'ipossia e la malattia può essere persino letale.⁵

Per riuscire a ottenere in tempi rapidi un farmaco che potesse inibire la replicazione virale di SARS-CoV-2, è stato necessario, da parte degli scienziati, prendere sotto esame quanto era già noto per altri virus, e in particolar modo per gli altri coronavirus. Partendo da questo, unito a una buona intuitività e adeguati studi pre-clinici e clinici, è stato possibile sopraggiungere a Paxlovid: esso rappresenta il primo antivirale orale che inibisce l'attività proteolitica della Main protease virale (M^{pro}) di SARS-CoV-2.

2. Scopo della tesi

Lo scopo di questo elaborato è quello di adempiere ai seguenti obiettivi:

- i. elucidare il target del farmaco "Paxlovid", costituito dai composti nirmatrelvir e ritonavir;
- ii. mettere in evidenza come il medicinale è stato sviluppato razionalmente;
- iii. illustrare l'interazione tra il principio attivo e il bersaglio molecolare;
- iv. chiarire come viene metabolizzato dall'organismo umano.

Prima di assolverli, si sono analizzate le caratteristiche che contraddistinguono i coronavirus, approfondendone il processo replicativo.

3. Caratteristiche che contraddistinguono i coronavirus

3.1. Genoma virale, proteine non strutturali e strutturali

I coronavirus sono virus a RNA a singolo filamento positivo (+ssRNA), che presentano tra le 27 e le 32 kilobasi, avendo il genoma più esteso esistente tra i virus a RNA.^{2,6}

Il materiale genetico di questi virus, una volta infettata la cellula ospite, si comporta come un RNA messaggero (mRNA), venendo tradotto dai ribosomi della cellula e producendo, di conseguenza, gli enzimi virali necessari per la sua replicazione.⁷

Il genoma di SARS-CoV-2 contiene 14 open reading frames (ORFs), di cui i due principali sono ORF1a e ORF1b.^{7,8} Essi costituiscono circa tre quarti del genoma virale e codificano rispettivamente per la poliproteine 1a e 1ab, come mostrato nella **figura 1**.^{7,8}

PP1ab, la poliproteina di dimensioni maggiori, è ottenuta estendendo PP1a con la poliproteina sintetizzata da ORF1b e contiene sedici proteine non strutturali (nsp), che sono essenziali per formare il complesso di replicazione-trascrizione coinvolto nella sintesi dell'RNA virale.^{7,8} Le nsp sono rilasciate grazie a 15 tagli proteolitici a opera di due proteasi: la Papain-Like protease (PL^{pro}) in nsp3 e la Main protease (M^{pro}) in nsp5.^{7,8}

Inoltre, l'ultimo quarto del genoma virale codifica le proteine accessorie e le quattro proteine strutturali. Quest'ultime sono essenziali nell'assemblaggio del virione e nel processo infettivo.⁶⁻⁸

3 – Caratteristiche che contraddistinguono i coronavirus

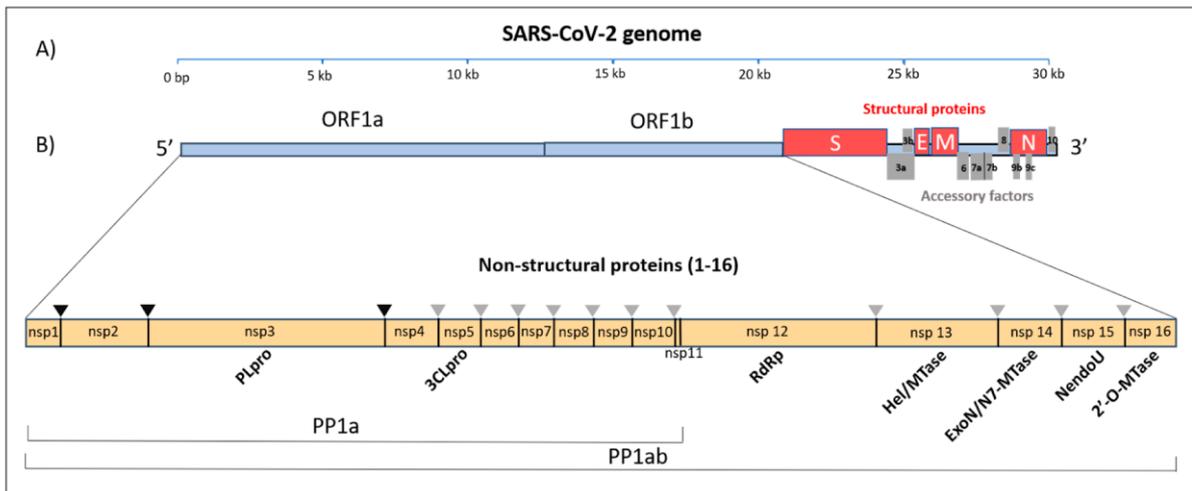


Figura 1. Rappresentazione del genoma di SARS-CoV-2. A) Genoma organizzato in ORF. B) Poliproteine 1a e 1ab, in cui vengono messe in evidenza le 16 proteine non strutturali. (Romano, M.; et al. 2020)

Le proteine strutturali sono: le proteine S, M, E ed N e sono messe in evidenza nella **figura 2**. La proteina S (spike), è costituita da omotrimeri transmembrana che sporgono sulla superficie virale formando una sorta di “corona”.^{1,2} Essa rappresenta il motivo per il quale i coronavirus sono denominati in questo modo e, oltre a ciò, tale proteina permette l’interazione tra la particella virale e i recettori delle cellule ospiti.^{1,2,6} Invece, la proteina M (di membrana) presenta tre domini transmembrana, è legata al nucleocapside e dà forma ai virioni.⁶ La proteina E (dell’envelope), consente l’assemblaggio delle particelle virali ed è coinvolta nel rilascio dei virioni e nella patogenesi.⁶ Infine, la proteina N (del nucleocapside), contiene due domini che permettono di legare il genoma virale attraverso diversi meccanismi e permette di riunire l’RNA nei virioni.⁶

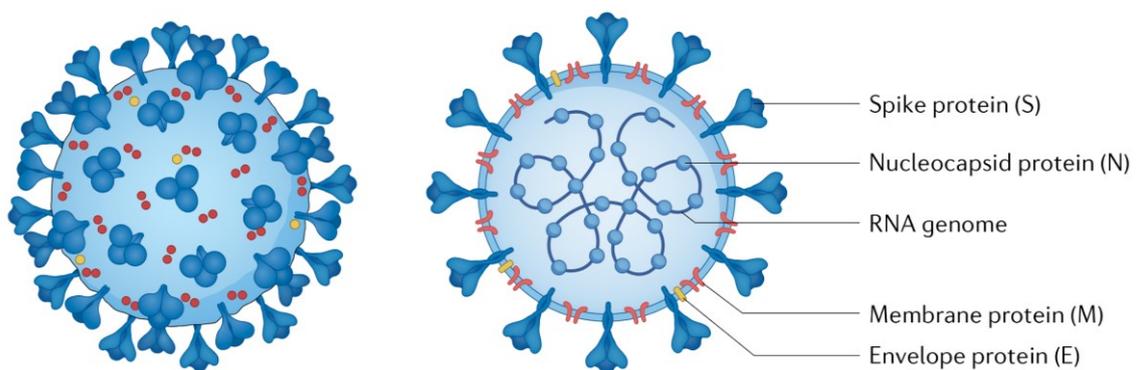


Figura 2. Virione relativo al virus SARS-CoV-2, dove sono indicate le diverse proteine strutturali. (Lamers, M. M.; Haagmans, L. B. 2022)

3.2 Replicazione virale

Focalizzando l'attenzione sulla replicazione virale, è bene tener presente che i virus sono parassiti intracellulari obbligati che necessitano, perciò, di una cellula ospite per potersi replicare. Infatti, per quanto concerne SARS-CoV-2, il suo ingresso all'interno della cellula ospite è possibile grazie all'interazione che si riesce a instaurare tra le proteine spike, poste sulla superficie del virus, e l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), che viene espresso prevalentemente nei polmoni, nel cuore, nell'ileo, nei reni e nella vescica.^{5,8}

Le proteine spike constano di due subunità:^{5,9}

- S₁, che si lega direttamente al recettore ACE2 della cellula ospite;
- S₂, che rende possibile la fusione del doppio strato lipidico del virus con quello della cellula ospite.

Queste due subunità, come mostrato nella **figura 3**, vengono separate in modo specifico grazie all'azione della serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2): essa esegue un taglio nel sito S₂' permettendo di attivare la subunità S₂ attraverso cambiamenti conformazionali irreversibili.^{5,9} In seguito a questo evento, la membrana cellulare e quella virale si fondono, permettendo di rilasciare l'RNA genomico (gRNA) all'interno della cellula ospite.⁹

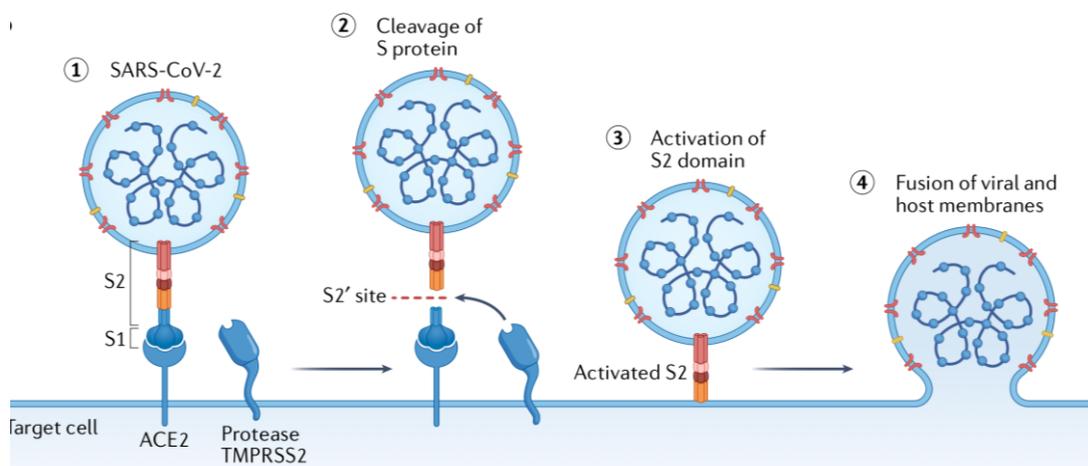


Figura 3. 1) Proteina spike, posta sulla superficie di un virione, che si lega al recettore ACE2 di una cellula ospite attraverso la sua subunità S₁. 2) La proteina viene scissa da TMPRSS2. 3) La scissione permette di attivare la subunità S₂. 4) Infine, ha luogo la fusione tra la membrana cellulare e quella virale e vi è il rilascio del genoma virale all'interno della cellula ospite. (Lamers, M. M.; Haagmans, B. L. 2022)

