

SARS-CoV-2 a budoucí terapie COVID-19 z pohledu medicínálního chemika

Radim Nencka, Ph.D., vedoucí skupiny Design léčiv a medicínální chemie na ÚOCHB AV ČR

Nákaza koronavirovým onemocněním COVID-19 (z anglického „coronavirus disease 2019“) je způsobena novým typem koronaviru SARS-CoV-2 (z anglického „severe acute respiratory syndrome coronavirus 2“), který se poprvé objevil v hlavním městě čínské provincie Chu-pej, Wu-chanu, pravděpodobně v listopadu roku 2019. V průběhu jen pár měsíců se z původního lokalizovaného ohniska nákazy tento virus rozšířil po všech světadílech (asi jen vyjma Antarktidy) a způsobil globální pandemii onemocnění COVID-19, která zasáhla miliony lidí, a to jak ze zdravotního, tak ekonomického hlediska.

Koronaviry obecně způsobují četná onemocnění u savců a ptáků. První z nich byly objeveny již ve třicátých letech dvacátého století, a to jako původci bronchitid u drůbeže, gastroenteritid u prasat a hepatitid u myší. Donedávna se koronaviry dělily pouze do tří skupin. Mezi alfa- a betakoronaviry patří především savčí viry, kdežto gamakoronaviry zahrnují druhy napadající ptáky. Nově objevené koronaviry napadající prasata a ptáky s určitými společnými genetickými odlišnostmi byly pak zařazeny do čtvrté skupiny deltakoronavirů.

Většina koronavirových infekcí, které pozorujeme u lidí, má pouze mírný průběh a předpokládá se, že koronaviry způsobují přibližně 10-15 % všech případů běžného nachlazení. Nicméně někteří zástupci betakoronavirů, jmenovitě SARS-CoV, MERS-CoV (z anglického „Middle East respiratory syndrome coronavirus“) a SARS-CoV-2 způsobují život ohrožující onemocnění charakterizované závažnými záněty dolních cest dýchacích s poměrně vysokou letalitou. Přičemž SARS-CoV-2 je teprve sedmým známým koronavirem, který způsobuje onemocnění u lidí. Při pohledu do nedávné historie je však dost možné, že naše problémy s koronaviry se budou do budoucna prohlubovat. Je to pravděpodobně spojeno zejména s mírou zalidnění a globalizací naší společnosti. Je zřejmé, že tento stav vyžaduje podrobné studium těchto virů a zejména vhodných terapeutik, které by nám pomohly zvládat krizové situace, jako je právě tato.

Pro design nových přímo působících antivirových (z angl. „direct-acting antivirals“), tedy látek, které působí na virové proteiny, je zásadní pochopit, jakým způsobem je strukturován genom koronavirů, jakým způsobem je replikován, přepsán do struktury virových proteinů a co tyto proteiny pro virus dělají. Díky výzkumu na viru SARS-CoV a MERS-CoV již dnes tyto principy do značné míry chápeme, i když množství dílčích informací nám stále chybí.

Koronaviry patří mezi jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou, jejichž genom patří k nejdelším mezi těmito viry (například SARS-CoV-2 obsahuje ve svém genomu zhruba 30 tisíc nukleotidů). Je dost možné, že díky omezené integritě a schopnosti korigovat strukturu genomu je tato velikost obecně limitní pro RNA viry jako takové. S tím pravděpodobně také souvisí poměrně složitá struktura genomu koronavirů a komplexita replikačních a translačních mechanismů. RNA těchto virů je na svém jednom konci (tzv. 5'-konci) zakončena tzv. „čepičkou“, která chrání virovou RNA před přirozenou imunitou buněk, degradací buněčnými enzymy a zároveň zprostředkovává zahájení přepisu této RNA do struktury proteinu. Na své druhé straně je virová RNA zakončena sekvencí za sebou následujících adenosinových nukleotidů (tzv. polyadenylová skupina). Tyto modifikace na obou koncích umožňují translaci a zvyšují stabilitu RNA v buňkách, buňky ji pak vlastně považují za vlastní mRNA a podobně s ní nakládají.

