

› Leseprobe aus dem Buch ‹

#Anticovidwissen Arzneistoffe gegen SARS-CoV-2 Targets, Mechanismen, Wirksamkeit

Dr. Christian Asche • Florian Fani



ISBN: 978-3-96543-201-7

© Lehmanns Media GmbH, Berlin 2021
www.lehmanns.de

Alle Rechte vorbehalten.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für die Verarbeitung auf elektronischen Systemen sowie für die Verbreitung auf Internet-Plattformen.

Das Bild dient lediglich als Referenz. Das Produkt kann von der Abbildung abweichen.

Umschlag: Jasmin Plawicki
Satz & Layout: LATEXLibertinus Volker Thurner, Berlin
Druck und Bindung: Elanders • Waiblingen

> Klappentext <

Während immer mehr Impfstoffe zugelassen werden, bleibt die Frage nach der Behandlung von COVID-19 von kritischer Bedeutung. Denn die Kandidatenliste ist zwar lang, dennoch fehlt bislang ein spezifisch gegen SARS-CoV-2 wirksames Medikament.

Dieses Fachbuch präsentiert ausgewählte präventive und therapeutische Ansätze im medikamentösen Kampf gegen das neuartige Coronavirus. Im Zentrum steht dabei die vielversprechende Strategie, bereits bekannte Arzneistoffe umzuwidmen. Mit der Leitfrage: Gegen welche Angriffsziele richten sich potenzielle Arzneistoffe und wie wirken sie auf molekularer Ebene?

Die fundierte Übersicht diverser Arzneistoffe mit ihren Targets und Wirkmechanismen ebnet Ärzten und Klinikpersonal, Pharmazeuten und Apothekern den Weg, die dynamische Entwicklungslage auf der Suche nach einem „Corona-Medikament“ aus medizinisch-chemischer Sicht selbst einzuordnen. Ergänzende Informationen zum Buch werden unter **anticovidwissen.de** bereitgestellt.

> Die Autoren <

Christian Asche forschte nach seiner Promotion in medizinisch-pharmazeutischer Chemie zu Antikörper-Zytostatika-Konjugaten, bevor er sich 2008 als Apotheker niederließ. Seit 2011 schreibt er über neue Arzneistoffe und deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Florian Fani arbeitete nach seinem Universitätsdiplom in Biologie als Molekulargenetiker und ist seit 2014 als Wissenschaftslektor tätig.

Kapitel 2

Hintergrund: Zoonosen durch Coronaviren

„Wir agieren im globalen Dorf: Das macht die Wege auch für hochinfektiöse Viren kurz. Virologen sprechen von etwa 40 weiteren zoonotischen Viren mit einem Pandemie-Potenzial von Sars-CoV-2“, schreibt der Bundesminister für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Gerd Müller (2020), in einem Gastbeitrag für den SPIEGEL. Hinzu kommen Prionen, Bakterien, Pilze und parasitäre Einzeller (Protozoen), Würmer (Helminthen) und Arthropoden (v. a. Milben) als Ursache der etwa 200 bekannten Infektionskrankheiten, die zwischen Mensch und Tier wechselseitig übertragbar sind. Diese Krankheiten werden Zoonosen genannt.

Neue Infektionskrankheiten sind zu ungefähr 70 % tierischen Ursprungs – und Coronaviren befinden sich an der Frontlinie, wie Ou et al. (2020) formulieren. Die Größenordnung der jährlich zu verzeichnenden Ausbrüche liegt bei 200. Dass eines dieser epidemischen Ereignisse sich zur globalen Katastrophe ausweiten könnte und dass Coronaviren geeignete Kandidaten dafür darstellen, war der wissenschaftlichen Community schon länger bewusst. „Event 201“ war eine entsprechende Pandemie-Übung des Center for Health Security der Johns-Hopkins-Universität unter hochrangiger institutioneller Beteiligung am 18. Oktober 2019 (<https://www.centerforhealthsecurity.org/event201/>). Der Simulation wurden die Erkenntnisse aus der SARS-Epidemie zugrunde gelegt. Im Ergebnis wurde deutlich, dass die Welt auf ein derartiges Szenario unzureichend vorbereitet ist (Center for Health Security 2020). In einer Publikation warnte ein chinesisches Forscherteam

bereits im März 2019 vor einem möglichen Ausbruch aus China durch ein neues Coronavirus, das von der Fledermaus auf den Menschen überspringt (Fan et al. 2019). Die Erfahrungen mit SARS und MERS hatten gezeigt, dass ein solches Szenario durchaus tödlich verlaufen kann.

Für Coronaviren als Kandidaten für eine zoonotische Pandemie sprachen einerseits die einfache Übertragung über die Luft und die hohe Infektiosität, andererseits war gerade das breite Wirtsspektrum der Coronaviren aus der Veterinärmedizin bekannt. Beispielsweise hat das Humane Coronavirus (HCoV) OC43 eine verblüffende genetische Ähnlichkeit zum bovinen Coronavirus (BCoV), das zumindest unter experimentellen Bedingungen Truthähne befallen kann. Ein weiteres Beispiel bietet das enterische Coronavirus des Hundes (CECoV), an dem auch Schweine und Katzen erkranken können (Schmitt et al. 2005). Die Transmissible Gastroenteritis (TGE) wiederum wird durch ein Subtyp des Alphacoronavirus 1 verursacht (transmissible gastroenteritis coronavirus), der bei etwa 90 % der infizierten neugeborenen Schweine zum Tod führt. Weitere Beispiele sind PEDV (Porcine epidemic diarrhea virus) und HEV (Porcine haemagglutinating encephalomyelitis). Coronaviren kommen als Auslöser diverser Erkrankungen in allen vier Landwirbeltierklassen vor, insbesondere bei Vögeln und Säugetieren, aber auch bei Amphibien und Reptilien. Die meisten Coronaviren vermehren sich, zumindest anfangs, entweder im Respirationstrakt oder im Gastrointestinaltrakt oder in beiden (Schmitt et al. 2005).

Seit Beginn dieses Jahrhunderts hat es bislang drei zoonotische Ausbrüche von Betacoronaviren gegeben:

1. 2002 brach in der chinesischen Provinz Guangdong eine neuartige schwere respiratorische Erkrankung aus. Als Auslöser konnte das Betacoronavirus der Abstammungslinie B (seit 2018 Untergattung *Sarbecovirus*) aus der Fledermaus und dem Bänderroller identifiziert werden (Guan et al. 2003, Li et al. 2005). Die WHO (World Health Organization) registrierte 8098 Fälle der neuen Erkrankung, wovon 774 letal verliefen (Schmitt et al. 2005). Das Virus wurde als SARS-Coronavirus (SARS-CoV) identifiziert, wobei SARS für „severe acute respiratory syndrome“ steht (Drosten et al. 2003, Ksiazek et al. 2003). Die SARS-Pandemie 2002/2003 löste eine intensiviertere Beforschung der Coronaviren aus
2. Nach SARS-CoV sorgte das „middle east respiratory syndrome coronavirus“ MERS-CoV im Jahr 2012 für 2494 bestätigte Infizierte und 858 Tote in Saudi-Arabien (Zaki et al. 2012, Corman et al. 2015). Das Betacoronavirus der

Abstammungslinie C (seit 2018 Untergattung *Merbecovirus*) ist im Mittleren Osten nach wie vor aktiv. Als Wirtsreservoir gilt das Dromedar.

3. Auslöser der aktuellen Pandemie ist das neuartige SARS-CoV-2 (ursprünglich 2019-nCoV), das erstmals Ende 2019 bei Patienten mit einer schweren Pneumonie in der Hauptstadt der chinesischen Hubei-Provinz Wuhan nachgewiesen wurde (¹Huang et al. 2020). Die Sequenzierung des SARS-CoV-2-Genoms zeigte, dass das Betacoronavirus der Untergattung *Sarbecovirus* (ehemals B-Linie) eng verwandt ist mit dem SARS-like(SL)-Coronavirus RaTG13 aus der Fledermaus, das 2013 in einer Höhle in Yunnan, China entdeckt worden war (¹Huang et al. 2020, ²Huang et al. 2020, Lupia et al. 2020, Zhou et al. 2020). Die 96-prozentige Sequenzidentität zwischen diesen beiden Viren legt nahe, dass SARS-CoV-2 vom SL-Virus abstammt. Die Frage nach einem möglichen Zwischenwirt ist noch nicht eindeutig beantwortet.

Das Bild von Humanen Coronaviren (HCoV) als harmlose Erreger war schon nach SARS und MERS nicht mehr aufrechtzuerhalten. Zwar verursachen Coronaviren beim Menschen häufig harmlos verlaufende Infektionen der oberen, seltener der unteren Atemwege (Modrow et al. 2010, Ou et al. 2020), aber auch enterische, renale oder neuronale Symptome sind möglich (Ou et al. 2020). Man geht davon aus, dass ein gewöhnlicher grippaler Infekt mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % durch HCoV bedingt ist (Makela et al. 1998, Cavanagh 2004), wobei insgesamt etwa 200 Virenarten (Rhinoviren, Adenoviren, Influenzaviren, Coronaviren) Erkältungen oder Grippe-symptome auslösen können. Subklinische Verläufe oder sehr mild verlaufende Infektionen sind typisch und können das ganze Jahr über auftreten. Einige Publikationen erwähnen schwerwiegenere Verläufe bei Beteiligung des unteren respiratorischen Trakts, wie z. B. Pneumonien. Hier finden sich häufig zusätzliche Risikofaktoren, die zum schwereren Verlauf beitragen, z. B. eine Immunsuppression (Pene et al. 2003). Bei älteren Patienten, die aufgrund kardiopulmonaler Krankheiten hospitalisiert wurden und die einen schweren grippalen Infekt erlitten, aber beispielsweise gegen Influenza negativ getestet wurden, zeigen weiterführende Untersuchungen zu 8 % entweder 229E oder OC43 als Krankheitsauslöser (Falsey et al. 2002).

Wie im folgenden Abschnitt ausgeführt wird, verlaufen auch bei SARS-CoV-2 die meisten Fälle mild – und doch wird die aktuelle Pandemie weltweit mehr als zwei Millionen Tote zur Folge haben. Ob der Fall-Verstorbenen-Anteil nun bei über 4 % (Zhu et al. 2020, publiziert im August) oder eher bei rund 2 % (Petrosillo et al. 2020, publiziert im März) liegt, deutlich höher sind die 9,5 % bei SARS und die 34,4 % bei MERS (Petrosillo et al. 2020). Die SARS-Pandemie von 2002/2003 forderte 774

Tote unter 8096 Infizierten, während die MERS-Pandemie von 2012 in 27 Staaten unter 2494 bestätigten Infektionsfällen 858 Menschen das Leben kostete (Parlikar et al. 2020). Tatsächlich ist die Letalität von SARS-CoV-2 mit einigen Unsicherheiten behaftet und noch nicht zu beurteilen. Kritiker mögen vielleicht hervorbringen, dass in Wirklichkeit dreimal mehr Menschen infiziert seien als die nachgewiesenen Fälle und dass etwa nur ein Viertel der offiziellen Todesfälle kausal auf die Infektion zurückzuführen sei. In Zahlen lautet diese Annahme: 250.000 COVID-19-Tote unter grob 100 Millionen (statt einer Mio. unter 32 Mio.) Infizierten entspricht einer Todesrate von 0,25 %. Doch eine solche Annahme unterstreicht sogar noch die Tendenz in einer Kernaussage, die unumstritten eindeutig sein dürfte: Eine Infektion mit SARS-CoV-2 verläuft viel seltener tödlich als eine Infektion mit MERS, aber SARS-CoV-2 ist unter dem Strich dennoch um ein Vielfaches tödlicher als MERS, da **infektiöser**. Nochmal zur Veranschaulichung: Ein Virus mit einer Letalität von 50 % verursacht eine Million Todesfälle schon unter 2 Millionen Infizierten. Hingegen wird ein Virus, das eine Milliarde Menschen befällt und „nur“ 1 % von ihnen tötet, 10 Millionen Todesfälle verursachen. Unter Berücksichtigung der Kritik an den Statistiken ist die Verringerung der Infektionszahlen von SARS-CoV-2 aus epidemiologischer Sicht demnach umso wichtiger. Gerade angesichts asymptomatischer Verläufe sind die Vermeidung von Menschenansammlungen, körperlicher Abstand, Isolation und Quarantäne die einzigen effektiven Maßnahmen für eine solche Reduzierung von Übertragungen. Zugleich deutet sich die Reduzierung der viralen Infektiosität hiermit als Ansatzpunkt für die pharmazeutische Forschung an.