Il gRNA può poi essere tradotto, come messo in evidenza in **figura 4**, sfruttando i ribosomi della cellula ospite e ottenendo le due poliproteine virali, PP1a e PP1ab, che vengono scisse nelle 16 proteine non strutturali dalle proteasi PL^{pro} e M^{pro}.⁸

Oltre a ciò, i filamenti di gRNA possono anche fungere da stampo per la sintesi di ulteriori molecole di RNA. Questa sintesi ha luogo in vescicole a doppia membrana, le quali fanno parte di quegli organelli di replicazione che vengono indotti dal virus una volta infettata la cellula ospite.⁸ Difatti, in conseguenza all'infezione virale, vi è un

significativo rimodellamento del reticolo endoplasmatico che comporta la formazione di una complessa rete di membrane contorte e di vescicole a doppia membrana.⁸

Le molecole di RNA vengono prodotte grazie al complesso di replicazione-trascrizione, che genera anche un set di RNA messaggeri subgenomici (sg-mRNA), i quali codificano per le proteine strutturali e per quelle accessorie.⁸

Al termine della sintesi delle molecole di RNA, queste possono essere inglobate nei nuovi virioni, che vedono il gRNA all'interno di un nucleocapside, la cui struttura ha origine nel compartimento intermedio del reticolo endoplasmatico-Golgi della cellula ospite.⁸ Una volta ultimato il virione, esso fuoriesce dalla cellula mediante esocitosi.⁸

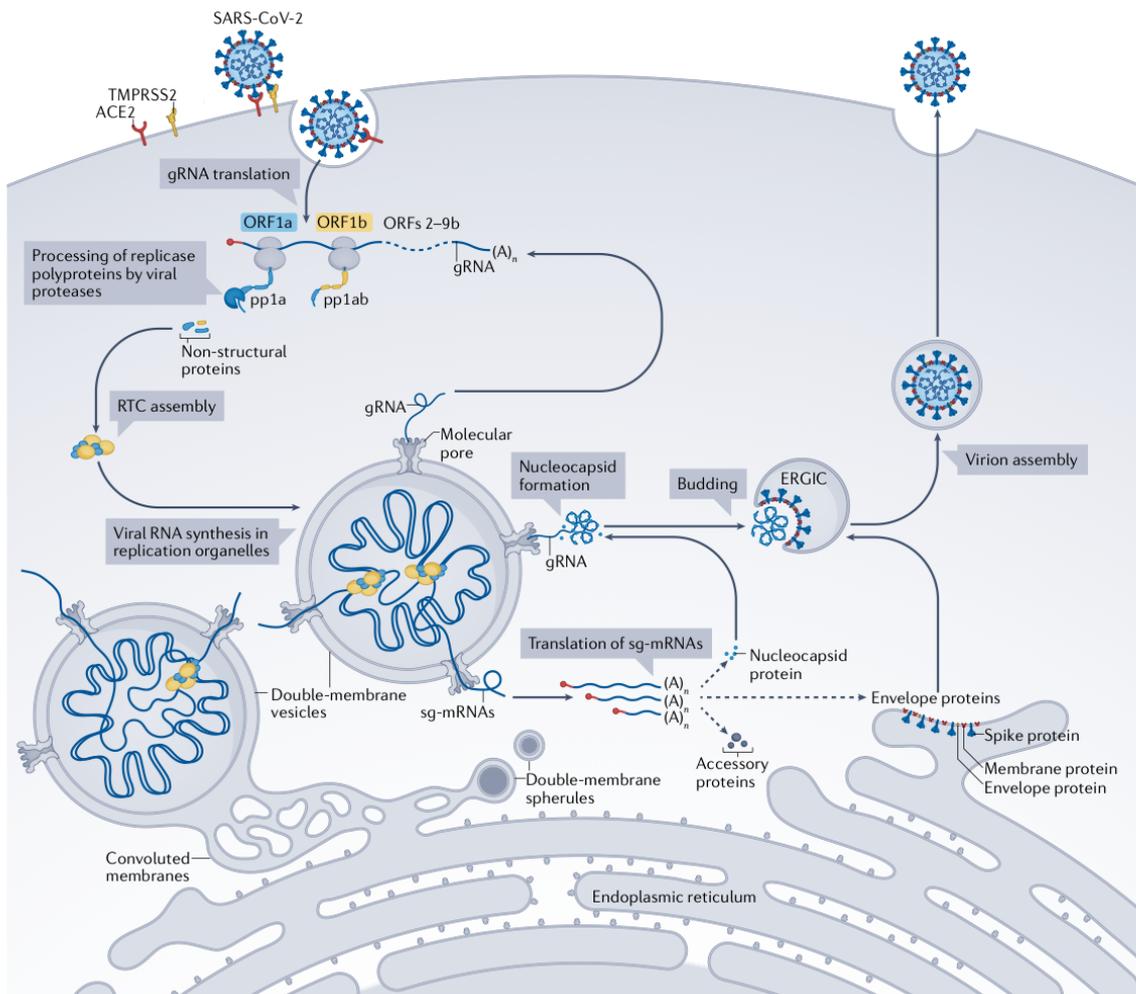


Figura 4. Ciclo di replicazione virale di SARS-CoV-2. (Malone, B.; et al. 2022)

3.3. Main protease (M^{pro})

L'enzima cisteinico M^{pro}, conosciuto anche come 3C-like protease (3CL^{pro}), è risultato essere uno dei bersagli farmacologici più promettenti verso cui agire per contrastare la patologia COVID-19. Ciò che ha reso questa biomolecola di così significativo interesse, è la sua capacità di eseguire tagli proteolitici esclusivamente dopo un residuo di glutammina.¹⁰⁻¹² Infatti, non risultano esserci proteasi umane che presentano la medesima specificità di substrato.^{11,13}

M^{pro} di SARS-CoV-2 è fondamentale per la maturazione del virus ed è in grado di separarsi autonomamente in nsp5, prima di processare le due poliproteine compiendo undici scissioni che permettono di rilasciare le proteine non strutturali.^{11,13} Le frecce di colore rosso presenti nella **figura 5**, indicano proprio i siti dove avvengono questi tagli proteolitici.¹¹

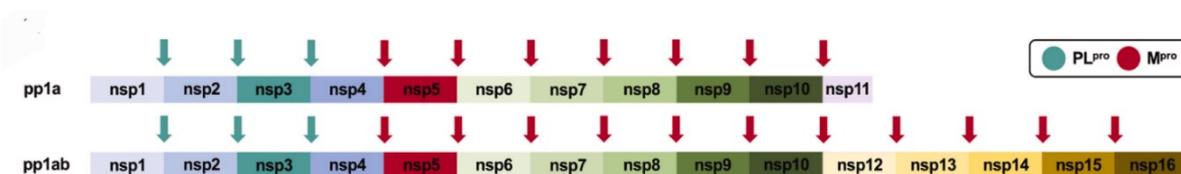


Figura 5. Poliproteine di SARS-CoV-2 dove sono evidenziate le 16 proteine non strutturali e i siti dove avvengono i 15 tagli proteolitici a opera delle due proteasi. In rosso quelli eseguiti da M^{pro} e in azzurro quelli eseguiti da PL^{pro}.

(Ullrich, S.; Nitsche, C. 2020)

Inoltre, M^{pro} di SARS-CoV-2, ha rivelato una significativa analogia strutturale con le proteasi dei virus SARS-CoV e MERS-CoV, presentando un sito attivo essenzialmente identico rispetto a quello delle altre due.¹¹ In particolare, nella **tabella 1**, vengono confrontate le caratteristiche molecolari delle proteasi M^{pro} di SARS-CoV-2 e di SARS-CoV.

Tabella 1. Caratteristiche molecolari della proteasi M^{pro} di SARS-CoV-2 e SARS-CoV messe a confronto¹⁰

Proprietà	SARS-CoV-2 M ^{pro}	SARS-CoV M ^{pro}
Peso molecolare (kDa)	34	34
Punto isoelettrico	6.0	6.2
Lunghezza del monomero (residuo)	306	306
Forma matura	omodimerica	omodimerica
Residui catalitici	His41, Cys145	His41, Cys145

Tale similarità, ha permesso di avere un punto di partenza privilegiato, potendo considerare composti già analizzati in precedenza per M^{pro} di SARS-CoV, per poi sviluppare inibitori efficienti per M^{pro} di SARS-CoV-2.

La struttura di M^{pro} di SARS-CoV-2, come illustrato nella **figura 6A**, dove sono messi in evidenza i due monomeri, è omodimerica.¹³ La dimerizzazione è un prerequisito fondamentale per la realizzazione del processo catalitico e, infatti, l'estremità N-terminale di un protomero fa parte del sito attivo dell'altro.¹³

Ogni protomero presenta 306 aminoacidi suddivisi in tre domini, mostrati nella **figura 6B** sottostante, dove il I dominio contiene un α elica e sei filamenti antiparalleli che formano un foglietto β , il II contiene sei filamenti β antiparalleli, mentre il III cinque α eliche.^{11,12}

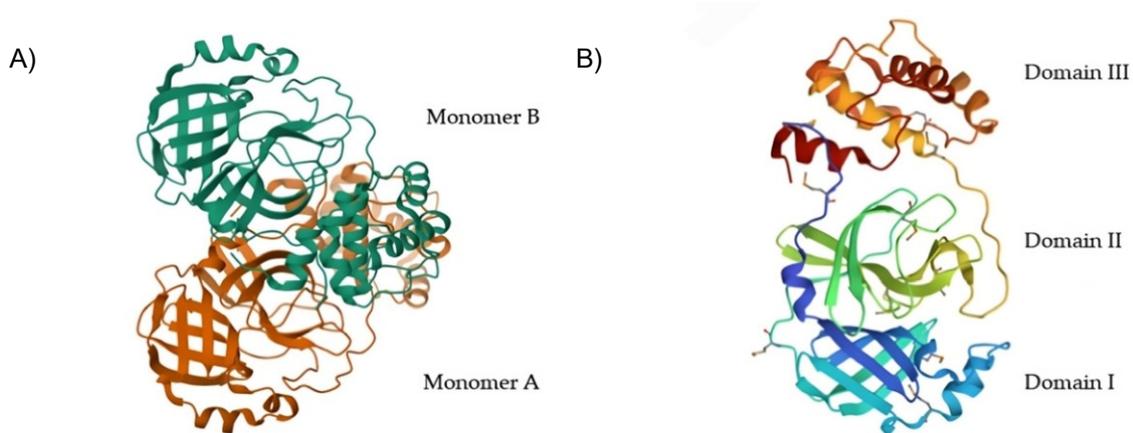


Figura 6. A) Struttura cristallografica di M^{pro} di SARS-CoV-2 (PDB: 7ALH) dove sono messi in evidenza i due monomeri. B) Struttura cristallografica di uno dei due monomeri della proteasi, dove vengono messi in evidenza i tre domini (PDB: 1P9S). (Citarella, A.; et al. 2023)