Možné terapeutické cíle

Vlastní genom koronavirů obsahuje řadu otevřených čtecích rámců, tedy oblastí, které kódují jednotlivé proteiny nebo polyproteiny. Asi třetina celého genomu tvoří informaci pro přípravu

dvou polyproteinů. Ty jsou po translaci „rozstříhány“ dvěma virovými proteázami na 16 různých proteinů (označovaných jako nsp1-16 – což je odvozeno z anglického označení „non-structural protein“ tedy nestrukturní protein). Tyto proteiny se následně účastní sestavení složitého proteinový komplexu tzv. replikázy. Ta je zodpovědná za kopírování koronavirové RNA a její přepis do struktury proteinů.

Na základě informací, které byly zjištěny při studiu jiných koronavirů, zejména SARS-CoV, víme, že řada těchto nestrukturních proteinů má katalytickou funkci, která je pro životní cyklus těchto virů nepostradatelná. Například proteiny nsp3 (PLpro) a nsp5 (3CLpro) mají funkci virových proteáz a jsou nezbytné pro dříve zmíněné rozštěpení polyproteinů na jednotlivé nestrukturní proteiny. Další nestrukturní protein je zodpovědný za aktivitu RNA helikázy (nsp13), tedy enzymu schopného enzymaticky rozplést strukturu dvoušroubovice RNA, která vzniká při kopírování genetické informace viru. Bylo také prokázáno, že nsp14 je exoribonukleáza, která umožňuje viru do jisté míry kontrolovat správnost replikované RNA. Je totiž schopna odstranit nesprávně zařazené nukleotidy na konci nově vznikajícího řetězce RNA v průběhu jejího kopírování pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp). Kromě této funkce je protein nsp14 schopen také metylovat guaninovou nukleobázi, která tvoří dříve zmíněnou čepičku na začátku virové RNA molekuly. Na druhé straně, nsp15 má aktivitu endoribonukleázovou, která slouží k rozkladu virové RNA po replikaci a virus ji zřejmě využívá k tomu, aby se vyhnul časnému rozpoznání hostitelskými buňkami, zejména makrofágy. Podobně jako nsp14 i nsp16 má metyltransferázovou aktivitu, ale v tomto případě nemetyluje guaninovou nukleobázi, ale slouží k metylaci cukerné části prvního nukleotidu virové RNA, tedy další modifikace, která je součástí čepičky. Podobně jako u ostatních RNA virů je pro replikaci virového genomu zásadní zejména RNA-dependentní RNA polymeráza, tedy enzym, který je schopný přepsat virový genom z původní +RNA do -RNA a vytvořit kopie +RNA, které jsou následně zabaleny do virové kapsidy a dalších virových obalů. U SARS-CoV-2 a dalších koronavirů je tato funkce spojena s nsp12.

Obecně lze říci, že všechny tyto proteiny mají alespoň určitý potenciál stát se cíli pro design nových léčiv, díky své katalytické funkci a často také dobře definovanému místu vázícímu substrát pro danou reakci (přestože například nsp15 není v mnoha buňkách pro virovou replikaci nezbytný). Další nestrukturní proteiny hrají většinou podpůrnou a aktivační roli. Například koronavirová RdRp pro svou funkci potřebuje řadu podpůrných proteinů, které výrazným způsobem zvyšují její aktivitu, jedná se o proteiny nsp7-9. Nsp10 je pak důležitým aktivačním kofaktorem pro nsp14 a 16. Přerušení protein-proteinových interakcí mezi těmito proteiny může proto také vést k pozastavení replikace těchto virů. Je samozřejmě také možné cílit na strukturní proteiny SARS-CoV-2, které jsou kódovány poslední třetinou virové RNA. Těmto proteinům se ale tento text nebude podrobněji věnovat.