Naturzerstörung ist Selbstzerstörung. Noch besser wäre daher die Prävention durch eine radikale Kehrtwende im Umgang mit der Natur, was hier nicht zu vertiefen ist. Festzuhalten bleibt: Da der Mensch zunehmend mit Wildtieren in Kontakt gerät und in deren Lebensräume eindringt, nehmen Zoonosen seit Jahren stetig zu. Die Wahrscheinlichkeit von dadurch ausgelösten Pandemien steigt einhergehend mit der Beschleunigung des globalisierten Personenverkehrs. Angesichts dessen wird durch die aktuelle Corona-Pandemie die Frage aufgeworfen, wie in der Zukunft Übertragungswege besser unterbrochen und globale Outbreaks eingedämmt werden können.

Literatur

- Center for Health Security 2020, <https://www.centerforhealthsecurity.org/news/center-news/2020-01-17-Event201-recommendations.html>
- Corman, V. M. et al. Clin Infect Dis 2015, 62, 477
- Drosten, C. et al. N Engl J Med 2003, 348, 1967
- Fan, Y. et al. Viruses 2019, 11(3), 210, doi: 10.3390/v11030210
- Guan, Y. et al. Science 2003, 302, 276
- ¹Huang, C. et al. Lancet 2020, 20, 30183
- ²Huang, C. et al. Lancet 2020, 395, 497
- Ksiazek, T. G. et al. N Engl J Med 2003, 348, 1953
- Li, F. et al. Science 2005, 309, 1864
- Lupia, T. et al. J Global Antimicrob Resis 2020, 21, 22
- Müller, G. SPEIGEL.de, 03.05.2020, <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/coronavirus-und-andere-zoonoseerreger-gerd-mueller-bundesentwicklungsminister-warnt-vor-den-gefahren-a-e4e42281-4ad1-460f-9ad3-818117be37b6> (letzter Zugriff: 10.12.2020)
- Ou, X. et al. Nat Commun. 2020, 11, 1620, doi: 10.1038/s41467-020-15562-9
- Parlikar, A. et al. PeerJ 2020, 8: e9576, doi: 10.7717/peerj.9576
- Petrosillo, N. et al. Clin Microbiol Infec 2020, 26(6), 729-734, doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.026
- Schmitt, A. et al. In: Coronaviruses with Special Emphasis on First Insights Concerning SARS 2005, Birkhäuser Verlag, Basel - Boston – Berlin
- Zaki, A. M. et al. N Engl J Med 2012, 367, 1814
- Zhou, Y. et al. MedRxiv 2020, doi: 10.1101/2020.02.11.20021956
- Zhu, Z. et al. Respir Res 2020, 21, 224, doi: 10.1186/s12931-020-01479-w

Hemmung der RNS-abhängigen RNS-Polymerase

7.1 Remdesivir (GS-5734)

Remdesivir ist das erste zugelassene Medikament zur Behandlung von COVID-19 und einer SARS-CoV-2-Infektion. Der Wirkmechanismus basiert auf Hemmung der RNS-abhängige RNS-Polymerase (RdRP) und Kettenabbruch bei der RNS-Synthese, wobei Remdesivir (GS-5734) das prominenteste Nukleosid-Analagon-Prodrug mit Breitspektrum-Aktivität gegen zahlreiche RNS-Viren ist, darunter Filoviren, Paramyxoviren, Pneumoviren und pathogene Coronaviren wie SARS-CoV und MERS-CoV (Sheahan et al. 2017). Die Wirksamkeit kann noch nicht endgültig beurteilt werden, scheint aber insbesondere von einem möglichst frühzeitigen Einsatz abhängig zu sein. Dies wird nachfolgend im Zusammenhang mit der Studienlage erläutert, bevor ausführlich auf den Wirkmechanismus eingegangen wird.

Zulassung und Anwendung

In Deutschland ist Remdesivir seit Juli 2020 über die EU-Kommission bedingt zugelassen, die damit auf der Basis der NIAID-Studie ACTT-1 (Adaptive COVID-19 Treatment Trial) und nach den Notfallzulassungen in USA und Japan der Empfehlung der EMA nachgekommen ist. Indiziert ist Remdesivir bei sauerstoffpflichtigen

Erwachsenen und Jugendlichen ab 12 Jahren und 40 kg mit einer SARS-CoV-2-bedingten Pneumonie. Die Therapiedauer sollte mindestens 5 Tage und nicht mehr als 10 Tage betragen. Die Behandlung startet am ersten Tag mit einer Dosis von 200 mg Remdesivir, gefolgt von 100 mg Remdesivir einmal täglich (¹European Medicines Agency 2020). Das Virustatikum wird in Form des Arzneimittels Veklury[®] als intravenöse Infusion verabreicht.

Studienlage

Wie viele andere Virustatika, ist Remdesivir ein Prodrug, dessen chemische Struktur der des Adenosins ähnelt (Tu et al. 2020). Zwar ist bekannt, dass Nukleotid-Analoga generell eine eher geringe Aktivität gegen Coronaviren mit ihrem Exonuklease-Proofreading besitzen, nichtsdestotrotz zeigt sich Remdesivir wirksam gegen Stämme von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV und Fledermaus-Coronaviren (Sheahan et al. 2020). In Gewebekulturen zeigt Remdesivir halbmaximale effektive Konzentrationen (EC_{50}) von 0,069 nM gegen SARS-CoV und 0,074 nM gegen MERS-CoV. Von Bedeutung ist zusätzlich, dass Remdesivir auch Aktivitäten gegen eine Reihe von hochdivergenten Coronaviren im submikromolaren EC_{50} -Bereich aufweist, einschließlich der endemischen humanen Coronaviren OC43 und 229E. Damit ist zunächst gezeigt, dass Remdesivir eine breite Anti-Coronaviren-Aktivität besitzt (Brown et al. 2020). In einem Mausmodell für SARS-CoV bewirkt eine frühzeitige Remdesivir-Applikation einen signifikanten Rückgang der Virusladung in der Lunge. Virale Titer konnten um mehr als zwei Potenzen an den Tagen 4 und 5 nach Infektion gesenkt werden. Außerdem verbessert Remdesivir die klinischen Symptome der Erkrankung sowie die respiratorische Funktion im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Gruppe (Sheahan et al. 2020). Vergleichbare Resultate werden innerhalb prophylaktischer Studien mit MERS-CoV in einem transgenen Mausmodell erzielt. In diesem Modell wird ein humanisierter MERS-CoV-Rezeptor exprimiert (hDPP4; humanized dipeptidyl peptidase 4). Dafür wird die Carboxylesterase 1c (Ces1c) nicht mehr exprimiert, um die Pharmakokinetik der Nukleotid-Prodrugs zu verbessern (Cockrell et al. 2016). Die Remdesivir-Spezifität für Coronaviren wird in Zellkulturen nachgewiesen. Nach 23 Passagen in Anwesenheit von Remdesivir können mit Phe2276Leu und Val553Leu zwei Mutationen im viralen RNS-abhängigen RNS-Polymerase-Gen ausgemacht werden. Diese Mutationen erhöhen die Replikationskapazität des Virus in Gegenwart des Remdesivirs (Agostini et al. 2018). Entscheidend ist allerdings, dass die beiden Mutationen die virale Lebensfähigkeit deutlich einschränken und die Pathogenität des SARS-CoV bei Mäusen deutlich verringern (Agostini et al. 2018). Die Effektivität einer prophylaktischen Gabe des

Remdesivirs ist erst kürzlich an einem Primaten-Modell der MERS-CoV-Infektion getestet worden (de Wit et al. 2020). Eine prophylaktische Remdesivir-Gabe 24 Stunden vor Inokulation verhindert eine MERS-CoV-induzierte Erkrankung und dessen Replikation im respiratorischen Gewebe. Daher kommt es auch zu keinen Lungenläsionen. Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn Remdesivir 12 Stunden nach Inokulation appliziert wird (de Wit et al. 2020). Humane Sicherheitsdaten für Remdesivir existieren bereits, da das Nukleotid-Analogon bereits weit fortgeschritten in der Klinik für eine Anwendung beim Ebola-Virus war. Für diese Indikation ist es zunächst entwickelt worden. Deshalb konnten die ersten klinischen Studien zu Remdesivir und SARS-CoV-2 sehr schnell anlaufen (Mulangu et al. 2020).

Nachdem Remdesivir in Rhesus-Affen bei einmalig täglicher i.v.-Applikation von 10 mg/kg über 12 Tage eine signifikante Reduktion der viralen Replikation erzielt und 100 % der Ebola-infizierten Tiere vor einem tödlichen Ausgang der Krankheit geschützt hatte (Warren et al. 2016), sind binnen kürzester Zeit zahlreiche klinische Studien an COVID-19-Patienten mit Remdesivir initiiert worden, u. a. in China (NCT04252664 und NCT04257656), in den USA (NCT04302766), in Frankreich (NCT04314817 und NCT04315948) und in Deutschland (NCT04280705). Die meisten untersuchen die Wirkung des Remdesivirs bei hospitalisierten Erwachsenen mit schwerer COVID-19-Erkrankung. Nicht alle Studien konnten die Eignung des Remdesivirs für eine antivirale Prophylaxe oder eine sofortige Gabe nach Infektion bestätigen, so z. B. eine chinesische Phase-III-Studie – multizentrisch, doppelblind, Placebo-kontrolliert und randomisiert – mit einem Patientenkollektiv von 237 (NCT04257656). Die Studie musste in Wuhan wegen der komplizierten Lage vorzeitig beendet werden. Primärer Endpunkt dieser Studie war zunächst die Zeit bis zur klinischen Verbesserung gemessen am Tag 28 nach Randomisierung (Remdesivir oder Placebo). Zur Auswertung wurde eine Skala für den klinischen Status mit 6 Kategorien benutzt (1: abgesetzt bis 6: Tod). Sekundäre Endpunkte umfassten beispielsweise den klinischen Status an den Tagen 7, 14, 21 und 28 oder Veränderungen der Viruslast im respiratorischen Trakt oder die Häufigkeit schwerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen (¹Wang et al. 2020, ²Wang et al. 2020). Das mittlere Alter der Patienten betrug 65 Jahre (56–71 Jahre). Die Dosierung begann entsprechend zu vorherigen Studien mit 200 mg Remdesivir als Initialdosis gefolgt von 100 mg Remdesivir einmal täglich. Der primäre Endpunkt wurde nicht erreicht. Die klinische Verbesserung unter Remdesivir war statistisch nicht signifikant verschieden von der der Kontrollgruppe (21 Tage in der Remdesivir-Gruppe vs. 23 Tage in der Placebo-Gruppe). Allerdings benötigten diejenigen Patienten, die Remdesivir bekamen, innerhalb von 10 Tagen nach Einsetzen der Symptome eine signifikant kürzere Zeitdauer bis zur klinischen Verbesserung (18 Tage unter

Remdesivir vs. 23 Tage unter Placebo). Die 28-Tage-Mortalität war bei beiden Gruppen ähnlich. 22 Patienten entsprechend 14 % starben in der Remdesivir-Gruppe gegenüber 10 Patienten entsprechend 13 % in der Placebo-Gruppe. Ebenso war die Dauer einer invasiven mechanischen Ventilation in der Remdesivir-Gruppe nicht signifikant kürzer als die in der Placebo-Gruppe. Die Viruslast reduzierte sich in beiden Gruppen im Laufe der Zeit ähnlich. Bei den Patienten unter Remdesivir, von denen Sputum gewonnen werden konnte (103 Patienten), lag die Viruslast aber etwa 1 log-Einheit zu Beginn höher als bei denen unter Placebo. Angepasst an die Basislinie der Virusladung des Sputums, zeigte die Remdesivir-Gruppe keine signifikanten Unterschiede am Tag 5, allerdings einen leicht schnelleren Rückgang der Viruslast. Nebenwirkungen wurden bei 66 % aus der Remdesivir-Gruppe und bei 54 % aus der Placebo-Gruppe beobachtet. Die häufigsten Nebenwirkungen in der Remdesivir-Gruppe waren Verastopfung, Hypoalbuminämie, Hypokaliämie, eine allgemeine Anämie, eine Thrombozytopenie sowie ein Anstieg des Gesamt-Bilirubins. In der Placebo-Gruppe kam zusätzlich ein Anstieg der Asparataminotransferase und ein Anstieg der Plasmalipide hinzu. In der Remdesivir-Gruppe wurden insgesamt 28 schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen beobachtet (entsprechend 18 %). Im Vergleich dazu die Placebo-Gruppe, die 20 schwere Nebenwirkungen entsprechend 28 % zu verzeichnen hatte. Aufgrund der Nebenwirkungen brachen in der Remdesivir-Gruppe 12 % gegenüber 5 % in der Placebo-Gruppe die Therapie vorzeitig ab. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich die Zeit bis zur klinischen Verbesserung unter intravenöser Gabe von Remdesivir nicht signifikant von der der Placebo-Gruppe unterscheidet. Der primäre Endpunkt wurde demnach nicht erreicht (¹Wang et al. 2020, ²Wang et al. 2020). Insgesamt waren die Patienten in dieser Studie weniger stark erkrankt als in anderen. Zudem konnte in *In-vitro*- und in Tiermodellen deutlich gezeigt werden, dass eine frühe Einleitung einer Remdesivir-Therapie substantziell die Viruslast verringert (Sheahan et al. 2017, Agostini et al. 2018). Die meisten der Studien zeigen aber einen deutlichen Vorteil des Remdesivirs bei hospitalisierten schwer an COVID-19 erkrankten Patienten bei frühzeitiger Gabe mit einer signifikanten und schnelleren Verbesserung der klinischen Symptomatik, einer geringeren Mortalität bei akzeptablen Nebenwirkungen.