3 – Caratteristiche che contraddistinguono i coronavirus

M^{pro} di SARS-CoV-2, presenta una tasca di legame in cui possono essere riconosciuti quattro siti: S1', S1, S2, S3/S4; dove vanno a posizionarsi le porzioni P1', P1, P2 e P3 delle poliproteine virali, che sono i substrati della proteasi, come può essere osservato nella **figura 7b**.¹²

Il sito attivo è localizzato tra il I e il II dominio, nella sezione S1', dove è presente la diade catalitica costituita da Cys145 e His41, come illustrato nella **figura 7d**.¹²

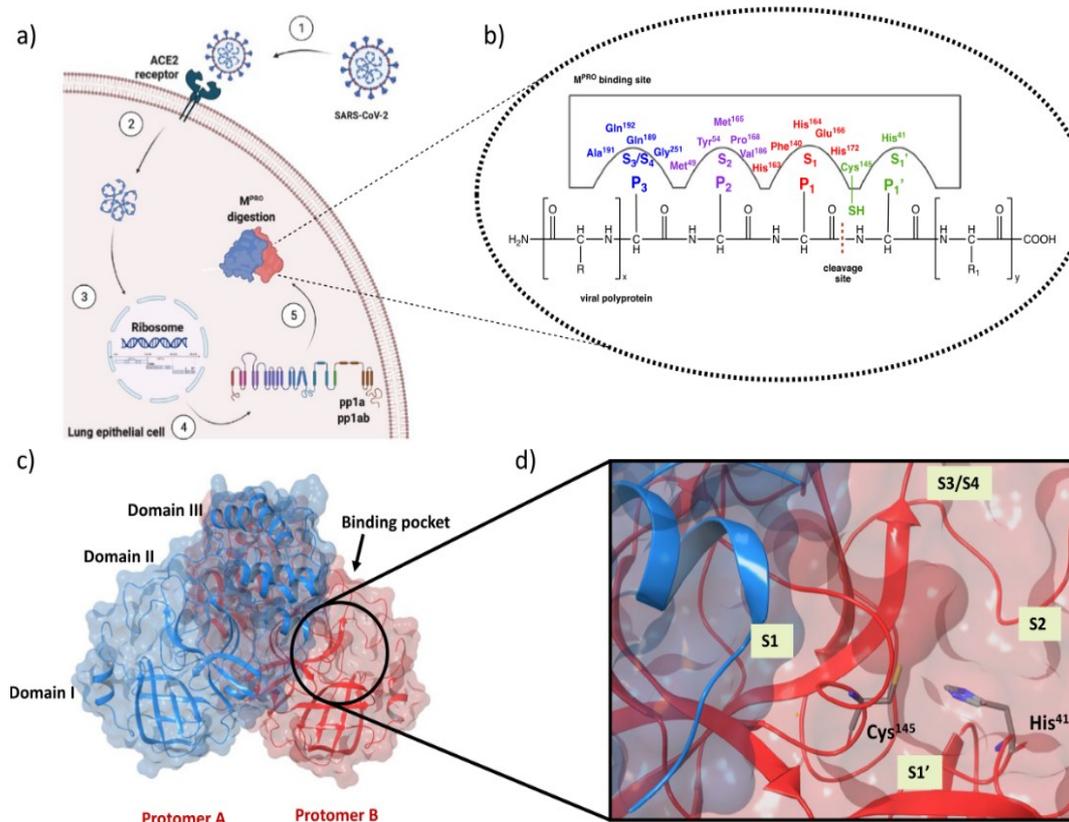


Figura 7. a) Infezione della cellula ospite da parte di SARS-CoV-2. b) Sito di legame di M^{pro} con le poliproteine virali. c) Struttura cristallografica di M^{pro} di SARS-CoV-2 (PDB: 6Y2F). d) Sito catalitico di M^{pro} dove vengono messe in evidenza le regioni S1', S1, S2 e S3/S4; oltre che la diade catalitica. (La Monica, et al. 2022)

I substrati che riescono a collocarsi nel sito di legame di M^{pro} sono accomunati da alcune caratteristiche strutturali: presentano una porzione P3 che generalmente contiene un residuo aminoacidico qualsiasi; una porzione P2 che solitamente presenta un aminoacido tra Leu, Phe, Val o Met; una porzione P1 che contiene Gln; infine una porzione P1' che può essere rappresentata da Gly, Ala, Ser o Asn.¹³ Di norma la sequenza aminoacidica è indicata nel seguente modo, dal residuo N-terminale a quello C-terminale: -P3-P2-P1↓P1'-, dove la freccia indica il legame peptidico che viene scisso.¹²

Il processo catalizzato da M^{pro} consta di diversi step (illustrati nella **figura 8**):^{10,11,13}

- per prima cosa His41 deprotona il tiolo di Cys145;
- Cys145, a questo punto, reagisce con il gruppo carbonilico del substrato attraverso un attacco nucleofilo e il protone che era stato precedentemente rimosso dal tiolo (da His41) viene ceduto all'azoto amidico;
- si è creato un intermedio acil-enzima, dove l'ossigeno carico negativamente dell'intermedio viene stabilizzato in un *oxyanion hole*, grazie alla presenza di un network di legami a idrogeno. L'instabilità di questo intermedio porta a riformare il doppio legame C=O e il residuo N-terminale viene rilasciato;
- successivamente entra in gioco una molecola d'acqua, presente nel sito attivo;
- questa opera un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico, portando a formare un secondo intermedio tetraedrico;
- infine, l'instabilità di questo secondo intermedio porta a far fuoriuscire il residuo C-terminale, rigenerando il sito attivo dell'enzima.

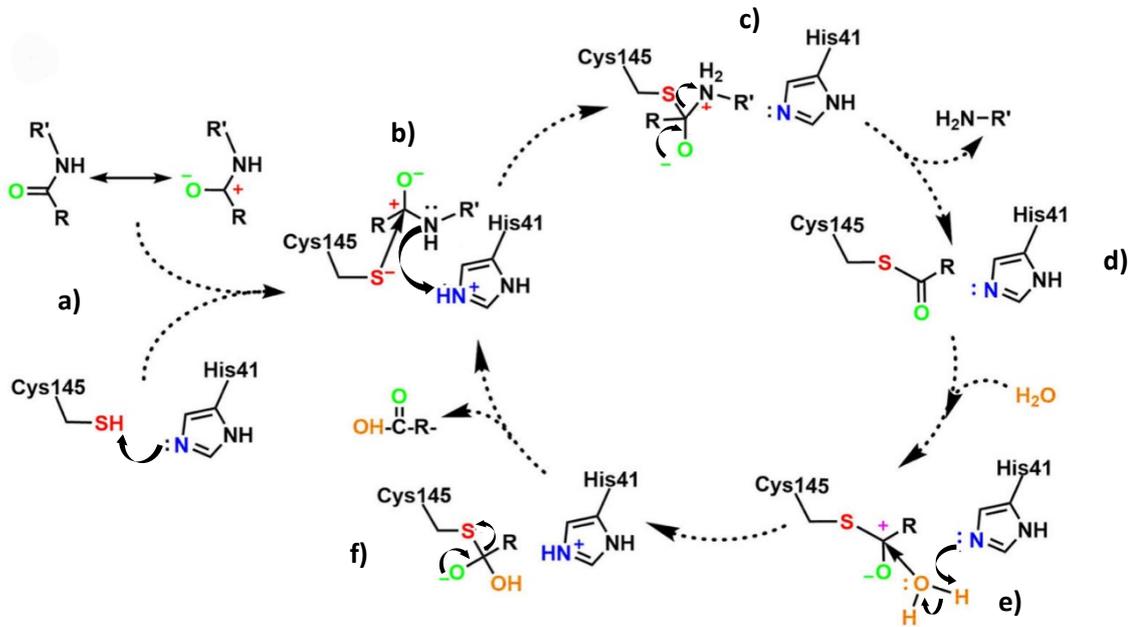


Figura 8. Processo catalizzato da M^{pro} .

(modificata da Hu, Q.; et al. 2022)

4. Paxlovid

4.1. Panoramica generale

“Paxlovid” è il nome commerciale del trattamento farmacologico composto da nirmatrelvir e ritonavir, sviluppato da Pfizer. Questo farmaco, ha sopperito all’esigenza di avere un medicinale che si potesse somministrare oralmente, senza essere degradato troppo rapidamente dall’organismo umano, e quindi avendo una biodisponibilità sufficiente per adempiere al suo compito: contrastare la patologia COVID-19. Questo medicinale ha rappresentato il primo antivirale orale sviluppato per il virus SARS-CoV-2, avente come target M^{pro}.

Il farmaco, in seguito a quanto emerso dagli studi preclinici e clinici, è stato autorizzato per l’uso in emergenza dalla Food and Drug Administration (FDA) americana il 22 dicembre 2021; ha ricevuto l’approvazione condizionale dalla Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) britannica il 31 dicembre 2021 e, infine, ha ottenuto l’approvazione condizionale dall’Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) il 28 gennaio 2022.

Un dato significativo da mettere in evidenza, è quello emerso dallo studio “Evaluation of Protease Inhibition for COVID-19 in High-Risk Patients” (EPIC-HR), che ha constatato una riduzione dell’ospedalizzazione e della morte, causate dall’agente infettivo, pari all’89%.^{14,15} Questo se l’assunzione del farmaco avveniva nei primi giorni dopo l’insorgenza dei sintomi.¹⁵

Per quanto riguarda l’assunzione di Paxlovid, essa avviene mediante l’ingestione di tre pillole ogni dodici ore, due delle quali sono costituite da 150 mg di nirmatrelvir e l’ultima è costituita da 100 mg di ritonavir. La somministrazione dovrebbe proseguire per cinque giorni e avere inizio entro cinque giorni dalla comparsa dei primi sintomi, secondo quanto dichiarato dall’EMA. Questa terapia è indicata per adulti che presentano un rischio rilevante di progressione della patologia a una forma di COVID-19 severa, ma che non necessitano di ossigenoterapia supplementare.