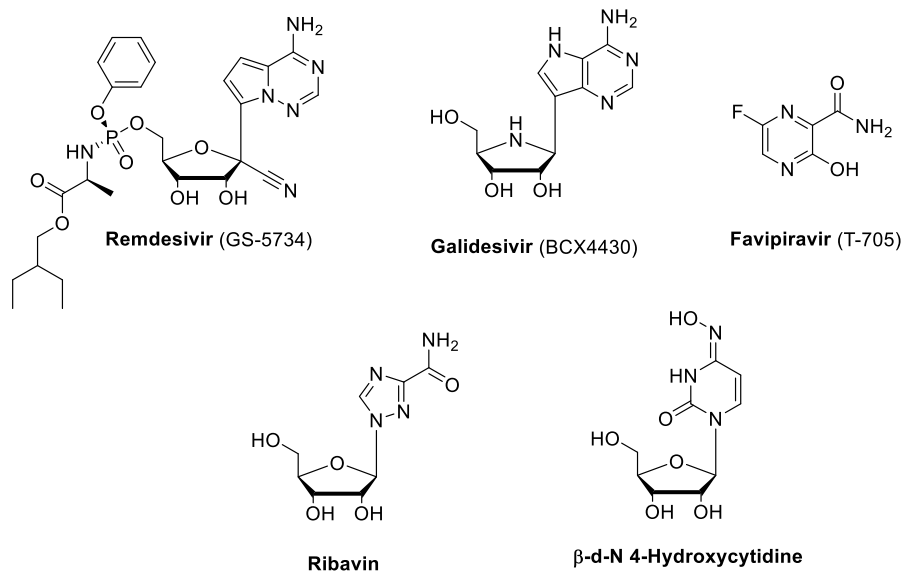
Lze předpokládat, že hlavními proteiny, na které se bude zaměřovat pozornost medicínálních chemiků v blízké budoucnosti, budou zejména RdRp, obě proteázy a virová helikáza. Vývoj látek inhibujících funkce nsp14-16 bude zřejmě spíše okrajový.

Pojďme se proto podívat na látky, eventuálně typy látek, které by do budoucna mohly hrát důležitou roli v terapii SARS-CoV-2.

Nadějně molekuly

Už dnes je zřejmé, že hlavní slovo budou mít v terapii látky schopné inhibovat funkci RNA – dependentní RNA polymerázy. Jako nejnadějnější se v současné době jeví látky, které nepůsobí jako pravé terminátory řetězové polymerační reakce, ale spíše dochází k jejich inkorporaci do RNA a následnému „opožděnému“ ukončení polymerační reakce, jako je tomu u nukleotidového derivátu remdesiviru. Podobný mechanismus účinku by mohl mít také galidesivir (BCX4430), který ale na buněčných kulturách nevykazuje zdaleka tak výraznou aktivitu proti koronavirům SARS-CoV a MERS-CoV jako remdesivir (obr. 1).

Další možností je tzv. letální mutagenese, která je předpokládaným mechanismem účinku favipiraviru. Letální mutagenese je děj, při kterém mutagen nebo v tomto případě léčivo indukuje takové množství mutací ve virovém genomu, které je neslučitelné s udržitelností kompaktnosti genetické informace nutné pro životní cyklus viru. Virus tak zmutuje do takové míry, že není schopen další replikace a v principu umírá. Na podobném principu pracují také některá další antivirotika, např. ribavirin, který ale zatím neprokázal významnější aktivitu ani proti SARS-CoV, ani SARS-CoV-2, přestože některé klinické studie s touto látkou stále pokračují. β -d-*N*⁴-hydroxycytidine je v současné době také jedním z potenciálních nadějných nukleosidových analogů. Také u něj je předpokládaným mechanismem účinku letální mutagenese.