Aktueller Stand (08.03.2021): Abzüglich der sieben suspendierten, zurückgezogenen oder terminierten Studien werden auf ClinicalTrials.gov 62 klinische Interventionsstudien zum Suchbegriff „Remdesivir and Covid-19“ aufgeführt. Abgeschlossen sind zwei Phase-III-Studien des Remdesivir-Herstellers Gilead Sciences, deren klinische Relevanz fraglich bleibt. Die Studie mit dem Identifier NCT04292899 und dem Akronym SIMPLE zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen einer fünftägigen und einer zehntägigen Behandlung (Goldman et al. 2020), während NCT04292730

im Gegensatz zur zehntägigen Behandlung eine signifikante Verbesserung bei der fünftägigen Behandlung gegenüber der Standardversorgung zeigte (Spinner et al. 2020). Die Dosierung entsprach dabei den obigen Angaben: 200 mg Remdesivir am ersten Tag und täglich 100 mg an den folgenden Tagen (Goldman et al. 2020, Spinner et al. 2020). Verglichen werden sollten die Wirksamkeit und die Sicherheit einer Remdesivir-Therapie entweder für 5 oder für 10 Tage bei schwerer COVID-19-Erkrankung hospitalisierter Patienten mit radiologisch gesicherter pulmonaler Infiltration und einer O₂-Sättigung von 94 % oder weniger. Die Patienten atmeten entweder Umgebungsluft oder erhielten eine O₂-Supplementierung. Patienten, die eine mechanische Ventilation erhielten, wurden von vornherein ausgeschlossen (Goldman et al. 2020). Die Daten wurden von Gilead Sciences gesammelt und die Firma übernahm auch die statistische Auswertung (Doggrell 2020). Insgesamt ist festzuhalten, dass die Remdesivir-Gabe über 5 Tage eine deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante klinische Verbesserung zur Folge hat. Zwischenergebnisse der SOLIDARITY-Studie der WHO veranlassten die Beschränkung der Indikation auf non-invasiv, d. h. nicht-maschinell, beatmeten Patienten (³European Medicines Agency 2020). Diese Studie (NCT04315948) lässt keine Vorteile einer Remdesivir-Behandlung erkennen und kann den Trend zur geringeren 28-Tage-Mortalität nicht bestätigen (WHO 2021). Hospitalisierte Patienten mit schwerer COVID-19-Erkrankung scheinen besser auf Remdesivir anzusprechen. Dies und eine deutliche Verbesserung der Symptomatik konnten Grein et al. (2020) bei 36 von 53 Patienten (68 %) beobachten. Durch den Nachweis der effektiven pulmonalen Viruslast in einem murinen Modell der SARS-CoV-Infektion, einer starken antiviralen Aktivität gegenüber SARS-CoV-2 und einem akzeptablen Sicherheitsprofil gehört intravenös verabreichtes Remdesivir zu den wichtigsten therapeutischen Maßnahmen bei einer schweren COVID-19-Infektion (Ko et al. 2020). In der Zusammenschau könnten die Ergebnisse der klinischen Studien darauf hindeuten, dass atmungspflichtige Patienten tendenziell von einer frühzeitigen Gabe von Remdesivir profitieren.

Ebenfalls abgeschlossen sind die drei ACTT-Studien des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) mit den Identifizierungsnummern NCT04280705, NCT04401579 und NCT04492475. Die laufenden Studien haben insbesondere Kombinationstherapien oder Vergleiche zum Gegenstand, z. B. mit dem monoklonalen Antikörper Tocilizumab, dem virustatisch wirkenden Pyrazincarboxamid Favipiravir, dem Januskinase-Inhibitor Baricitinib oder anderen Immunmodulatoren und Entzündungshemmern. Noch im Rekrutierungsstatus befindet sich eine Studie (NCT04539262), mit der Gilead die Sicherheit und Pharmakokinetik einer inhalierbaren Form untersuchen möchte. Für die beiden Phase-IV-Studien werden ebenfalls

noch Probanden rekrutiert. Während NCT04738045 Remdesivir gegen die Kombination Lopinavir/Ritonavir plus Remdesivir untersucht, vergleicht NCT04779047 Remdesivir gegen Hydroxychloroquin jeweils in Kombination mit Tocilizumab, das als Anti-Interleukin-6-Antikörper den gefürchteten Zytokinsturm eindämmen soll. In einer randomisierten und kontrollierten Studie zeigt Tocilizumab übrigens keine signifikant höhere Heilungsrate, auch wenn eine tendenzielle Verbesserung der Hypoxie und Genesungsgeschwindigkeit festzustellen ist (Wang et al. 2021).

Vorläufige Ergebnisse der erstgenannten ACTT-Studie (NCT04280705) waren ausschlaggebend für die bedingte Zulassungsempfehlung. Erste Daten sind zu dieser Studie am 22. Mai im New England Journal of Medicine online veröffentlicht worden (¹Beigel et al. 2020). In dieser multizentrisch angelegten, doppelblinden, randomisierten, kontrollierten Phase-III-Studie sind 1062 hospitalisierte COVID-19-Patienten einbezogen worden. Unter Remdesivir waren die Patienten im Median nach 11 Tagen genesen, unter Placebo nach 15 Tagen. Remdesivir verkürzt demnach die Zeit bis zur Genesung um 31 %. Allerdings konnte dieser Effekt bei COVID-19-Patienten mit lediglich leichter bis mittelschwerer Erkrankung nicht festgestellt werden. Sowohl in der Remdesivir- als auch in der Placebo-Gruppe betrug die Zeit bis zur Genesung 5 Tage (¹Beigel et al. 2020). Schwer erkrankte COVID-19-Patienten (etwa 90 % der Studienpopulation) benötigten unter Remdesivir 12 Tage bis zur Genesung. In der Placebo-Gruppe waren es 18 Tage (¹Beigel et al. 2020). Dementsprechend hat das CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use), das Komitee der EMA für Humanarzneimittel, am 25.6.2020 Remdesivir (Veklury[®]) für eine „conditional marketing authorisation“ empfohlen (²European Medicines Agency 2020). Diese Art der Zulassung ist eine der regulatorischen Möglichkeiten der EMA, einem Arzneistoff für eine dringende, bislang nicht therapierbare Indikation in Notfallsituationen wie der jetzigen Pandemie eine frühzeitige erleichterte Zulassung unter Inanspruchnahme einer geringeren Datenlage als gewöhnlich auszusprechen. Dies gilt dann, wenn der Nutzen des Arzneimittels dessen Risiken trotz noch fehlender Daten überwiegt (²European Medicine Agency 2020). In einer Empfehlung vom 3. April 2020 rät die EMA bereits dazu, den Einsatz von Remdesivir auf beatmete COVID-19-Patienten, die noch kein Multiorganversagen zeigen, zu beschränken (³European Medicines Agency 2020). Der Schlussreport der ACTT-1-Studie berichtet von einer medianen Genesungszeit von 10 Tagen bei den mit Remdesivir behandelten COVID-19-Erkrankten, was deutlich kürzer ist als die im Median 15 Tage bei der Placebo-Gruppe (²Beigel et al. 2020). Die Kaplan-Meier-Abschätzung hinsichtlich der Mortalität betrage 6,7 % mit Remdesivir und 11,9 % mit Placebo am 15. Behandlungstag, 11,4 % mit Remdesivir und 15,2 % mit Placebo am 29. Tag der Therapie (²Beigel et al. 2020).

Nach der Notfallzulassung vom 1. Mai hat die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA am 22. Oktober 2020 für Veklury® als erstes Medikament eine reguläre Zulassung zur Behandlung von COVID-19 erteilt. Schon die Notfallzulassung erlaubte den Einsatz von Remdesivir bei Kindern und Erwachsenen mit einer vermuteten oder bestätigten schweren COVID-19-Erkrankung im Krankenhaus, sofern die periphere kapillare Sauerstoffsättigung (SpO₂) unter oder gleich 94 % lag (FDA Fact Sheet for Health Care Providers 2020). Die optimale Therapiedauer sei nicht bekannt. Vorgeschlagen wird eine Dosis an Tag 1 von 200 mg Remdesivir als intravenöse Infusion über 30–120 Minuten bei Kindern und Erwachsenen, die 40 kg oder mehr wiegen. Anschließend erfolgen für 4 oder 9 Tage einmal tägliche Erhaltungsdosen von 100 mg Remdesivir ebenfalls über bis zu zwei Stunden als intravenöse Infusion (FDA Fact Sheet for Health Care Providers 2020). Ob die Therapie 5 oder 10 Tage dauert, hängt davon ab, ob der Patient einer invasiven Beatmung bedarf (Therapiedauer 10 Tage) oder nicht (Therapiedauer 5 Tage). Zeigt ein Patient ohne invasive Beatmung nach 5 Tagen kein Ansprechen auf die Remdesivir-Therapie, kann diese bis zur maximalen Therapiedauer von 10 Tagen um weitere 5 Tage verlängert werden. Für pädiatrische Patienten mit einem Körpergewicht zwischen 3,5 und 40 kg beträgt die Anfangsdosis am ersten Tag 5 mg/kg KG intravenös, gefolgt von 2,5 mg/kg KG i.v. für 4 Tage, sofern keine invasive Beatmung erfolgt, oder aber für 9 Tage, sofern der Patient invasiv beatmet wird (FDA Fact Sheet for Health Care Providers 2020). Diese Therapieschemata aus den USA entsprechen denen der EU (³European Medicines Agency 2020).

Allerdings sind noch diverse Fragen offen, von der optimalen Dosierung über den Einsatz bei renaler oder hepatischer Insuffizienz bis zur möglichen QT-Verlängerung und dem Einsatz bei Kindern und Schwangeren. Die Anwendung bei Kindern wird in der Studie NCT04431453 untersucht. Sponsor der sogenannten CARAVAN-Studie ist der Hersteller Gilead Sciences, der auch die Ergebnisse zur Verfügung stellte. Die Studie dient der Evaluation der Sicherheit, Verträglichkeit, der Untersuchung der Pharmakokinetik und der Wirksamkeit des Remdesivirs bei Kindern von Geburt an bis zum Alter von 18 Jahren mit COVID-19-Erkrankung. Ergebnisse stehen noch aus. Zahlreiche Studien mit Kindern sind bereits durchgeführt worden (Chao et al. 2020). Epidemiologische Studien haben konsistent gezeigt, dass Kinder ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer schweren Symptomatik haben als Erwachsene (Dong et al. 2020, Qiu et al. 2020). Allerdings zeigte eine kleine Studie von Chao und Mitarbeitern mit 67 COVID-19-positiv getesteten Kindern, dass auch hier schwere Verläufe möglich sind. Die Patienten zeigten höhere Labormarker für eine Inflammation, beispielsweise einen erhöhten CRP-Wert (C-reaktives Protein) oder einen erhöhten Procalcitonin-Wert. Diese Studie weist allerdings einige Limitationen auf

(keine multizentrische Studie, geringe Patientenzahl, alle Patienten aus derselben Region). Daher sind weitere multizentrische Studien mit mehr Patienten notwendig (Chao et al. 2020).

Molekulare Struktur

Remdesivir ist ein Analogon des Adenosins, dessen chemischer Aufbau in Abbildung [34](#) wiedergegeben ist. Adenosin ist ein Nukleosid mit dem Zucker Ribose, einer Pentose charakteristisch für RNS, d. h., dieses Adenosin wird in eine RNS eingebaut. Für die DNS wäre die Pentose 2'-Desoxyribose charakteristisch. Wird die Ribose an Position 5' mit einer Phosphat-Gruppe verestert, erhält man ein Nukleotid. Adenosin besteht aus dem Zuckeranteil und der aromatischen Base Adenin, die aufgrund einer Amidin-Struktur ausgehend von der exozyklischen Amino-Gruppe im Pyrazin-Ring an Position 1 protoniert werden kann ($pK_s = 4,2$). Die Base Adenin ist zurückzuführen auf das Purin-Grundgerüst, einem Bizyklus, der in zwei tautomeren Formen vorliegen kann: dem 9H- sowie dem 7H-Tautomer. Das 9H-Tautomer ist wesentlich stabiler, weshalb auch Adenosin als 9H-Tautomer vorliegt. Purin besteht aus den zwei aromatischen Heterozyklen, dem fünfgliedrigen Imidazol und dem sechsgliedrigen Pyrimidin. Durch die Verknüpfung ergibt sich für Purin der Name Imidazo[4,5-d]pyrimidin.