La principale controindicazione a questo trattamento terapeutico, è la possibilità di interazioni farmacologiche con altri farmaci, che può causare danni significativi anche se la somministrazione perdura per pochi giorni.¹⁵ Perciò, è importante che la prescrizione del farmaco avvenga valutando, da parte del medico, i farmaci assunti abitualmente dal paziente, conoscendo eventuali problematiche che si possono sviluppare dall’interazione con Paxlovid.¹⁵ Questo, per evitare sospensioni inappropriate di medicinali a lungo termine assunti quotidianamente dal soggetto e per evitare di non prendere neanche in considerazione la possibilità di prescrivere il farmaco per la non appropriata conoscenza delle possibili interazioni.¹⁵

Dato che sia nirmatrelvir che ritonavir sono substrati del citocromo P450 3A4 (CYP3A4), i medicinali la cui clearance dipende in modo significativo da questo enzima hanno una maggiore probabilità di condurre a reazioni indesiderate e, perciò, la co-somministrazione di Paxlovid con questi farmaci viene sconsigliata. Ciò è dovuto

essenzialmente alla maggiore concentrazione sistemica di questi medicinali, conseguente all'inibizione operata in particolar modo da ritonavir nei confronti di CYP3A4.

Facendo riferimento, invece, ai medicinali che sono potenti induttori di questo enzima, la conseguenza alla loro contemporanea assunzione con Paxlovid, consiste nella riduzione della concentrazione di nirmatrelvir e ritonavir, compromettendo quindi l'efficacia del farmaco.¹⁵

Anche se questo trattamento farmacologico ha mostrato risultati promettenti, è da mettere in luce come un report della società di analisi sanitarie Airfinity di Londra, abbia evidenziato che le prescrizioni da parte dei medici siano state appena intorno allo 0.5%, in riferimento ai nuovi casi di COVID-19 nel Regno Unito, e intorno al 13%, negli USA.¹⁶

La ragione di questo sembra essere riconducibile, oltre che alla possibilità di sviluppare effetti collaterali e alla disinformazione, alla preoccupazione dell'effetto "rebound", per il quale i sintomi ritornerebbero dopo essere precedentemente scomparsi.¹⁶ Tuttavia, i ricercatori hanno riscontrato come questo evento emerga, in realtà, indipendentemente dalla somministrazione di questo medicinale e, in ogni caso, tende ad essere piuttosto contenuto e comunque maggiormente auspicabile rispetto all'ospedalizzazione e alla morte.¹⁶

4.2. Nirmatrelvir e ritonavir

Analizzando le molecole che costituiscono il farmaco Paxlovid, ovvero nirmatrelvir e ritonavir, la prima ne rappresenta il principio attivo, mentre la seconda permette di migliorarne la farmacocinetica. Ritonavir, infatti, non ha alcun effetto nell'ostacolare il progresso della patologia COVID-19.¹⁴

Nirmatrelvir (PF-07321332) è un inibitore di M^{pro} di SARS-CoV-2 che riesce a instaurare con il bersaglio molecolare un legame covalente reversibile, permettendo di ostacolare la replicazione virale.¹⁴

La prima sintesi di PF-07321332, poi denominato nirmatrelvir, è stata eseguita dalla Pfizer e risale al 22 luglio 2020.¹⁷ La rapidità nell'ottenimento di questa molecola è dovuta al fatto che l'azienda farmaceutica disponeva già di un lead compound, sintetizzato nel 2003, che era stato sviluppato per contrastare l'epidemia di SARS e che aveva come target M^{pro} di SARS-CoV. Quest'ultimo composto (PF-00835231), però, non fu mai testato, dato che l'epidemia venne contenuta prima che i trial clinici avessero luogo.¹⁷ D'ora in poi, ci si riferirà a questo composto, come "composto 1".

Esso, presentava cinque donatori di legami a idrogeno, essendo perciò al limite di quella che è stata definita "regola del cinque", messa a punto da Lipinski. Tale regola propone, come limite superiore per i candidati farmaci che potranno essere somministrati oralmente, un quantitativo di donatori di legami a idrogeno pari a cinque. Di conseguenza, l'ottimizzazione di questo composto, fu rappresentata essenzialmente da una riduzione di questo aspetto.

Andando a esaminare ritonavir, esso lo si può descrivere come un antivirale che è stato inizialmente sviluppato come inibitore della proteasi del virus HIV, basandosi sulla relazione struttura-attività tra tale composto e questa macromolecola.¹⁸

Tale composto, dimostrò di avere una povera biodisponibilità sistemica, che faceva sì che fosse necessario assumerne dosi elevate per raggiungere un adeguato effetto terapeutico, esponendo così i soggetti che lo ingerivano a sviluppare effetti collaterali al farmaco.¹⁸ La principale causa della scarsa biodisponibilità è stata associata all'azione di CYP3A4 e della glicoproteina P.¹⁸

Si riscontrò, però, che basse concentrazioni di ritonavir potevano essere usate per inibire CYP3A4 e questo poteva essere un aspetto utile di tale molecola. Infatti, per superare le problematiche osservate con ritonavir, nei confronti della proteasi dell'HIV, venne sviluppato un inibitore (lopinavir) che mostrò come la sua disponibilità orale poteva essere aumentata somministrandolo in concomitanza di ritonavir, proprio per la capacità di quest'ultimo di inibire CYP3A4.¹⁸

Difatti, ritonavir, risulta essere uno degli inibitori più efficaci di CYP3A4 e viene spesso utilizzato per aumentare la disponibilità orale di farmaci che altrimenti verrebbero metabolizzati rapidamente.¹⁸

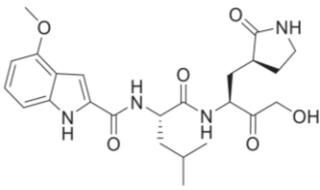
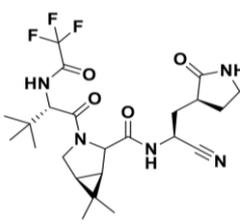
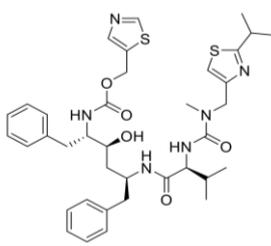
Tale molecola, è in grado di inibire CYP3A4 in modo irreversibile e, prima che l'enzima possa esplicitare nuovamente la sua attività, è necessario che venga rigenerato.¹⁵ Quest'ultimo processo generalmente richiede qualche giorno.¹⁵

Partendo dallo stesso presupposto impiegato con lopinavir, ritonavir è stato aggiunto alla formulazione di Paxlovid, poichè CYP3A4 sarebbe andato altrimenti a degradare velocemente la molecola di nirmatrelvir, impedendogli di avere un'adeguata azione terapeutica.^{14,18}

Grazie all'aggiunta di ritonavir, il principio attivo di Paxlovid è quindi più efficace, il suo tempo di emivita è maggiore e, di conseguenza, la sua farmacocinetica risulta potenziata.¹⁸

Nella **tabella 2** sono state riassunte le caratteristiche chimico-fisiche delle tre molecole appena descritte, dove uno degli aspetti più significativi è rappresentato dal minor numero di donatori di legami a idrogeno di nirmatrelvir rispetto al composto 1. Difatti, questo aspetto, verrà poi approfondito nel paragrafo 4.3.

Tabella 2. Caratteristiche chimico-fisiche del composto 1, di nirmatrelvir e ritonavir, messe a confronto.^{19, 20, 21}

Struttura	 Composto 1	 Nirmatrelvir	 Ritonavir
Formula molecolare	C ₂₄ H ₃₂ N ₄ O ₆	C ₂₃ H ₃₂ F ₃ N ₅ O ₄	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂
Peso molecolare	472.5	499.5 g/mol	720.9 g/mol
LogP	1.6	2.2	6
Donatori di legami a idrogeno	5	3	4
Accettori di legami a idrogeno	6	8	9
Legami rotabili	11	7	18
Stereocentri atomici	3	6	4

4.3. Sviluppo razionale di nirmatrelvir

Prendendo in considerazione le caratteristiche del bersaglio molecolare, (rappresentato da M^{pro} di SARS-CoV-2, analizzato nel paragrafo 3.3) lo sviluppo razionale di nirmatrelvir, che costituisce il principio attivo di Paxlovid, ha avuto come punto di partenza un lead compound. Questo era stato sviluppato precedentemente dall'azienda farmaceutica Pfizer per contrastare l'epidemia di SARS, arginata nel 2003.

Il composto a cui si sta facendo riferimento è PF-00835231, mostrato nella **figura 9**. Esso è un inibitore della proteasi M^{pro} di SARS-CoV e ha presentato una significativa attività antivirale (EC₅₀= 231 nM), che è emersa analizzando l'effetto citopatico (CPE) nelle cellule epiteliali Vero E6 arricchite con recettori ACE2.²² Tuttavia, ha evidenziato una disponibilità orale molto limitata (F%= 1.4) nei ratti analizzati.²²

Infatti, questo peptidomimetico, è ricco di donatori di legami a idrogeno, evidenziati in azzurro nella **figura 9**, che lo rendono scarsamente biodisponibile in seguito a una somministrazione orale, creando una superficie polare sull'esterno della molecola, che gli impedisce di riuscire a oltrepassare efficacemente la barriera dell'intestino.¹⁷

Perciò, l'assunzione di questo composto, sarebbe potuta avvenire solo in un contesto ospedaliero, immettendolo direttamente nel circolo sanguigno.¹⁷

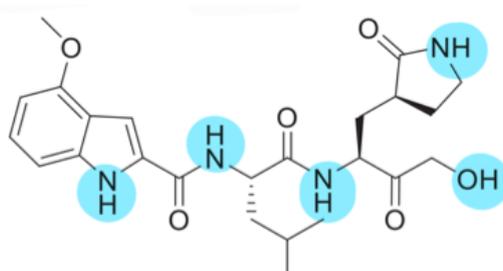


Figura 9. Molecola di PF-00835231. In azzurro sono evidenziati i donatori di legami a idrogeno.
Composto 1

Di conseguenza, per riuscire ad aumentare la concentrazione terapeutica nel flusso sanguigno, in seguito a somministrazione orale, vennero analizzati i diversi donatori di legami a idrogeno, per capire quali potevano essere rimossi senza ridurne il potere antivirale. Questo, preservando comunque quelle porzioni della molecola che creavano delle interazioni significative con la proteasi d'interesse.¹⁷ Nella **figura 10**, sono mostrate queste interazioni.