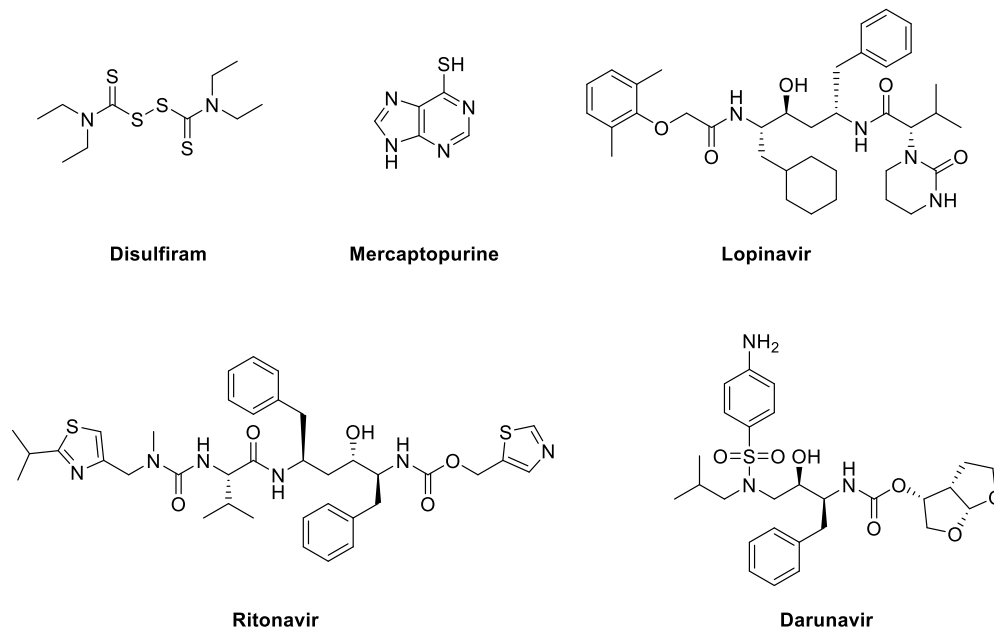
Obr. 1. Příklady nukleosidových a nukleotidových derivátů s potenciálním účinkem proti SARS-CoV-2.

Tato data obecně naznačují, že nová nukleosidová nebo nukleotidová analoga, která budou v nejbližší době designována jako specifická léčiva proti SARS-CoV-2 pravděpodobně nebudou klasickými terminátory polymerázové reakce. To může být způsobeno určitým korekčním mechanismem, který si tyto viry vybudovaly a který je spojený s výše zmíněnou exonukleázovou aktivitou nsp14. Přestože je v dnešní době repertoár nukleosidových derivátů s potenciální aktivitou proti koronavirům poměrně omezen, lze předpokládat, že díky enormnímu úsilí, které bude v následujících měsících a letech výzkumu těchto látek věnováno, bude objevena řada nových, nebo již dříve známých derivátů s potenciálem SARS-CoV-2 inhibovat a dostat se do klinické praxe.

Druhou skupinou látek, která jistě najde své místo v léčbě COVID-19 nebo podobných koronavirových infekcí, budou inhibitory proteáz těchto virů. Tyto látky jsou v současné době hledány především mezi již známými léčivy. Mezi inhibitory první z nich PLpro může patřit například disulfiram, využívaný v klinické praxi jako podpůrná léčba u alkoholismu, případně některé deriváty merkaptopurinu, který je využíván k léčbě pacientů s autoimunními onemocněními a rakovinou. Obě tyto látky jsou schopny inhibovat PLpro SARS-CoV nebo MERS-CoV a mohly by najít uplatnění také v tomto případě.