Die Unterschiede zwischen Remdesivir und Adenosin sind in Abbildung [35](#) dargestellt. Statt Imidazol enthält Remdesivir im fünfgliedrigen Ring einen Stickstoff, liegt dort also formal als Pyrrol vor. Der sechsgliedrige Ring wird zum 1,2,4-Triazin mit der exozyklischen 1-Amino-Gruppe. Die Ribose ist nicht N-glykosidisch, sondern über ein Kohlenstoff-Atom C-glykosidisch an die bizyklische Base gebunden. Die Nummerierung beim Remdesivir ist entsprechend geändert. Remdesivir ist ein 1'-Cyano-4-aza-7,9-didesaza-adenosin-C-Analogon. Zusätzlich enthält C1' (bzw. C5') der Ribose eine Cyano-Gruppe. Das ehemalige C5' des Zuckers ist über eine Phosphorsäureester-Bindung mit einem Phosphormonoamidat verbunden. Bei diesem ist eine OH-Gruppe (die nicht veresterte) des Phosphat-Restes durch eine NHR-Gruppe ersetzt (Abbildung [36](#)). Das N-Atom des Phosphoramidats enthält einen längeren Rest, der u. a. als funktionelle Gruppe eine Carbonsäureester-Struktur und ein chirales C-Atom besitzt. Remdesivir ist das reine (S)-Enantiomer (Abbildung [35](#)) (Gordon et al. 2020).

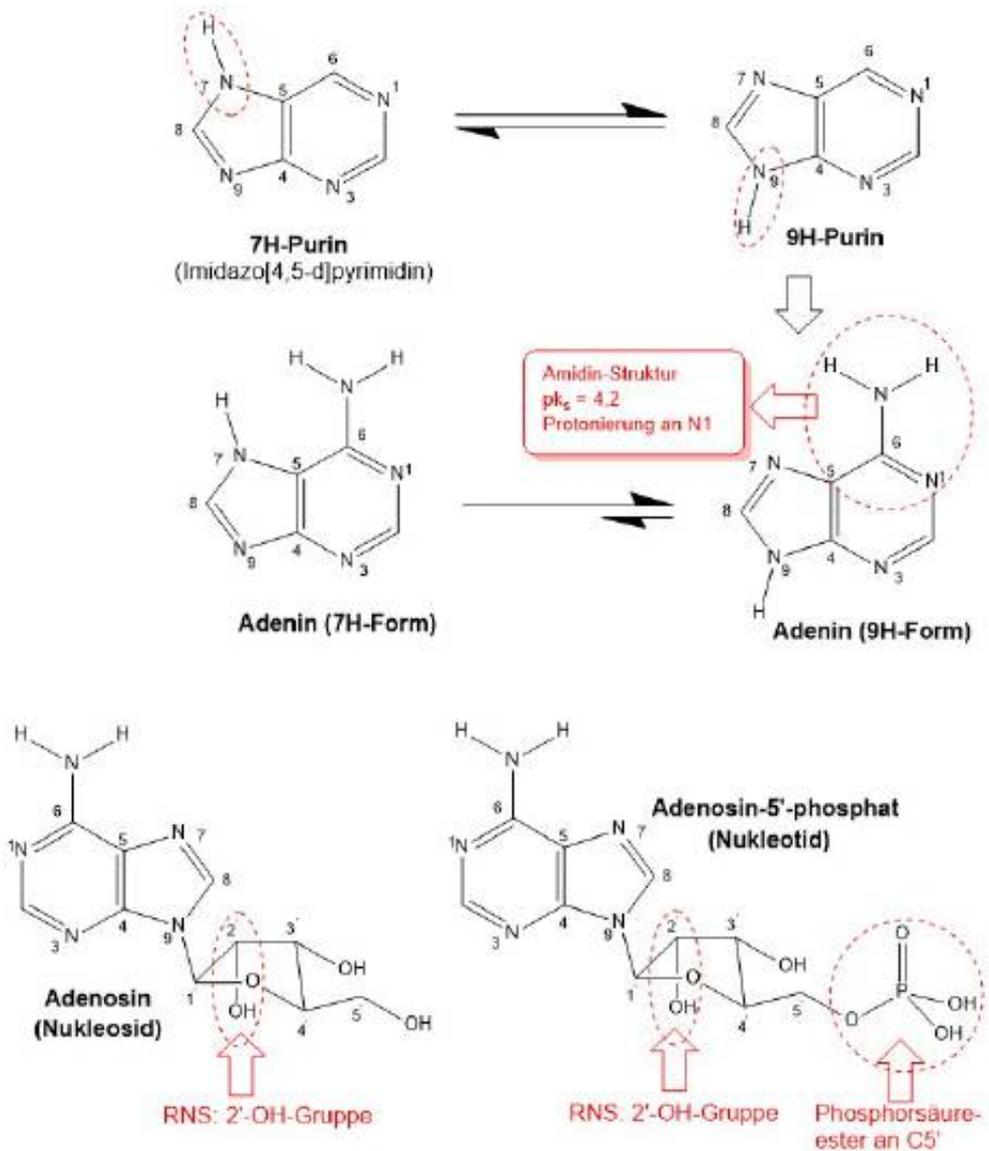


Abbildung 34: Chemisch-struktureller Aufbau des Adenosins.

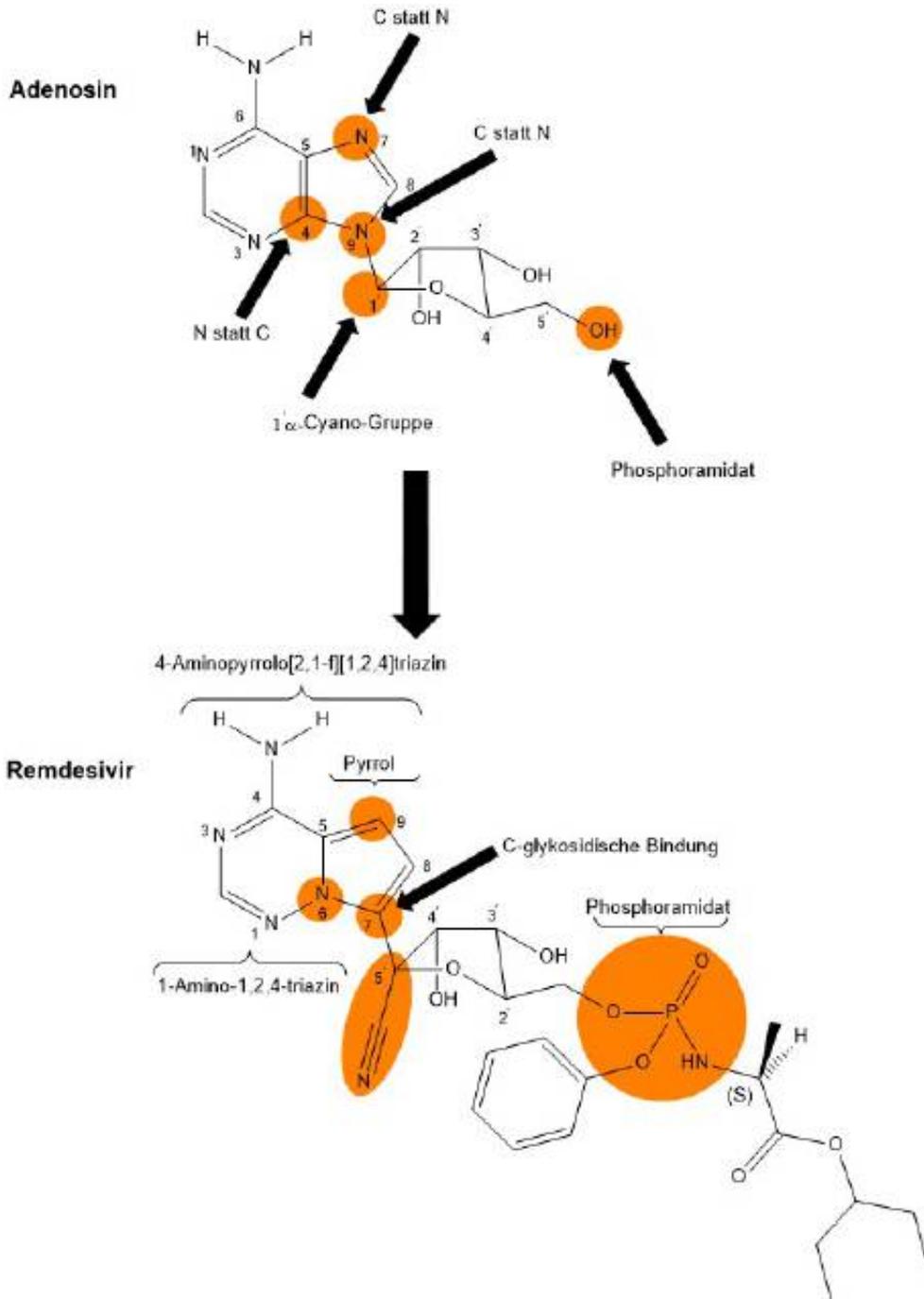


Abbildung 35: Strukturvergleich zwischen Adenosin und Remdesivir.

Orangefarben sind die strukturellen Veränderungen, die nötig sind, um vom Adenosin zum Remdesivir zu gelangen.

Die ersten strukturellen Baupläne für Remdesivir gab es bereits vor dem letzten Ebola-Outbreak, nachdem eine große Gruppe Wissenschaftler unterschiedlicher Institute zusammen mit Gilead Sciences eine Initiative zur Erkundung des Potenzials verschiedener Nukleosid-Analoga zur Therapie ausgewählter Viruserkrankungen ins Leben gerufen hatte (Siegel et al. 2017). Dafür wurde eine Substanzbibliothek von ca. 1000 Nukleosid-Analoga und Nukleosid-Phosphonat-Analoga zusammengetragen, die in mehr als zwei Jahrzehnten in zahlreichen Forschungsprogrammen entwickelt worden waren. In Zusammenarbeit mit dem CDC (Center for Disease Control and Prevention) und dem US-amerikanischen Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAAMRIID) wurden ausgewählte Verbindungen dieser Bibliothek gegen das Ebola-Virus gescreent. Hierbei fokussierte man den Blick vor allem auf Ribose-Derivate und -Analoga, die in der Lage sein sollten, RNS-Viren zu hemmen. Damit würde man nicht nur das Ebola-Virus, sondern eine ganze Reihe aufkommender viraler Infektionen einbeziehen, u. a. auch Viren mit einer vorwiegend respiratorischen Pathogenität und Symptomatik, die zur Familie der Coronaviridae zählen, wie z. B. SARS-CoV-1/2 und MERS-CoV, aber auch von Mosquitos übertragene Viren der Familie der Flaviviridae und deren Erkrankungen beim Menschen, wie z. B. das Dengue-Fieber-Virus (DENV), das Gelbfieber-Virus (VFV, „yellow fever virus“), das Zika-Fieber-Virus (ZIKV) und das Chikungunya-Fieber-Virus (CHIKV) (Powell 2018).

Die Bibliothek-Substanzen waren mehrheitlich Nukleoside, die einen zyklischen, modifizierten Ribose- oder zumindest Ribose-ähnlichen Zucker enthielten. Ebenso handelte es sich bei den Substanzen überwiegend um N-Glykoside. Weniger als 10 % der Substanzen aus der Bibliothek waren Nukleosid-phosphonate oder azyklische Analoga, was wahrscheinlich auf den bis dahin geringen Erfolg dieser Art von RNS-Virus-Inhibitoren zurückzuführen war. Ein wichtiger Faktor bei der Zusammenstellung der Substanzbibliothek war zudem, dass annähernd 50 % der Bibliothek-Substanzen Monophosphat- oder Ester-Prodrugs waren. Das lag darin begründet, dass Analoga erfasst werden sollten, die in zellulären Tests versagt oder gefehlt hätten – entweder wegen ihrer geringen Permeabilität oder aufgrund eines unzureichenden Metabolismus in dem Zelltyp, den der jeweilige antivirale Assay nutzte (Siegel et al. 2017).