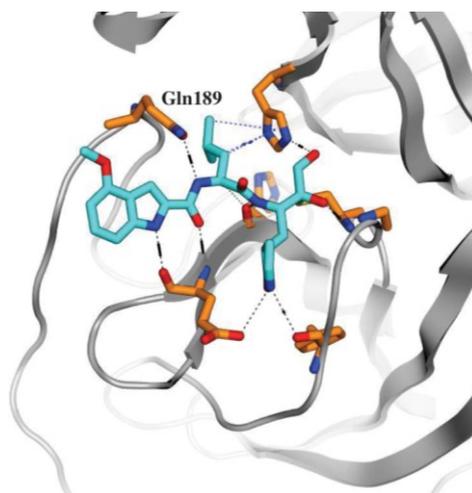


Figura 10. Struttura cristallografica di M^{pro} di SARS-CoV-2 che interagisce con il composto 1 (PF-00835231). Le interazioni esistenti tra la proteasi e il composto in esame, sono rappresentate da linee tratteggiate.

(Owen, D. R.; et al. 2021)

Come primo passo, venne sostituita la frazione della molecola relativa all' α -idrossimetilchetone, che costituiva la porzione **P1'** del substrato. Al suo posto vennero testati due differenti gruppi reattivi, il nitrile e il benzotiazol-2-il chetone, ottenendo le due molecole mostrate nella **figura 11**. Questi due gruppi reattivi, permettevano di continuare a mantenere l'interazione covalente reversibile tra P1' e la cisteina del sito attivo, come facevano le poliproteine virali.¹⁷

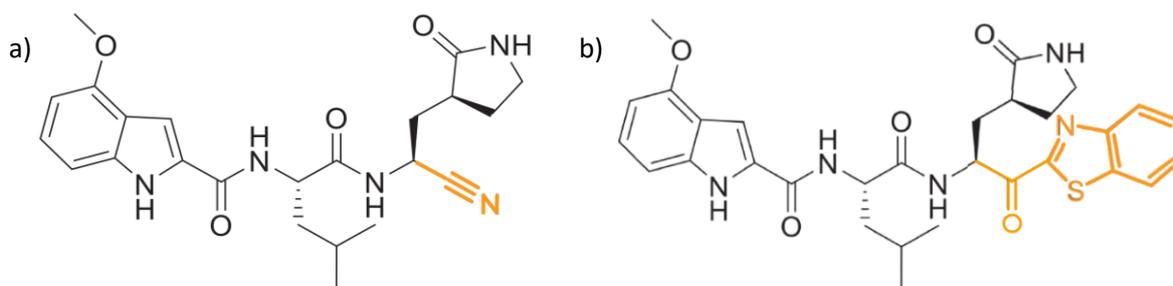


Figura 11. Composti ottenuti sostituendo l' α -idrossimetilchetone con:

- un nitrile (**composto 2**);
- benzotiazol-2-il chetone.

L'idea di impiegare il nitrile emerse, poiché, questo gruppo reattivo era già stato testato in altri farmaci approvati precedentemente, come il vidagliptin. Quest'ultimo, infatti, è un antidiabetico che inibisce la serin proteasi dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4) attraverso un'interazione covalente tra il nitrile e la serina del sito attivo dell'enzima.¹⁴ Il composto con il nitrile (composto 2) mostrò un'aumentata biodisponibilità orale (F%= 7.6%) nei ratti testati, anche se comportò una diminuzione della potenza inibitoria ($K_i=27.7$ nM) e dell'attività antivirale ($EC_{50}=1364$ nM).²²

Dopodichè, i ricercatori si focalizzarono sul residuo di leucina, porzione **P2** della molecola, e pensarono di sostituirlo con un aminoacido ciclico, eliminando così un donatore di legami a idrogeno tra le frazioni P2 e P3, rappresentato dal legame

N-H.^{14,17,22,23} Al suo posto venne messo il gruppo 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] esano, ovvero una prolina opportunamente modificata, raffigurato in magenta nella **figura 12**. Ciò che in questo gruppo ricorda la leucina è l'anello ciclopropilico con i due gruppi metilici che sporgono verso l'esterno, proprio come i due metili nella catena laterale dell'aminoacido.¹⁴ Questo tipo di modifica strutturale era già stata analizzata per un altro composto già approvato, il boceprevir, un inibitore di una serin proteasi sviluppato come antivirale per l'epatite C.^{14,17}

Combinando questa modifica con quella operata alla porzione P1', prendendo in considerazione il sostituito benzotiazol-2-il chetone, l'analogo che ottennero fu quello mostrato nella **figura 12** e denominato "composto 3". Esso, mostrò un'attività antivirale minore ($EC_{50} = 5593$ nM), rispetto agli analoghi precedenti, e questa riduzione può essere spiegata andando ad analizzare le interazioni molecola-target, mostrate nella **figura 13**.²²

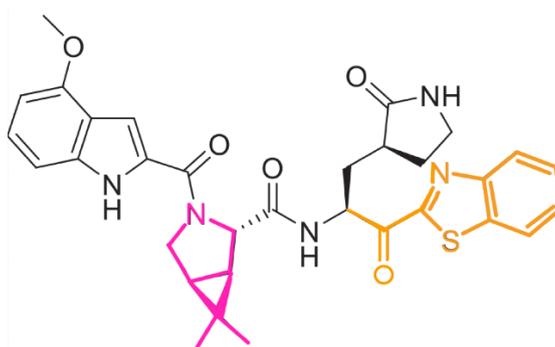


Figura 12. Composto ottenuto ponendo nella posizione P1' il gruppo benzotiazol-2-il chetone e in posizione P2 il gruppo 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] esano.

Composto 3

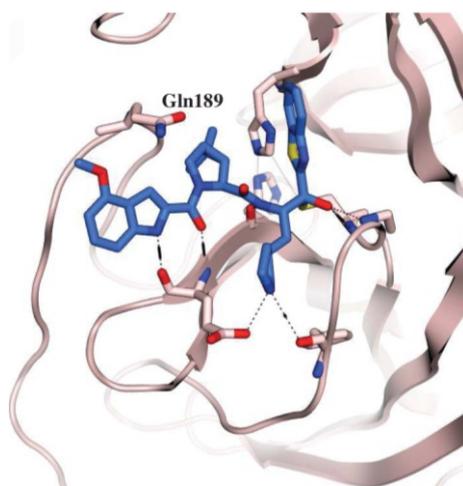


Figura 13. Struttura cristallografica di M^{pro} di SARS-CoV-2 che interagisce con il **Composto 3**. Le interazioni esistenti tra la proteasi e il composto in esame, sono rappresentate da linee tratteggiate. (Owen, D. R.; et al. 2021)

Infatti, nonostante il fatto che il sostituente che ha preso il posto della leucina riesca a inserirsi efficacemente nella tasca S2 delle proteasi, il legame a idrogeno tra il ligando e Gln189 non è più possibile.²² Di conseguenza, questo composto, non è stato poi tenuto.

Successivamente, gli scienziati si concentrarono sulla porzione relativa all'indolo, ovvero sulla frazione **P3** del composto 1. Per ristabilire l'interazione che era andata persa, sintetizzando il composto 3, testarono due sostituenti: una metil-solfonammide e una trifluoro-acetammide, ottenendo le due molecole raffigurate nella **figura 14** e denominate "composto 4" e "composto 5". Questi sostituenti vennero indagati per andare a occupare più efficacemente la tasca S3 rispetto all'indolo.²² I due analoghi ottenuti presentavano costanti di inibizione, K_i , con valori piuttosto simili (7.93 nM per il primo e 12.1 nM per il secondo) che rispecchiavano, per entrambi i composti, una migliore attività inibitoria rispetto ai composti 2 e 3.^{22,23} Tuttavia, il secondo aumentò la biodisponibilità orale nei ratti testati a un valore tale ($F\% = 33$) da risultare il più promettente tra i due.^{22,23}

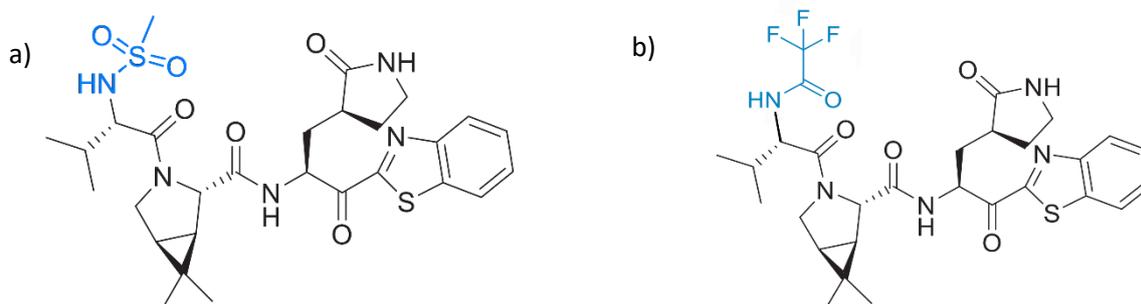


Figura 14. Composti ottenuti sostituendo l'indolo con:

- a) una metil-solfonammide (**composto 4**);
- b) una trifluoro-acetammide (**composto 5**).

Da notare è, che nonostante tutte le modifiche strutturali svolte, una porzione del lead compound è rimasta inalterata in tutti gli analoghi sintetizzati: quella relativa alla posizione **P1**, messa in evidenza nella **figura 15** dove è colorata di rosso, nella quale si è mantenuto un γ -lattame.^{14,17}

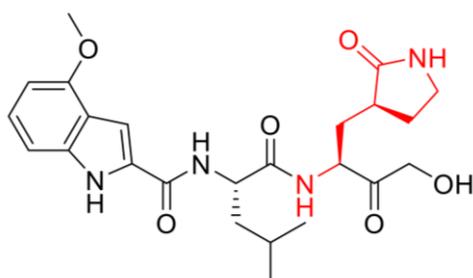


Figura 15. Composto 1, dove in rosso è evidenziato il gruppo γ -lattamico, ovvero la porzione della molecola relativa alla posizione P1.

(Joyce, R. P.; et al. 2022)

Ciò è dovuto al fatto che M^{pro} riconosce in modo preferenziale i residui di glutammina posti in posizione P1 nei substrati e questo residuo ciclico, costituito da un lattame, rappresenta un suo bioisostero. Infatti, la catena laterale della glutammina può effettuare una reazione di ciclizzazione, portando a un prodotto ciclico molto simile al γ -lattame, come messo in evidenza nella **figura 16**.¹⁴

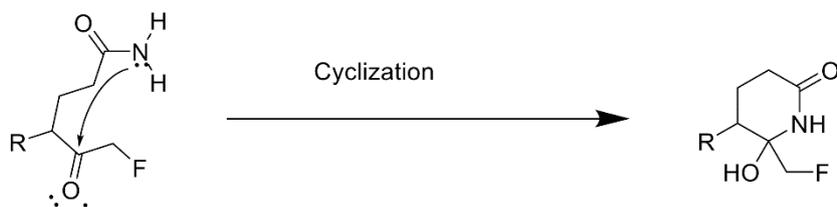


Figura 16. Reazione di ciclizzazione tra il gruppo ammidico, posto nella catena laterale di una glutammina, e il gruppo carbonilico.
(Joyce, R. P.; et al. 2022)

Il γ -lattame conferisce, inoltre, rigidità alla molecola e una ridotta perdita di entropia conformazionale in seguito al legame con la proteasi virale, rispetto alla catena laterale della glutammina.¹⁴

Prendendo in considerazione quanto emerso in seguito a ogni sostituzione eseguita, si sintetizzò un composto che presentava il nitrile nella posizione P1', il gruppo 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] esano in P2, una trifluoro-acetammide in posizione P3 e, per ultima cosa, sempre in quest'ultima posizione, si sostituì il gruppo isopropilico con un ter-butile. La molecola così ottenuta rappresentò il candidato clinico PF-07321332, ovvero nirmatrelvir, raffigurato nella **figura 17**.