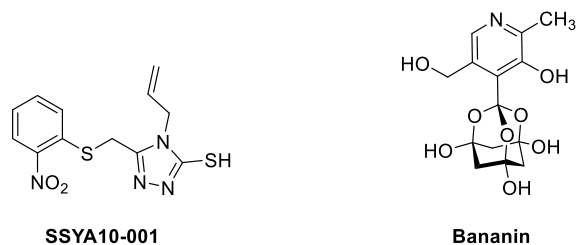
Velká pozornost pak bude zřejmě věnována výzkumu inhibitorů 3CLpro, která je hlavní proteázou těchto virů a je zodpovědná za odštěpení největšího počtu proteinů z původních polyproteinů vzniklých translací. V současné době si pozornost získaly zejména látky schválené pro inhibici HIV proteázy. Jmenovitě lopinavir, ritonavir, darunavir v kombinaci s combicistatem a některé další experimentální preparáty. Přestože některé z těchto látek mají prokazatelnou aktivitu jak na buněčných kulturách, tak na zvířecích modelech SARS-CoV nebo MERS-CoV,

jejich účinnost na pacientech s COVID-19 zatím nebyla prokázána. Je zcela zjevné, že obě proteázy jsou vhodným cílem pro protivirovou terapii a je zřejmé, že se stanou důležitou součástí terapie koronavirových onemocnění a předmětem intenzivního studia, a to jak na půdě akademické, tak ve farmaceutickém průmyslu. V tomto případě bude pravděpodobně výzkum znatelně potencionován strukturálně biologickými studiemi a molekulovým modelováním.



Obr. 2. Příklady inhibitorů koronavirových proteáz.

Posledním molekulárním cílem, o kterém bude tento text pojednávat, je koronavirová helikáza. Tento enzym hraje důležitou úlohu v patogenezi koronavirových onemocnění. I přesto je vývoj většiny látek spojených s tímto cílem ve velmi raných stádiích a je známo jen několik málo látek, které jsou schopny tento koronavirový enzym efektivně inhibovat. Jedná se například o látku SSYA10-001, inhibitor, který prokázal aktivitu proti helikázové aktivitě SARS-CoV nsp13, bez ovlivnění spojené ATPázové aktivity. Naproti tomu adamantanová analoga zvané bananiny vykazují aktivitu jak proti helikázové, tak proti ATPázové aktivitě tohoto proteinu. Obecně se ale virové helikázy považují za vhodné cíle pro protivirovou terapii, a proto lze očekávat, že budou vyvíjeny nové inhibitory i pro tento enzym.



Obr. 3. Příklady inhibitorů koronavirových helikáz.

Toto je jen krátký přehled možných přístupů k potenciální terapii koronavirových infekcí s ohledem na nestrukturní proteiny těchto virů. Nejsou zde zohledněny strukturní proteiny, jako například spike glykoprotein, nebo struktury hostitelských buněk, které jsou nepostradatelné pro virovou replikaci. I v tomto případě bude zřejmě na prvním místě studium látek, které jsou již v aktivní klinické praxi a jejich schválení může být proto výrazně rychlejší. Jedním z takovýchto příkladů je hydrochlorochin – látka, která inhibuje acidifikaci endosomu během infekce a zabraňuje vstupu viru do buněk.

Všechny tyto potenciální molekulární cíle ale pravděpodobně budou v nejbližší době využity pro nalezení účinné terapie pro COVID-19 a další, obdobně závažná koronavirová onemocnění. Je také velmi pravděpodobné, že v budoucnosti budeme při zvládnutí COVID-19 používat kombinace takto získaných léčiv a případně přistupovat k terapii v závislosti na průběhu onemocnění a stavu pacientů. Antivirovou léčbu bude nutné aplikovat co možná v nejranějším stadiu onemocnění, zatímco pozdější stadia budou spojená s přehnanou imunitní odpovědí organismu, tzv. cytokinovou bouří, (z anglického „cytokine storm“). Zde bude zřejmě vhodné aplikovat léčiva typu protilátek proti receptorům pro interleukin IL-6, jako například tocilizumab nebo sarilumab, případně proti dalším receptorům, např. CCR5.