Nukleosid-Analoga bestehend aus Base und Zucker benötigen eine Aktivierung, um als falsche Substrate der RNS-Polymerasen zu fungieren. Diese Aktivierung erfolgt mithilfe intrazellulärer Nukleosid-/Nukleotid-Kinasen unter Bildung der entsprechenden Nukleosid-triphosphat-Metaboliten. Als aktivierte Triphosphate können sie kompetitiv mit natürlichen, endogenen Nukleotiden um den Einbau in die sich replizierende RNS streiten (Warren et al. 2016). Dabei ist zumeist der erste

Phosphorylierungsschritt, der zum Nucleosid-monophosphat führt, der geschwindigkeitsbestimmende. Daher ist die Entwicklung von Prodrugs mit Monophosphat, Phosphonat-, Monophosphoramidat- oder Phosphonamidat-Partialstruktur innerhalb der Nucleosid-Analoga besonders intensiv untersucht worden, um die initiale Phosphorylierung zu umgehen (Abbildung 36) (Mehellou et al. 2009).

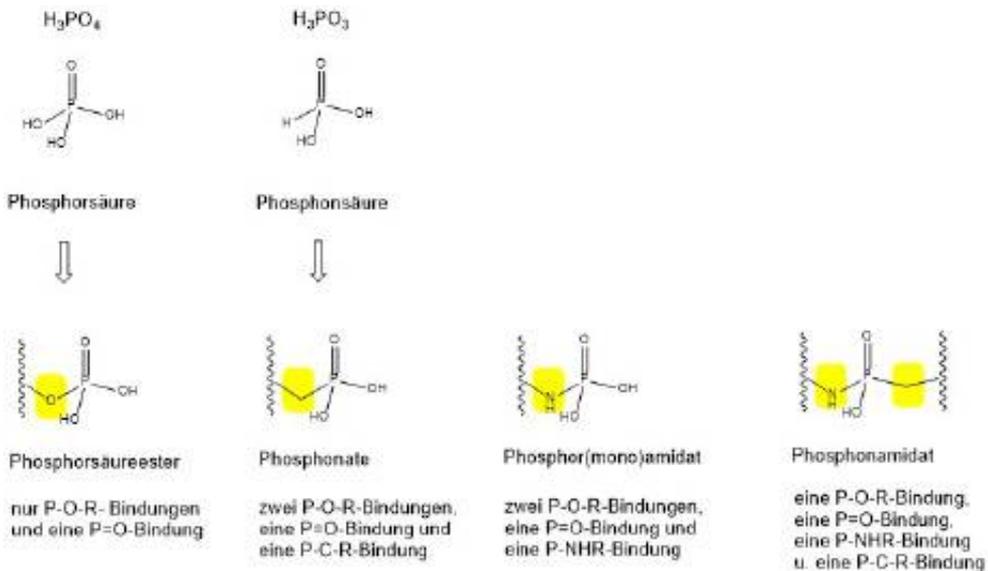


Abbildung 36: Unterschiedliche Ester-Typen des Phosphors.

Natürliche Phosphor-Verbindungen, die in die Nucleinsäuren eingebaut werden, stammen von der Phosphorsäure (H_3PO_4) ab und bilden in Nucleinsäuren Phosphorsäurediester. Neuere Nucleotid-Analoga enthalten häufig anstelle der herkömmlichen Phosphorsäure an C5' der Ribose bzw. 2'-Desoxyribose andere Phosphor-Verbindungen. Phosphonate, die sich von der Phosphonsäure (H_3PO_3) ableiten, enthalten statt einer P-O-C-Bindung das C-Atom direkt am Phosphor gebunden (P-C-Bindung) und sind damit wesentlich schwerer zu hydrolysieren. Daneben enthalten Nucleotid-Analoga aber auch Phosphoramidat-Partialstrukturen, bei denen eine P-O-C-Bindung durch eine P-NH-C-Bindung ersetzt ist. Nucleotid-Analoga, die sowohl eine Phosphonat- als auch eine Phosphoramidat-Struktur an einem Phosphor-Atom enthalten, heißen Phosphonamidate. Der HCV-NS5B-Polymerase-Inhibitor Sofosbuvir zur Therapie der Hepatitis-C-Virus-Infektion ist ein Beispiel (Sofia et al. 2010).

Sofosbuvir und weitere Nukleotid-Analoga

Das peroral in Form von Filmtabletten applizierbare Sofosbuvir (Sovaldi®) (Strukturformel Abbildung 37) gehört zu den DAAs und hat zusammen mit anderen fast gleichzeitig auf den Markt gekommenen Anti-Hepatitis-C-Therapeutika die Therapie der HCV-Infektion revolutioniert (Asche 2018). Im Unterschied zum natürlichen Substrat Uridin-5'-triphosphat besitzt Sofosbuvir an Position 2' des Zuckers keine OH-Gruppe, sondern eine β -ständige Methyl-Gruppe sowie einen α -ständigen Fluor-Substituenten. Sofosbuvir enthält anstelle der obligatorischen Phosphorsäureester-Struktur eine Phosphoramidat-Partialstruktur, bei dem ein Sauerstoff-Atom der Phosphat-Gruppe durch eine NH-Gruppe zum Phosphoramidat ersetzt ist.

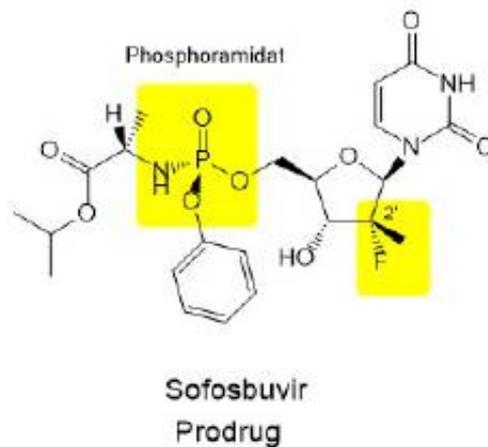


Abbildung 37: Strukturformel des Hepatitis-C-Virus-NS5B-Inhibitors Sofosbuvir.

Sofosbuvir ist gegen alle sechs Genotypen des HC-Virus wirksam. Es wird nicht als Monotherapie, sondern ausschließlich in Kombination mit anderen Arzneimitteln eingesetzt und ist mittlerweile fester Bestandteil fixer Kombinationspräparate. Im Fertigarzneimittel Harvoni® ist Sofosbuvir beispielsweise mit dem NS5A-Inhibitor Ledipasvir kombiniert. Epclusa® enthält zusätzlich den NS5A-Inhibitor Velpatasvir. Eine fixe Dreifachkombination ist das Fertigarzneimittel Vosevi®, das zusätzlich zu Sofosbuvir und Velpatasvir den NS3/4A-Protease-Hemmer Voxilaprevir enthält.

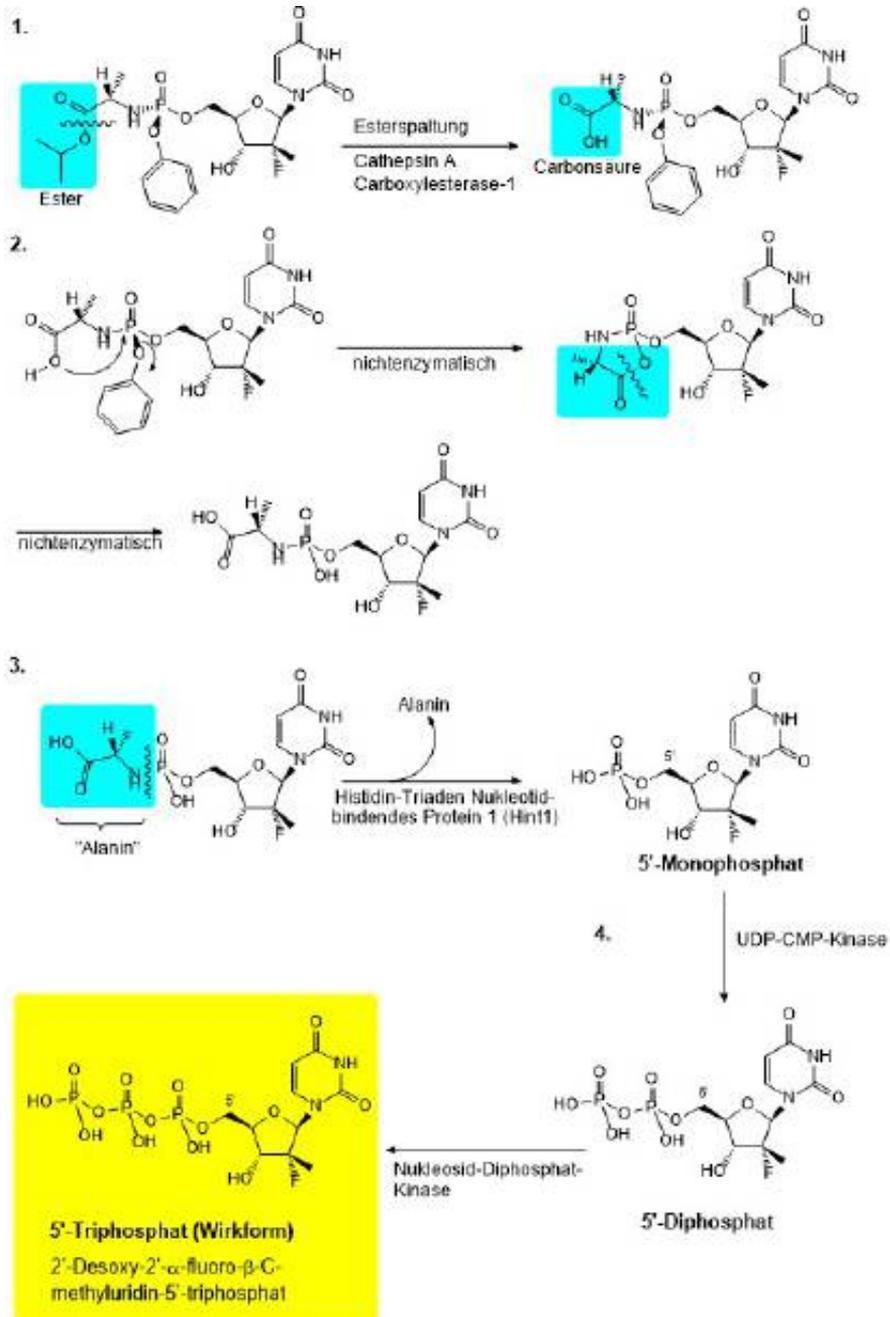


Abbildung 38: Bioaktivierung von Sofosbuvir zu seinem aktiven Metaboliten, dem 2'-Desoxy-2'-α-fluor-β-C-methyluridin-5'-triphosphat (nach Asche 2018).

Als nukleosidischer Inhibitor imitiert Sofosbuvir das natürliche Substrat der RNS-abhängigen RNS-Polymerase NS5B des Hepatitis-C-Virus und bindet im aktiven Zentrum des Enzyms. Der Einbau des falschen Substrats in die RNS-abhängige RNS-Polymerase führt zu einem Stopp der RNS-Synthese. Das Prodrug mit einer Phosphoramidat-Partialstruktur wird intrazellulär zum aktiven Metaboliten 2'-Desoxy-2'- α -fluor- β -C-methyluridin-5'-triphosphat phosphoryliert. Die in Abbildung 38 dargestellte Bioaktivierung von Sofosbuvir verläuft in vier Schritten:

1. Der erste Schritt ist die Spaltung des Carboxylesters in der NHR-Seitenkette des Phosphoramidats durch Cathepsin A oder Carboxylesterase-1.
2. Die zweite Reaktion ist nichtenzymatischer Natur. Sobald der Ester hydrolysiert ist und die freie Carboxyl-Gruppe vorliegt, greift die Hydroxyl-Gruppe der Carbonsäure nukleophil unter Bildung eines zyklischen Intermediats die Phosphat-Gruppe an.
3. Der dritte Schritt besteht zunächst aus der enzymatischen Abspaltung des Alanins unter Bildung des 5'-Monophosphat-Intermediats.
4. Unter enzymatischer Beteiligung von UMP-CMP-Kinase und Nukleosid-Diphosphat-Kinase wird dieses im vierten Schritt zum aktiven Metaboliten, dem Triphosphat, biotransformiert.