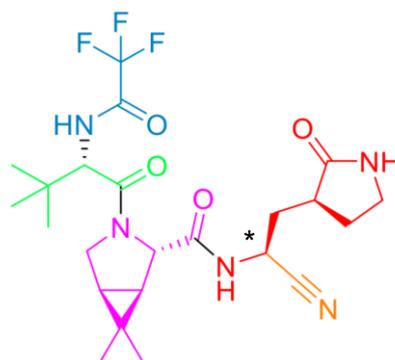


Figura 17. Nirmatrelvir. I diversi colori mettono in luce le diverse porzioni della molecola: in rosso la posizione P1, in arancione la P1', in magenta la P2, la P3 in azzurro. L'asterisco è posto nelle immediate vicinanze del centro stereogenico.
(modificata da Joyce, R. P.; et al. 2022)

Le interazioni che si riescono a instaurare tra nirmatrelvir e M^{pro} di SARS-CoV-2, sono rappresentate nella **figura 18**.

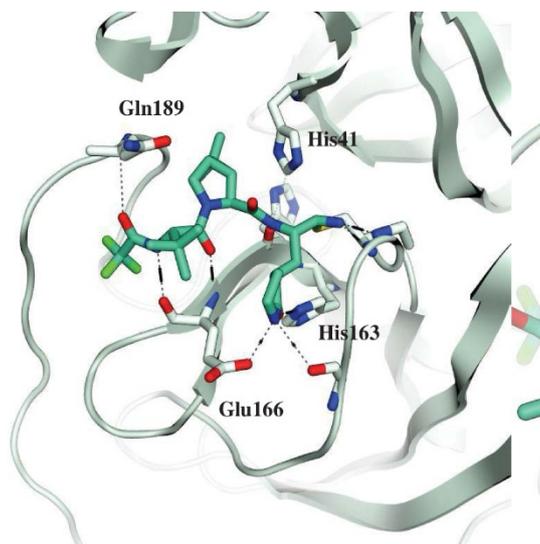


Figura 18. Struttura cristallografica di M^{pro} di SARS-CoV-2 che interagisce con nirmatrelvir. Le interazioni esistenti tra la proteasi e il composto in esame, sono rappresentate da linee tratteggiate. (Owen, D. R.; et al. 2021)

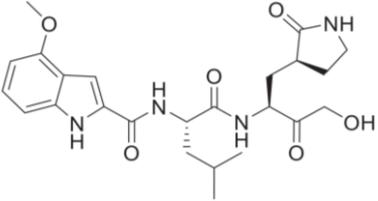
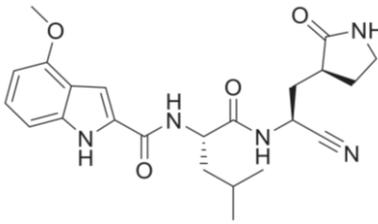
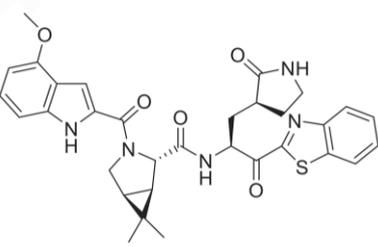
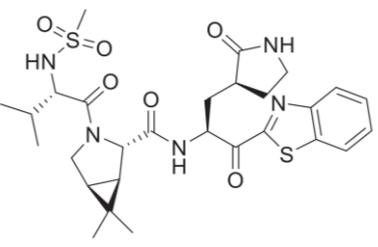
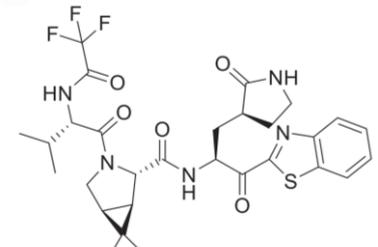
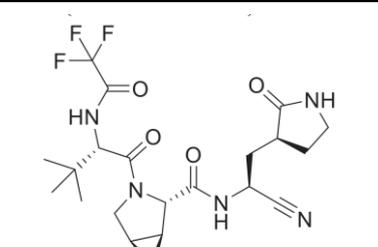
Andando a osservare la struttura di nirmatrelvir, mostrata nella **figura 17**, si può notare come la scelta finale, per quanto concerne la posizione P1', ricade sul nitrile. Questo perchè si valutarono essenzialmente tre aspetti principali:^{17,22}

- il nitrile, essendo più solubile in acqua, rispetto al benzotiazol-2-il chetone, permette di ottenere soluzioni acquose dove la sua concentrazione è maggiore e ciò rappresenta un aspetto significativo negli studi pre-clinici;
- questo gruppo funzionale conferisce una minore tendenza all'epimerizzazione del centro stereogenico posto nelle immediate vicinanze, nella porzione P1;
- infine, risulta più semplice ottimizzare il processo di sintesi dalla scala di laboratorio a quella industriale se si opta per il composto con il gruppo nitrile.

Questo composto mostrò una potente attività inibitoria ($K_i = 3.11$ nM) e un'attività antivirale aumentata rispetto agli analoghi sintetizzati precedentemente ($EC_{50} = 74.5$ nM).^{22,23}

Per riassumere le modifiche strutturali che hanno portato dal composto 1 a nirmatrelvir, nella pagina seguente è presente la **tabella 3**. In essa sono riportati i parametri che sono stati ottimizzati al fine di giungere a un inibitore efficiente di M^{pro} di SARS-CoV-2. In particolare, si può notare come la biodisponibilità orale di nirmatrelvir, nei ratti testati, sia nettamente superiore rispetto a quella del composto 1. Infatti, la prima risulta pari a 50%, mentre la seconda ad appena l'1.4%.

Tabella 3. Parametri ottimizzati nell'identificazione di inibitori orali di M^{pro} di SARS-CoV-2.²²

Nome	Struttura	SARS-CoV-2 M ^{pro} K _i (nM)	VeroE6-enACE2 CPE EC ₅₀ (nM)	F orale %
Composto 1		0.271 (0.155 - 0.471, n=6)	231 (158 - 338, n=8)	1.4±0.8
Composto 2		27.7 (18.4 - 41.7, n=5)	1364 (860 - 2164, n=15)	7.6 (7.4, 7.8)
Composto 3		230 (181 - 292, n=4)	5593 (3457 - 9051, n=8)	N. D.
Composto 4		7.93 (3.62 - 17.4, n=5)	909 (557 - 1482, n=14)	10 (7.5, 13)
Composto 5		12.1 (8.05 - 18.1, n=7)	85.3 (76.5 - 95.2, n=36)	33 (33, 34)
Nirmatrelvir		3.11 (1.47 - 6.59, n=6)	74.5 (66.5 - 83.4, n=20)	50 (30, 71)

4.4. Interazione farmaco-target

L'interazione che si viene a instaurare tra nirmatrelvir e M^{pro} di SARS-CoV-2 è rappresentata da un'interazione covalente reversibile, che ha luogo tra nirmatrelvir e lo zolfo della cisteina posta nel sito attivo della proteasi, ovvero la Cys145.¹⁴ Questo legame covalente viene illustrato nella **figura 19**.

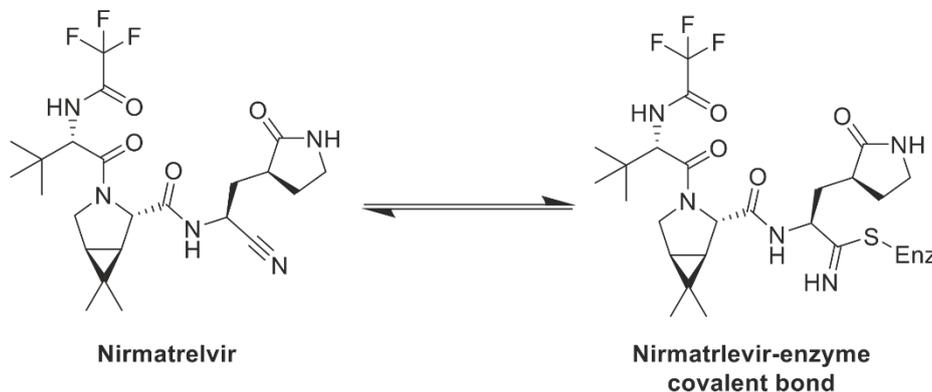
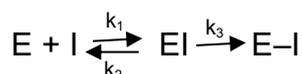


Figura 19. Struttura di nirmatrelvir e dell'addotto tioimidato, che si forma una volta che nirmatrelvir inibisce M^{pro} in modo covalente reversibile.
(Joyce, R. P.; et al. 2022)

Un processo di inibizione covalente può essere schematizzato come segue:¹²



(E rappresenta l'enzima, I l'inibitore).

Esso presenta due step: il primo dove l'inibitore, in questo caso rappresentato da nirmatrelvir, si lega all'enzima e forma un complesso enzima-inibitore in cui le interazioni tra i due non sono covalenti e la reazione è reversibile; il secondo step dove il complesso progredisce a una situazione dove l'interazione tra l'enzima e l'inibitore diventa irreversibile ed è costituita da un legame covalente che porta alla cessazione dell'attività catalitica della macromolecola.¹² Il primo step del processo è regolato dalla costante cinetica K_i ($K_i = k_2/k_1$), mentre il secondo dalla costante di inattivazione k_3 (K_{inact}).¹²

Si può assumere che, nel caso di un'inibizione covalente reversibile, l'interazione tra le due entità coinvolte, anche se covalente, non sia tale da rendere il processo irreversibile.