Die Phosphoramidate bzw. die Nukleosid-phosphoramidat-Analoga sind Bioisostere der Nukleosid-monophosphat-Analoga. Hier ist lediglich der Austausch einer -OR-Gruppe am zentralen Phosphor-Atom durch eine -NHR-Gruppe erfolgt. Allerdings benötigen sowohl die Monophosphate als auch deren bioisostere Phosphormonoamidate einer ersten Bioaktivierung bzw. einer Protektion, indem der negativ geladene Phosphat- bzw. Phosphormonoamidat-Rest maskiert oder abgespalten wird und somit die Permeation in die Zelle erleichtert wird. Ein neueres Beispiel dieses Prodrug-Typs ist das im Rahmen einer antiretroviralen Therapie (ART) der HIV-Infektion zugelassene Tenofoviralafenamid (Abbildung 39) (Lee et al. 2005). Tenofovir hemmt die HIV-Reverse-Transkriptase und gehört damit zur Klasse der Nukleotid-Analoga Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NtRTI). Im Unterschied zu den Nukleosid-Analoga RT-Inhibitoren (NRTI) tragen die NtRTI eine Phosphor-Gruppe und haben beim Eintritt in die Zelle bereits den ersten von drei Aktivierungsschritten zum Triphosphat hinter sich.

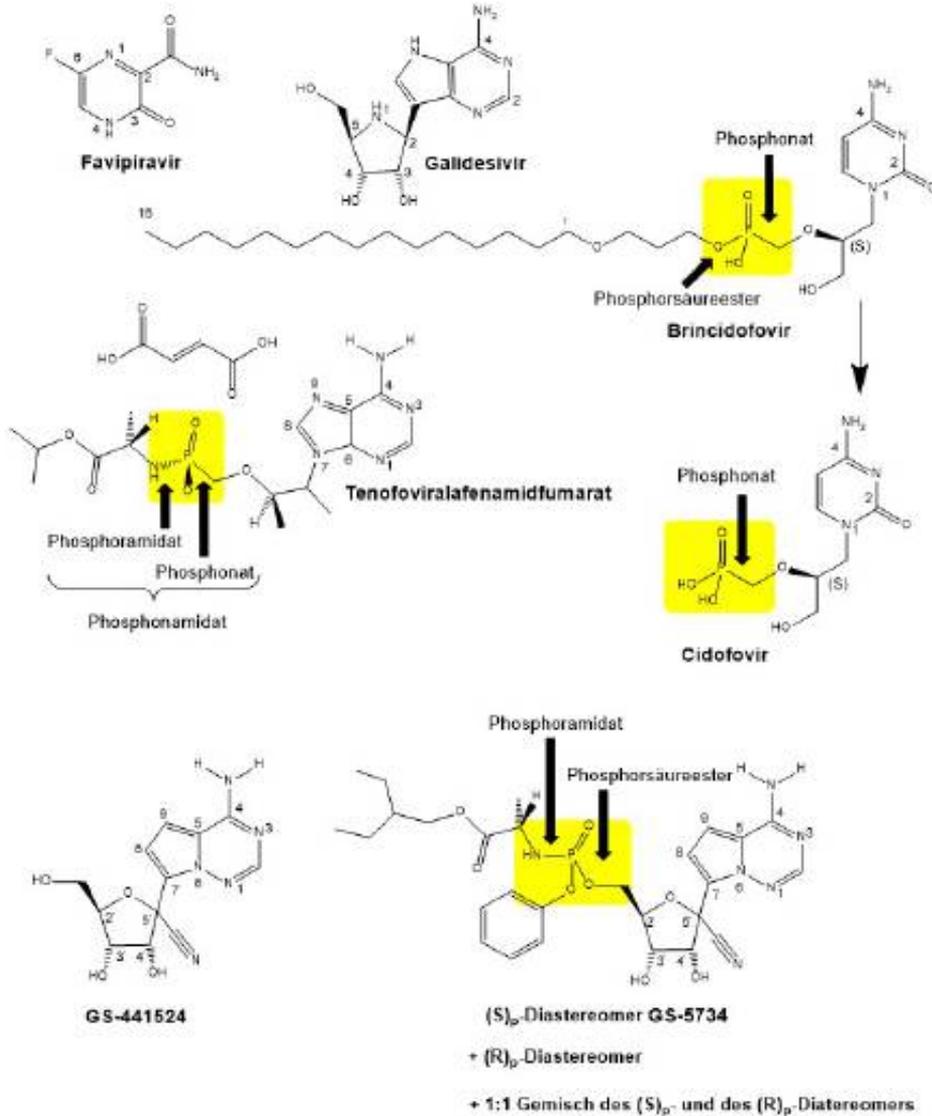


Abbildung 39: Strukturformeln antiviral wirksamer und bereits für eine andere Indikation zugelassene Substanzen mit Nucleosid-/Nucleotid-Struktur.

Sofosbuvir kann die Replikation von Viren aus diversen Familien hemmen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Sofosbuvir die RNS-Replikation von Flaviviren hemmt, einschließlich des Zika-Virus, des Dengue-Fieber-Virus und des Gelbfieber-Virus (Onorati et al. 2016, Xu et al. 2017, de Freitas et al. 2019). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass auch das Chikungunya-Virus (CHIKV), ein Mitglied der Togaviridae-Familie, ein Target von Sofosbuvir darstellt. Im Vergleich

zu Ribavirin hemmt Sofosbuvir CHIKV dreimal selektiver bei gleichzeitig um 25 % reduzierter Zytotoxizität gegenüber humanen Hepatom-Zellen (Ferreira et al. 2019). CHIKV hat eine einzelsträngige RNS mit Plusstrang-Orientierung. Wie bei anderen Plusstrang-RNS-Viren, wird die RNS-abhängige RNS-Polymerase mit ihren hochkonservierten Motiven vom *NSP4*-Gen codiert (Cheng et al. 2016, Sayad et al. 2020). In diesem Zusammenhang müssen die Coronaviren genannt werden, die ebenfalls eine Einzelstrang-RNS mit Plus-Orientierung und konservierte Motive innerhalb ihrer Polymerasen aufweisenden. Die RNS-abhängige RNS-Polymerase von SARS-CoV-2 wird höchstwahrscheinlich durch Sofosbuvir gehemmt. Somit liegt es nicht fern, dass auch eine SARS-CoV-2-Infektion empfindlich gegenüber Sofosbuvir ist und durch Sofosbuvir bekämpft werden kann (Sayad et al. 2020). Die antivirale Aktivität des Sofosbuvirs gegen SARS-CoV-2 hängt von der Aufnahme in die Zelle und der dann folgenden Metabolisierung bzw. Aktivierung ab (Mumtaz et al. 2017). Sie korreliert mit der intrazellulären Konzentration des aktiven Triphosphat-Metaboliten, in diesem Fall Sofosbuvir-triphosphat.

Wie in Abbildung 38 dargestellt, wird das Triphosphat durch Nukleosid-Diphosphat-Kinasen (NDKs) gebildet. NDKs werden durch das Gen *NME* (auch *NM23*) codiert und bilden eine Familie multifunktionaler Enzyme, die von Bakterien bis zum Menschen evolutionär hochkonserviert sind. Sie kommen ubiquitär in allen Zellen vor. Durch die Anpassung ihrer enzymatischen Aktivitäten halten NDKs ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Nukleosid-triphosphaten aufrecht. Sie stellen somit die Quelle für RNS- und DNS-Vorstufen dar (mit Ausnahme von ATP). Sie sorgen für ausreichend CTP für die Lipid-Synthese, für ausreichend UTP für die Polysaccharid-Synthese und für ausreichend GTP für die Protein-Elongation, die Signaltransduktion sowie die Mikrotubuli-Polymerisation (Boissan et al. 2018). Da Sofosbuvir im Vergleich zu anderen Virustatika eine sichere und effektive antivirale Option darstellt, wird derzeit Sofosbuvir 400 mg (in Kombination mit Velpatasvir 100 mg) als Add-on-Therapie zusätzlich zum Standard mit supportiver Therapie und Sauerstoff-Supplementierung bei COVID-19 in einer klinischen Studie getestet (<https://www.irct.ir/trial/46790>) (Sayad et al. 2020).

Tenofoviralfenamidfumarat ist ein im Zucker-Part azyklischer Diester, der als kompetitiver NtRTI bzw. als Nukleosid-Phosphonsäureamidat-Analogon des natürlichen Adenosinmonophosphats (AMP) fungiert. Für die Konversion zum azyklischen Nukleosid-Analogon Tenofovir sowie die nachfolgenden zellulären Phosphorylierungen zum Tenofovir-diphosphat ist eine initiale Diester-Hydrolyse nötig. Die bioaktive Wirkform Tenofovir-diphosphat hemmt die Aktivität der HIV-Reversen-Transkriptase, indem es mit dem natürlichen Substrat Desoxyadenosin-5'-triphosphat konkurriert, in die DNS eingebaut wird und eine DNS-Kettentermination

herbeiführt (Lee et al. 2005, Arzneistoffprofile 2011). Sowohl beim Sofosbuvir als auch beim Tenofovir werden durch die Prodrugs hohe Konzentrationen an Diphosphonaten in die Zielzelle befördert, was zu signifikanten Aktivitätssteigerungen in antiviralen Assays gegenüber ihren Nucleosiden führt (Siegel et al. 2017).

Polymerase-Spezifität und Bioaktivierung

In dem originären Screening der Substanzbibliothek gegen eine Reihe von RNS-Viren über viele Viren-Familien hinweg konnten bereits Leitstrukturen ausgemacht werden (Siegel et al. 2017). Kurz nach dem Ebola-Outbreak wurden diese teilweise einer Ebola-Testung zugeführt. Daraus ergaben sich das Nucleosid und 1,2,3-Triazen-Derivat GS-441524 zum einen und die am Phosphor chiralen Phosphoramidat-Prodrugs des Triazen-Nucleosids in einem 1:1-Gemisch der (*S*)_p- und (*R*)_p-Diastereomere zum anderen (Mackman et al. 2011). Insbesondere das Phosphoramidat-Gemisch und dessen reine (*S*)_p- und (*R*)_p-Diastereomere zeigten sich als sehr wirksam in HeLa-Zellen und HMVEC-Zellen. Ermutigt durch diese Daten wurden die Anti-Ebola-Aktivitäten zahlreicher Nucleosid-Analoga und ihrer Prodrugs mit ähnlichem strukturellen Aufbau getestet (Siegel et al. 2017).

Die 1' β -Modifikation in Form des 1' β -Cyano-Restes an der Ribose-Einheit ermöglicht eine Selektivität gegenüber viralen Polymerasen unter Vermeidung der zytotoxischen Eigenschaften bezüglich der Hemmung der Wirts-Polymerase (Abbildung 40). Das Nucleosid, dem gegenüber GS-441524 lediglich die 1' β -Cyano-Gruppe fehlt, zeigt eine deutliche zelluläre Toxizität CC_{50} in den getesteten Zelllinien bis in den submikromolaren Bereich (0,01–0,15 μ M) (Patil et al. 1994), wohingegen das entsprechende 1' β -Cyano-Derivat keine signifikanten Toxizitäten ($CC_{50} > 200 \mu$ M in HEP-2-Zellen; $> 88 \mu$ M in Hub-7-Zellen; 120 μ M in MT4-Zellen) zeigt (Siegel et al. 2017). Das Phosphoramidat-Diastereomergemisch, das einzelne reine *S*_p-Diastereomer sowie das entsprechende 1' β -Cyano-Nucleosid zeigen starke Aktivitäten und ein äußerst breites Wirkspektrum nicht nur gegen das Ebola-Virus, sondern auch gegen andere Viren aus weiteren Familien – teilweise sogar mit größerer Wirksamkeit als gegen das Ebola-Virus ($EC_{50} < 120$ nM). Die 1' β -Position an der Ribose ist hinsichtlich der Selektivität viraler Polymerasen gegenüber humanen Polymerasen von entscheidender Bedeutung. Nur die Cyano-Gruppe verleiht dem Molekül ausreichend Aktivität bei marginaler Toxizität. Selbst kleinste Änderungen wie der Austausch der Cyano-Gruppe gegen einen Ethinyl-Substituenten haben hier einen großen Einfluss (Abbildung 40 unten). Das gilt sowohl für die Nucleoside als auch für deren Ethylbutylalanin-Prodrugs (Siegel et al. 2017).

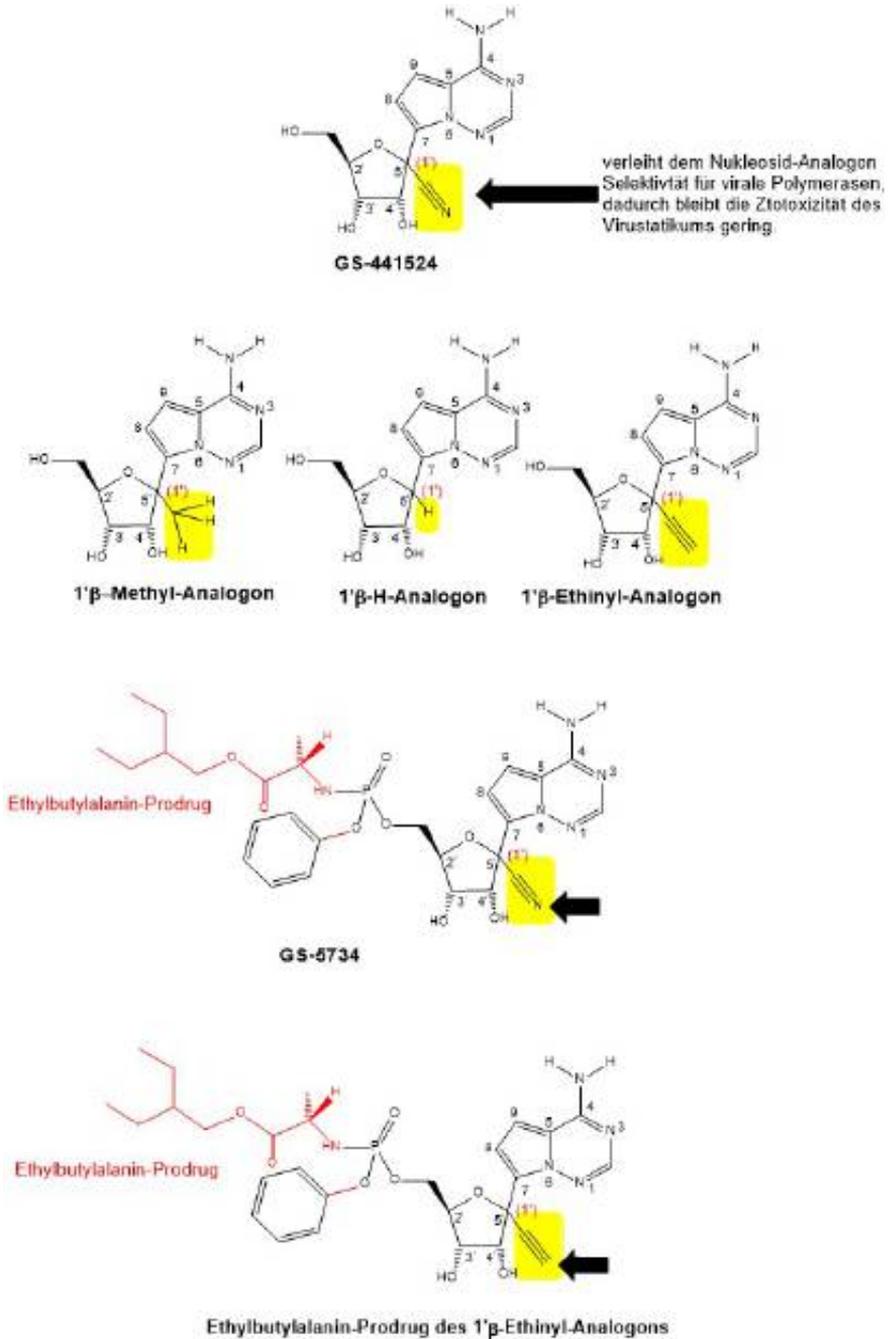


Abbildung 40: Die 1'β-Position am Ribose-Zucker.

Das breite Wirkspektrum zeigt sich ebenfalls an den Aktivitäten gegen andere aufkommende RNS-Viren, wie z. B. das MERS-CoV und das Junin-Virus und zu einem geringeren Ausmaß gegen das Lassa-Virus (Warren et al. 2016). Vergleicht man die entsprechenden 1' β -Methyl-, 1' β -Ethinyl- oder 1' β -H-Analoga mit dem 1' β -Cyano-Nukleosid GS-441524, zeigt sich, dass selbst kleinste Veränderungen in Größe und Polarität wie der Austausch der β -ständigen Cyano-Gruppe gegen eine β -CH₃-Gruppe oder eine β -Ethinyl-Gruppe große Auswirkungen auf das Gesamtprofil haben können (Cho et al. 2008). Das 1' β -Methyl-Analogon zeigt weniger Aktivität gegen das Ebola-Virus, dafür aber eine höhere Zytotoxizität (Cho et al. 2012). Auch das entsprechende 1' β -Ethinyl-Analogon und dessen Etylbutylalanin-Prodrug sind weniger aktiv als die entsprechenden 1' β -Cyano-Analoga (Siegel et al. 2017). In Tabelle 12 sind für die bioaktive Form des Remdesivirs GS-441524-triphosphat die Konzentrationen angegeben, die zu einer 50-prozentigen Inhibition (IC₅₀) führen. Auch die darin aufgeführten Werte belegen die geringe Zytotoxizität der bioaktiven Wirkform des Remdesivirs: Keine Polymerase des Wirtes hat einen IC₅₀-Wert unter 200 μ M (Siegel et al. 2017).

Tabelle 12: 50-prozentige inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) des GS-441524-triphosphats für virale RNS-Polymerasen und humane Polymerasen.

Enzym	IC ₅₀
RSV-RNS-abhängige-RNS-Polymerase	1,1 μ M
HCV-RNS-abhängige-RNS-Polymerase	5 μ M
POLRMT (mitochondriale Polymerase)	> 200 μ M
DNS-Polymerase α	> 200 μ M
DNS-Polymerase β	> 200 μ M
DNS-Polymerase γ	> 200 μ M

Grau unterlegt: Wirts-Polymerasen; Abkürzungen: RSV: Respiratory-Syncytial-Virus; HCV: Hepatitis-C-Virus; POLRMT: DNS-abhängige mitochondriale humane RNS-Polymerase.

Aus der Fülle an Substanzen wurde GS-5734 für eine weitere Entwicklung ausgewählt. Remdesivir wirkt frühzeitig während des Infektionsprozesses und verringert dosisabhängig virale RNS-Level (McKee et al. 2020), was zumindest *in vitro* mit einer Verringerung der Viruslast einhergeht (Agostini et al. 2018). Es beeinträchtigt die Aktivität der viralen Polymerase, was die Umgehung der viralen „Proofreading“-Exoribonuklease fördert und letztlich zur Hemmung der viralen RNS-Synthese führt (Agostini et al. 2018). Dieser Wirkmechanismus des Remdesivirs ist *in vitro* bewiesen für SARS-CoV-1 (Agostini et al. 2018), das Ebola-Virus (Tchesnokov et al. 2019) und MERS-CoV (Gordon et al. 2020). Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass Remdesivir in Zellkulturexperimenten an etablierten Vero-E6-Zellen, die aus

der Niere der Grünen Meerkatze stammen und mit SARS-CoV-2 infiziert waren, die SARS-CoV-2-Infektion hemmt (³Wang et al. 2020). *In vivo* wird an nichthumanen Primaten-Modellen ein EC_{50} -Wert von $1,76 \mu M$ erzielt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Remdesivir effizient eine SARS-CoV-Infektion bei humanen Leberkrebs-Zellen (Huh-7-Zellen) hemmt (³Wang et al. 2020). Die prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit des Remdesivirs konnte in einem nichthumanen Primaten-Modell (Rhesus-Affen) für eine MERS-CoV-Infektion demonstriert werden. Die prophylaktische Remdesivir-Gabe 24 Stunden vor einer MERS-CoV-Inokulation verhinderte komplett eine Virus-induzierte Erkrankung, hemmte die Virus-Replikation innerhalb des Respirationsgewebes sowie das Auftreten von Lungenläsionen (de Wit et al. 2020). Eine Gabe des Remdesivirs an Rhesus-Affen 12 Stunden nach einer MERS-CoV-Inokulation zeigte ebenfalls einen signifikanten klinischen Nutzen mit einer Verringerung der klinischen Symptome, einer Reduktion der Virus-Replikation im Lungengewebe und einem in Häufigkeit und Schwere signifikant vermindertem Auftreten von Lungenläsionen (de Wit et al. 2020).

Aus einer randomisierten, kontrollierten Studie zum Ebola-Virus und potenziellen Anti-Ebola-Therapeutika existieren humane Sicherheitsdaten für Remdesivir: In einer Subpopulation von 175 Patienten, die mit Remdesivir behandelt wurden (200 mg i.v. an Tag 1, 100 mg i.v. ab Tag 2 bis Tag 9 oder 13), entwickelten 9 Patienten schwere Nebenwirkungen (Mulangu et al. 2019), was darauf hindeutet, dass Remdesivir ein relativ sicheres Therapeutikum ist. Ein klinischer Einsatz als „Compassionate Use“ bei 53 Patienten unter Beatmung oder mit O_2 -Substitution (SpO_2 kleiner oder gleich 94 %) zeigte, dass innerhalb des vorgeschlagenen Dosierungsschemas bei 36 von ihnen – das entspricht 68 % – eine Verbesserung der Lungenfunktion eintrat (Grein et al. 2020). Allerdings lag die Mortalität bei beatmeten Patienten bei 18 %, während sie bei nichtbeatmeten Patienten 5 % betrug (Grein et al. 2020). Eventuell könnte man hieraus schlussfolgern, dass Remdesivir eine Option für Patienten sein kann, die nicht invasiv beatmet werden (McKee et al. 2020).

Remdesivir ist ein 1'-cyanosubstituiertes Phosphormonoamidat-Prodrug eines Adenin-Nukleotid-Analogons (GS-441524). Durch seinen Wirkmechanismus stellt es ein direkt wirkendes Virustatikum dar (direct-acting antiviral, DAA). Als Triphosphat ähnelt es sehr dem eigentlichen Substrat zahlreicher viraler RNS-abhängiger RNS-Polymerasen: ATP (Adenosintriphosphat) (Siegel et al. 2017, Agostini et al. 2018). Aufgrund dieser Ähnlichkeit wird es selbst nach Prodrug-Aktivierung und weitergehender Aktivierung durch wirtseigene Kinasen in Form des Triphosphats als falsches Substrat der RNS-Polymerasen genutzt (McKee et al. 2020).

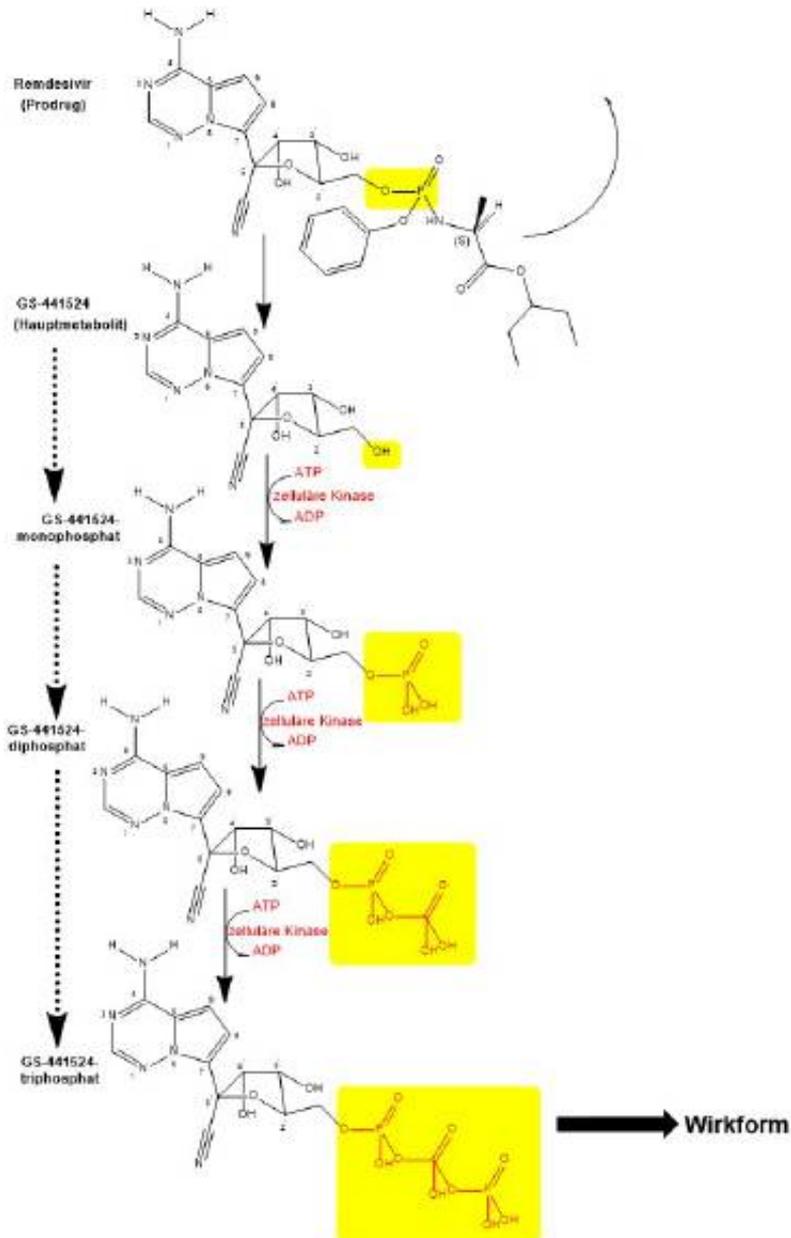


Abbildung 41: Bioaktivierung des Prodrugs Remdesivir.