Infatti, la reversibilità dell'interazione, è stata comprovata. Questa è stata dimostrata incubando la proteasi M^{pro} di SARS-CoV-2, dapprima con nirmatrelvir (sia la proteasi che il composto in concentrazione 2 mM) e poi con un inibitore covalente irreversibile della stessa, quello che in **figura 20** viene denominato "composto 7". Protraendo l'incubazione per 30 minuti e monitorando l'attività dopo una diluizione di 100 volte, si è riscontrato come nel caso della miscela contenente nirmatrelvir, l'attività di M^{pro} venisse recuperata con una percentuale maggiore al 50%, a differenza della miscela contenente l'altro inibitore, che non ha mostrato alcun recupero, come reso

evidente dalla **figura 20**.²² Ciò ha provato che l'inibizione operata da nirmatrelvir è reversibile.

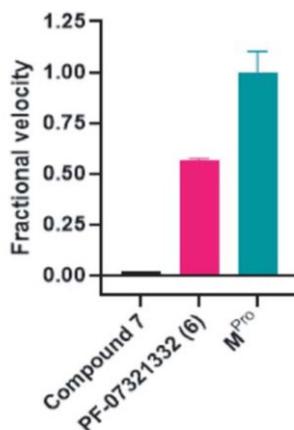


Figura 20. Grafico che mostra il recupero dell'attività enzimatica di M^{pro} in tre esperimenti indipendenti.
(Owen, D. R.; et al. 2021)

Nirmatrelvir, in effetti, è in grado di fare ciò grazie alla presenza della porzione P1' elettrofila, contenente il nitrile. Questo gruppo funzionale, mima l'ammide peptidico delle poliproteine virali, che sono il substrato di M^{pro} di SARS-CoV-2. Il nitrile ha un moderato carattere elettrofilo e, di conseguenza, necessita della presenza di gruppi nucleofili piuttosto reattivi per poter reagire.^{12,23} In questo caso proprio il tiolo presente nel sito attivo della proteasi.^{12,23}

Quello che si verifica è un attacco nucleofilo al carbonio del gruppo nitrile, che ha luogo dopo un trasferimento protonico da Cys145 a His41, con conseguente formazione di un addotto tioimidato in S1', come mostrato nella **figura 21**.¹² Questo viene stabilizzato grazie alle interazioni che si vengono a formare tra l'azoto imminico e i residui Gly143 e Cys145 dell'*oxyanion hole*.^{12,14,24}

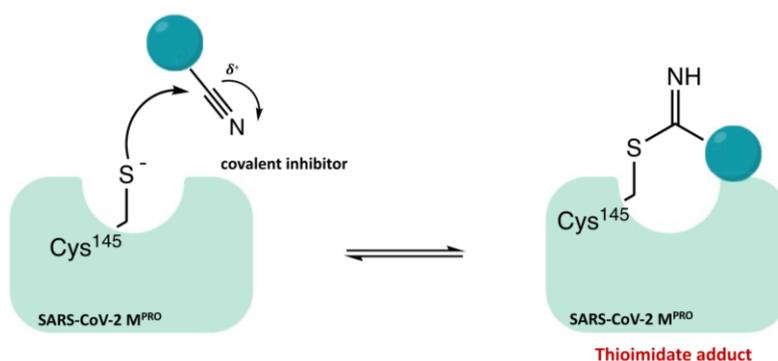


Figura 21. Meccanismo riguardante l'inibizione dell'attività enzimatica di M^{pro} di SARS-CoV-2, prendendo in esame come gruppo reattivo il gruppo nitrile.
(La Monica, G.; et al. 2022)

Durante il processo che porta alla formazione del legame covalente, si può assumere che avvengano altri due trasferimenti protonici: uno dal residuo His41 alla molecola d'acqua presente nel sito attivo della proteasi; l'altro dalla molecola d'acqua all'azoto del gruppo nitrile.¹⁴

Infatti, una caratteristica interessante di M^{pro}, è rappresentata dal fatto che solitamente le proteasi cisteiniche presentano una triade catalitica, ma per quanto riguarda M^{pro} vi è invece la presenza, nel sito attivo, della diade Cys145 e His41 e di una molecola d'acqua che occupa la posizione di quello che sarebbe stato il terzo aminoacido della triade, come mostrato nella **figura 22**.¹¹

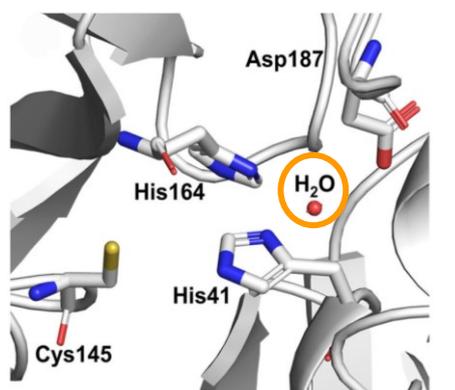


Figura 22. Sito catalitico di M^{pro} di SARS-CoV-2 dove si può notare la diade catalitica, Cys145 e His41, e nelle immediate vicinanze una molecola d'acqua, cerchiata in arancione. (modificata da Hu, Q.; et al. 2022)

Focalizzandosi sulle dimensioni contenute del nitrile, queste possono essere considerate un vantaggio. Difatti, esse permettono di far posizionare agevolmente una molecola d'acqua nelle immediate vicinanze del sito attivo, stabilizzando la coppia ionica che si viene a formare durante il processo catalizzato dalla proteasi.¹⁴

Invece, passando a considerare le altre porzioni della molecola di nirmatrelvir, si può evidenziare come l'anello γ -lattamico (posizione P1) si inserisca nella tasca S1 di M^{pro} e interagisca con His163, Glu166 e His164, attraverso legami a idrogeno e interazioni idrofobiche, come mostrato nella **figura 23B**.^{12,24} Inoltre, il gruppo 6,6-dimetil-3-azabicyclo [3.1.0] esano si colloca nel sito idrofobico S2, ed interagisce con le catene laterali di His41, Met49, Tyr54, Met165 e Glu189 instaurando estese interazioni di Van der Waals.^{12,14,24} Al contrario, il gruppo ter-butilico, essendo esposto al solvente, presenta interazioni poco rilevanti con M^{pro} e, infine, il gruppo trifluoroacetammide forma un'interazione di stabilizzazione con il residuo Gln192 e Glu166, oltre che con due molecole d'acqua ordinate, presenti nel sito.^{12,14,24}

Le diverse interazioni tra il ligando e il target, appena esposte, sono state dedotte analizzando la struttura cristallografica del complesso farmaco-target.

In aggiunta, una mappa di densità elettronica di questa struttura ha mostrato come il carbonio del gruppo nitrile di nirmatrelvir sia legato allo zolfo della cisteina attraverso un legame covalente con lunghezza pari 1.8 Å.^{14,24} Un ingrandimento di questa mappa di densità elettronica, è riportata nella **figura 23A**, dove è raffigurato in giallo il legame covalente, appena descritto.

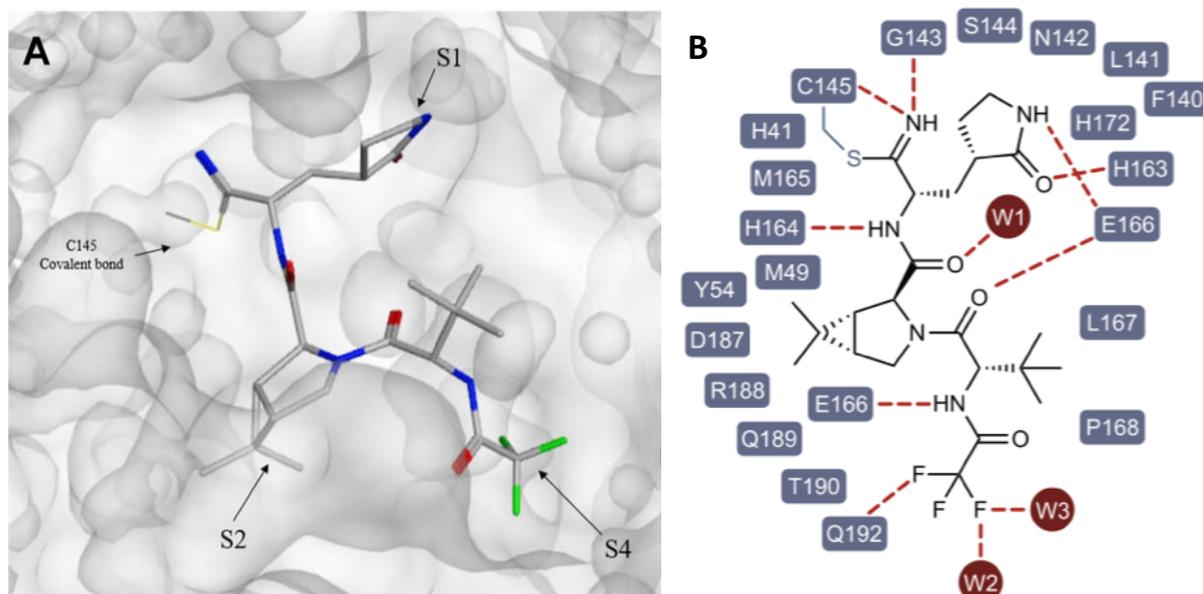


Figura 23. A) Ingrandimento della tasca di legame di M^{pro}, dove è posto il composto nirmatrelvir. In giallo viene evidenziato il legame covalente tra Cys145 e il gruppo nitrile. (Joyce, R. P.; et al. 2022) B) Diagramma dove vengono messe in evidenza le interazioni tra nirmatrelvir e M^{pro} di SARS-CoV-2. (Zhao, Y.; et al. 2022)

Diversi studi computazionali, hanno anche dimostrato che nel processo di binding, tra il ligando e M^{pro}, sono essenziali le porzioni P1 e P2 dell'inibitore, mentre risulta essere meno rilevante la P3.¹² Le prime due contribuiscono positivamente all'energia libera di legame totale e, difatti, se vengono sostituite con altri gruppi si verifica una riduzione importante dell'affinità tra i due soggetti in gioco. Invece, per quanto riguarda la posizione P3, il contributo all'energia libera di legame è emerso essere più contenuto e, di conseguenza, questo suggerisce la possibilità di modificare questo sito per aumentare l'entità dell'interazione.¹²

4.5. Metabolismo di nirmatrelvir

Il metabolismo di nirmatrelvir, all'interno dell'organismo umano, consiste nella sua idrossilazione o deidrogenazione ad opera dell'enzima CYP3A4, come mostrato in figura 24.¹⁴

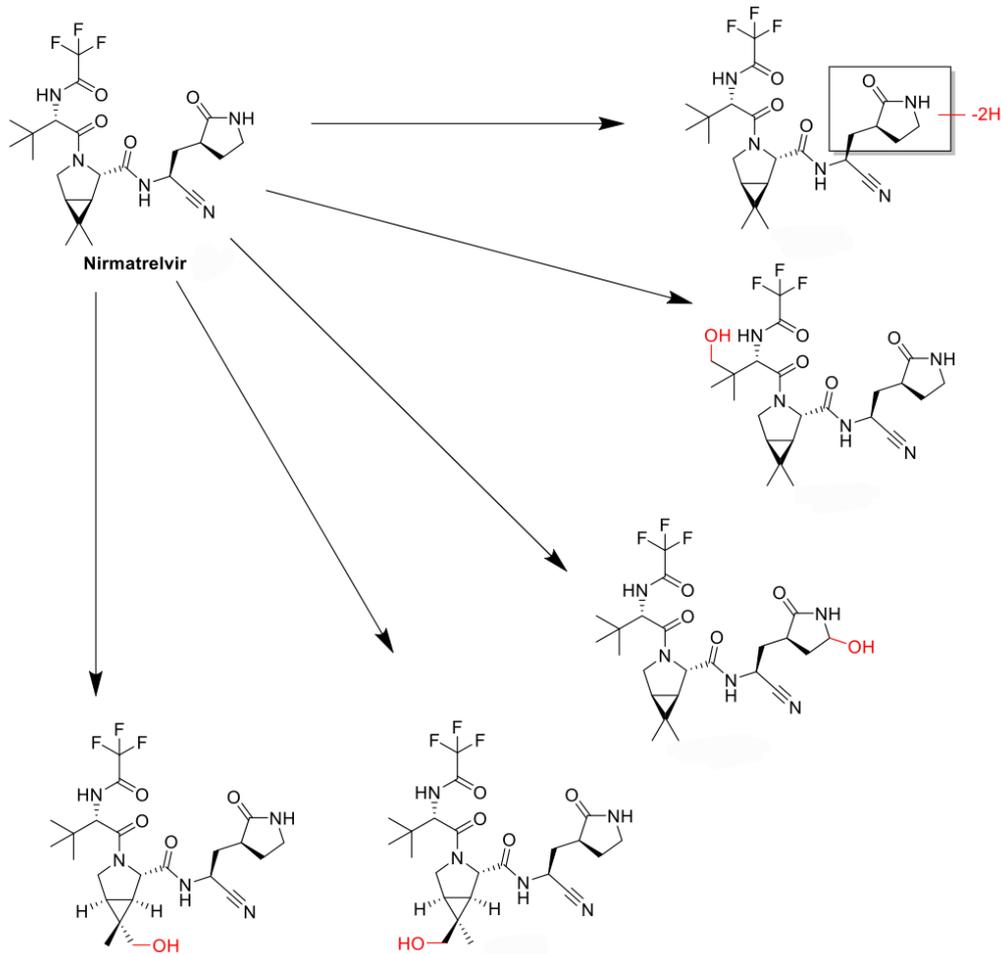


Figura 24. Metabolismo di nirmatrelvir.
(Joyce, R. P.; et al. 2022)

Mediante queste modifiche strutturali è possibile eliminare agevolmente il composto dal sistema, una volta che ha esplicato la sua funzione, dato che esso vede aumentata la sua idrofilicità.¹⁸

Gli enzimi del citocromo P450, hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo di numerose sostanze e in particolar modo di svariati farmaci. Questi catalizzatori biologici, di cui CYP3A4 è l'isoforma più rilevante, sono delle monoossigenasi contenenti il gruppo eme, espresse principalmente nel fegato di un soggetto adulto e nell'intestino tenue.¹⁸

Per rallentare la degradazione di nirmatrelvir, come riportato anche precedentemente, alla formulazione del farmaco è stata aggiunta la molecola di ritonavir che permette di aumentare l'efficacia del medicinale, migliorandone la farmacocinetica.

5. Conclusioni

Paxlovid, rispetto a quanto emerso ed esposto in questo elaborato, ha dimostrato di assolvere adeguatamente allo scopo per il quale è stato sviluppato: contrastare la replicazione virale del virus SARS-CoV-2.

Esso, ha rappresentato un punto di svolta nel trattamento della patologia COVID-19, fornendo la possibilità di essere assunto per via orale, modalità nettamente preferita rispetto a quella endovenosa.

Inoltre, questo medicinale, resta uno dei pochi strumenti che permette di fronteggiare la patologia per quanto riguarda i pazienti ad alto rischio, soprattutto da quando sono state revocate le autorizzazioni per l'impiego degli anticorpi monoclonali contro COVID-19.¹⁶

Lo sviluppo razionale di questo farmaco è una chiara dimostrazione di come, partendo da quanto è noto, mettendo insieme le conoscenze possedute e collaborando per un fine comune sia possibile ottenere qualcosa di nuovo che adempia all'obiettivo prefissato.

Oltre a ciò, il fatto che si sia puntato su M^{pro} come target molecolare, è risultato essere una strategia piuttosto proficua. Questa proteasi, infatti, risulta essere altamente conservata, nonostante l'alta mutabilità dei coronavirus, e una sua variazione può addirittura comportare l'incapacità del virus a replicarsi.²³

Guardando verso il futuro e tenendo conto che gli ultimi due decenni sono stati contraddistinti da epidemie causate da coronavirus, sembra essere evidente come lo studio di terapie sempre più efficienti verso questi microrganismi sia di fondamentale importanza, ponendo M^{pro} al centro di questo processo.

Abbreviazioni

COVID-19	Coronavirus Disease-19
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
RNA	RiboNucleic Acid
ORFs	Open Reading Frames
nsp	non-structural proteins
PL^{pro}	Papaine-Like protease
M^{pro}	Main protease
ACE2	Angiotensin-Converting Enzyme 2
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serine 2
gRNA	genomic RiboNucleic Acid
sg-mRNA	Subgenomic messenger RiboNucleic Acid
3CL^{pro}	3C-Like Protease
FDA	Food and Drug Administration
MHRA	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency
EMA	Agenzia Europea per i Medicinali
EPIC-HR	Evaluation of Protease Inhibition for COVID-19 in High-Risk Patients
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
EC₅₀	half-maximal effective concentration
CPE	Cytopathic Effect
DPP-4	Dipeptidil peptidasi-4

Bibliografia

1. Shereen, M. A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. *J. Adv. Res.* **2020**, *24*, 91-98
2. Whang, M.-Y.; Zhao, R.; Gao, L.-J.; Gao, X.-F.; Wang, D.-P.; Cao, J.-M. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 587269
3. Chong, Z. X.; Liew, W. P. P.; Ong, H. K.; Yong, C. Y.; Shit, C. S.; Ho, W. Y.; Ng, S. Y. L.; Yeap, S. K. *Pat. Res. Pract.* **2021**, *225*, 153565
4. Ye, Z.-W.; Yuan, S.; Yuen, K.-S.; Fung, S.-Y.; Chan, C.-P.; Jin, D.-Y. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 1686-1697
5. Yuki, K.; Fujiogi, M.; Koutsogiannaki, S. *Clin. Immunol.* **2020**, *215*, 108427
6. Chen, Y.; Liu, Q.; Gou, D. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 418-423
7. Romano, M.; Ruggero, A.; Squeglia, F.; Maga, G.; Berisio, R. *Cells* **2020**, *9*, 1267
8. Malone, B.; Urakova, N.; Snijder, E. J.; Campbell, E. A. *Mol. Cell. Biol.* **2022**, *23*, 21-39
9. Lamers, M. M.; Haagmans, B. L. *Nature* **2022**, *20*, 270-284
10. Hu, Q.; Xiong, Y.; Zhu, G.-H.; Zhang, Y.-N.; Zhang, Y.-W.; Huang, P.; Ge, G.-B. *MedComm.* **2022**, *3*, e151
11. Ullrich, S.; Nitsche, C. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127377
12. La Monica, G.; Bono, A.; Lauria, A.; Martorana, A. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 12500-12534
13. Chan, H. T. H.; Moesser, M. A.; Walters, R. K.; Malla, T. R.; Twidale, R. M.; John, T.; Deeks, H. M.; Johnston-Wood, T.; Mikhailov, V.; Sessions, R. B.; Dawson, W.; Salah, E.; Lukacik, P.; Strain-Damerell, C.; Owen, C. D.; Nakajima, T.; Świderek, K.; Lodola, A.; Moliner, V.; Glowacki, D. R.; Spencer, J.; Walsh, M. A.; Schofield, C. J.; Genovese, L.; Shoemark, D. K.; Mulholland, A. J.; Duarte, F.; Morris, G. M. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 13686-13703
14. Joyce, R. P.; Hu, V. W.; Wang, *Med. Chem. Res.* **2022**, *31*, 1637-1646

Bibliografia

15. Marzolini, C.; Kuritzkes, D. R.; Marra, F.; Boyle, A.; Gibbons, S.; Flexner, C.; Pozniak, A.; Boffito, M.; Waters, L.; Burger, D.; Back, D. J. Khoo, S. *Clin. Phar. Therap.* **2022**, 0, 0
16. Kozlov, M. *Nature* **2023**, 613, 224
17. Halford, B. *ACS Cent. Sci.* **2022**, 8, 405-407
18. Loos, N. H. C.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 9866
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/b5r5iq1d64>; accesso in rete 4/12/2023
20. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nirmatrelvir>; accesso in rete 4/12/2023
21. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ritonavir>; accesso in rete 4/12/2023
22. Owen, D. R.; Allerton, C. M. N.; Anderson, A. S.; Aschenbrenner, L.; Avery, M.; Berritt, S.; Boras, B.; Cardin, R. D.; Carlo, A.; Coffman, K. J.; Dantonio, A.; Di, L.; Eng, H.; Ferre, R.; Gajiwala, K. S.; Gibson, S. A.; Greasley, S. E.; Hurst, B. L.; Kadar, E. P.; Kalgutkar, A. S.; Lee, J. C.; Lee, J.; Liu, W.; Mason, S. W.; Noell, S.; Novak, J. J.; Obach, R. S.; Ogilvie, K.; Patel, N. C.; Pettersson, M.; Rai, D. K.; Reese, M. R.; Sammons, M. F.; Sathish, J. G.; Singh, R. S. P.; Stepan, C. M.; Stewart, A. E.; Tuttle, J. B.; Updyke, L.; Verhoest, P. R.; Wei, L.; Yang, Q.; Zhu, Y. *Science* **2021**, 374, 1586-1593
23. Citarella, A.; Dimasi, A.; Moi, D.; Passarella, D.; Scala, A.; Piperno, A.; Micale, N. *Biomolecules* **2023**, 13, 1339
24. Zhao, Y.; Fang, C.; Zhang, Q.; Zhang, R.; Zhao, X.; Duan, Y.; Wang, H.; Zhu, Y.; Feng, L.; Zhao, J.; Shao, M.; Yang, X.; Zhang, L.; Peng, C.; Yang, K.; Ma, D.; Rao, Z.; Yang, H. *Protein Cell* **2022**, 13, 689-693