Der Hauptmetabolisierungsschritt beim Remdesivir ist die Abspaltung des Phosphoramidats unter Bildung des Nukleosid-Analogons GS-441524 (Abbildung 41). Das Prodrug Remdesivir wird durch Esterasen an seiner Phosphoramidat-Partialstruktur hydrolytisch abgespalten, was das Adenosin-Analogen GS-441524 ergibt. Dieses enthält die Adenin-analoge bizyklische Base sowie eine 1' β -Cyanoribose, C-glykosidisch gebunden an der Base. Zelluläre Kinasen phosphorylieren GS-441524 unter ATP-Verbrauch dreimal nacheinander zur eigentlichen Wirkform GS-441524-triphosphat (Abbildung 41).

GS-441524-triphosphat wetteifert mit Adenosintriphosphat kompetitiv um den Einbau in den RNS-abhängigen RNS-Polymerase-Komplex (Tchesnokov et al. 2019). Bei SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 ist der Komplex (bei Exprimierung aus Insekten) aus den Nichtstrukturproteinen NSP8 und NSP12 zusammengesetzt und ergibt eine funktionell einwandfrei arbeitende RNS-Polymerase. Kinetische Untersuchungen beim Ebola-Virus lassen den Schluss zu, dass der Einbau des physiologischen ATP im Vergleich zu seinem Analogon GS-441524-triphosphat effizienter erfolgt (Tchesnokov et al. 2019). Im Gegensatz zu den klassischen Polymerase-Inhibitoren, die zum sofortigen Kettenabbruch führen, kann beim Einbau der Remdesivir-Wirkform zunächst keine Hemmung beobachtet werden, zumal das Vorhandensein einer 3'-OH-Gruppe den nukleophilen Angriff am nächsten ankommenden Nukleotid erlaubt (Abbildung 41). Die RNS-Synthese wird tatsächlich erst nach dem Einbau einiger weiterer Nukleotide gestoppt (Jordan et al. 2018, Tchesnokov et al. 2019). In der Regel erfolgt der Stopp der RNS-Synthese zwischen den Positionen i+3 und i+5, wenn die Remdesivir-Wirkform an Position i eingebaut wurde (Gordon et al. 2020).

Die RNS-abhängige RNS-Polymerase von SARS-CoV-2

Coronaviren nutzen eine aus vielen Proteinen zusammengesetzte Maschinerie zur Replikation und Transkription. Mehrere NSP (Nichtstrukturproteine) führen zu einer Spaltung und produzieren als Spaltprodukte des ORF1a (open reading frame 1a) und ORF1ab (open reading frame 1ab) virale Polyproteine, die eine Erleichterung der viralen Transkription und Replikation ermöglichen (Gao et al. 2020). Eine Schlüsselkomponente dieses Multiproteinkomplexes ist NSP12, die RNS-abhängige RNS-Polymerase (RdRP), die ohne ihre Cofaktoren nur eine minimale Polymerase-Aktivität besitzt (Ahn et al. 2012). Diese Polymerase katalysiert die die virale RNS-Synthese und spielt eine zentrale Rolle innerhalb des Transkriptionszyklus des SARS-CoV-2-Virus, benötigt aber den Komplex mit den Cofaktoren NSP7 und NSP8. Dieser ternäre Komplex ist in Abbildung 42 Kryoelektronenmikroskopie dargestellt.

Betrachtet man den ternären Komplex als Gesamtes (Gao et al. 2020), zeigt er große Ähnlichkeit zum SARS-CoV-1-NSP12-NSP8-NSP7-Komplex mit einem RMSD-Wert (root mean square deviation) von 0,82 für 1082 C_{α} -Atome. Die Polymerase-Domäne nimmt eine konservierte Konformation ein, die innerhalb der Familie der viralen Polymerasen typisch ist (McDonald et al. 2013).

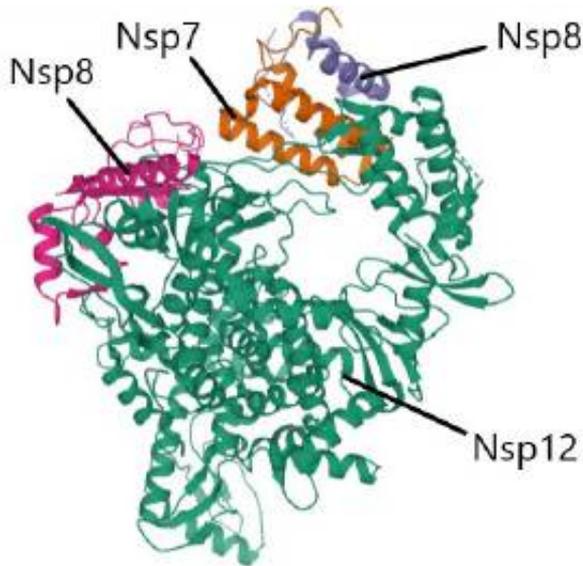


Abbildung 42: Ternärer SARS-CoV-2-NSP12-NSP8-NSP7-Komplex (nach Gao et al. 2020, PDB-ID: 6M71).

NSP12 entspricht der RNS-abhängigen RNS-Polymerase von SARS-CoV-2. NSP8 und NSP7 sind die Cofaktoren, die für Transkription und Replikation benötigt werden.

Die SARS-CoV-2-RdRP besteht aus drei Subdomänen (Abbildung 43): eine Finger-Subdomäne von Leu366 bis Ala581 sowie Lys621 bis Gly679, einer Palm-Subdomäne von Thr582 bis Pro620 und Thr680 bis Gln815 und einer Thumb-Subdomäne (Aminosäure-Reste His816 bis Glu920). Die Struktur der SARS-CoV-2-RBS-abhängigen RNS-Polymerase beinhaltet eine rechtsgängige Sequenz (Ser367 bis Phe920). Zusätzlich enthält die Struktur eine N-terminale Extension (Aminosäuren Asp60 bis Phe920): die Nidovirus-spezifische Domäne, die eine nidovirale RNS-abhängige RNS-Polymerase-assoziierte Nukleotid-Transferase-Konformation (NiRAN) einnimmt (Lehmann et al. 2015). Die Finger-Domäne der RdRP und NiRAN sind durch eine Interface-Domäne miteinander verbunden (Aminosäuren Ala250 bis Arg365). Eine zusätzliche, bisher nicht bekannte N-terminale β -Haarnadel (Aminosäuren Asp29 bis Lys50) reicht in eine Furche hinein und ist eingebettet zwischen NiRAN-Domäne und Palm-Subdomäne (Gao et al. 2020).

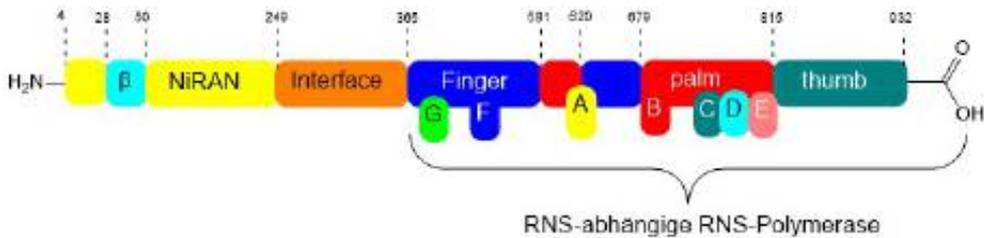


Abbildung 43: Schematische Darstellung des ternären Polymerase-Komplexes des SARS-CoV-2 bestehend aus Finger-, Palm- und Thumb-Domäne (nach Gao et al. 2020).

Der sogenannte „grip“, ein Loch, das zwischen den drei Subdomänen der RNS-abhängigen RNS-Polymerase gebildet wird, dient als Bindungsstelle für das RNS-Template und für die Nucleosidtriphosphate. Das aktive Zentrum der SARS-CoV-2-RNS-Polymerase (NSP12) wird von den konservierten Polymerase-Motiven A–G gebildet (Abbildung 43). Motiv A enthält den von anderen RNS-Polymerasen bekannten Asparaginsäure-Rest Asp233, der durch seinen divalenten Carboxylat-Rest in der Seitenkette zweiwertige Kationen bindet (Gong et al. 2010, Appleby et al. 2015). Motiv C enthält die katalytischen Reste Ser759-Asp760-Asp761 innerhalb eines Turns zweier β -Faltblattstrukturen. Diese katalytischen Aminosäuren sind bei den meisten RNS-abhängigen RNS-Polymerasen konserviert, wobei der erste Rest statt eines Serins auch ein Glycin sein kann (Gao et al. 2020). Innerhalb dieser Struktur sind der Zutritt für das Primer-Template, der Eingang für das Nucleosidtriphosphat sowie der Ausgang für den sich bildenden RNS-Strang positiv geladen und Lösungsmittel-zugewandt. Der Zugang für das Nucleosid-Triphosphat wird mittels einer Reihe hydrophiler Reste gebildet, einschließlich dreier Lysin-Reste (Lys545, Lys, 553 und Lys555) innerhalb von Motiv F. Sie treffen in einer zentralen Kavität zusammen, innerhalb derer die Polymerase-Motive eine Template-vermittelte RNS-Synthese vollziehen. Die beschriebenen Strukturen, ob der Eingang des Primer-Template, der Nucleosid-triphosphat-Eingang oder der Ausgang des neu synthetisierten RNS-Stranges ähneln denen der Polymerase des SARS-CoV-1 oder anderer RNS-Polymerasen, wie z. B. der HCV-Polymerase (Gong et al. 2010).

Allerdings gibt es auch Unterschiede zu anderen Polymerasen, wie z. B. zur SARS-CoV-1-Polymerase (Abbildung 44): Innerhalb der Polymerase von SARS-CoV-2 existiert N-terminal ein struktureller Abschnitt an Aminosäuren (von Ala4 bis Arg118), die fünf antiparallele β -Faltblätter und zwei α -Helices bilden. Die Aminosäure-Reste Asn215 bis Asp218 bilden innerhalb des NSP12 von SARS-CoV-2 eine β -Faltblattstruktur. Diese Reste sind innerhalb von NSP12 des SARS-CoV-1 weniger geordnet. Diese Aminosäure-Region wechselwirkt mit dem Strang, der die Reste

Val96 bis Ala100 enthält und somit zu seiner Stabilisierung beiträgt. Das Ergebnis ist eine Semi- β -Fassarchitektur (Gao et al. 2020).

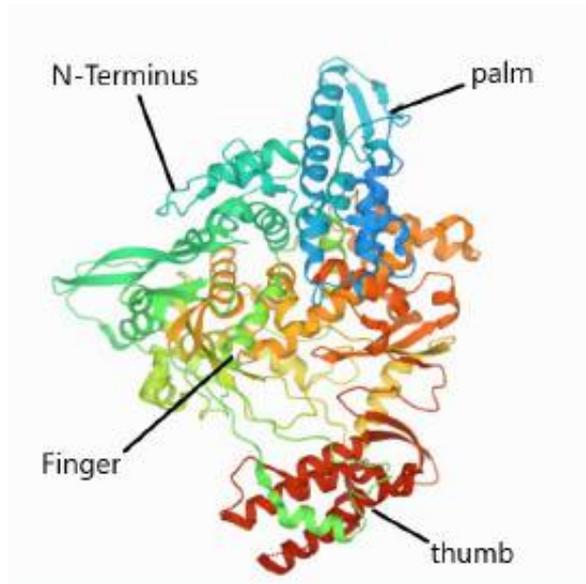


Abbildung 44: Die SARS-CoV-1-RNS-abhängige RNS-Polymerase (NSP12) als Monomer mit ihren drei Subdomänen Finger, Palm und Thumb (nach Kirchdoerfer und Ward 2019).

Steady-State-Enzym-Kinetik-Untersuchungen bei SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 zeigen, dass die Remdesivir-Wirkform effizient in die RNS eingebaut wird. Der Einbau an Position i verursacht einen verzögerten Kettenabbruch an Position $i+3$. Ein Charakteristikum dieses Virustatikums bzw. seiner Triphosphat-Wirkform ist die große Selektivität, mit der die Remdesivir-Wirkform gegenüber seinem natürlichen kompetitiven Gegenspieler, dem ATP, in die RNS eingebaut wird (Abbildung 45) (Zhang und Zhao 2020).

Ein Wert unter 1 bedeutet, dass das Analogon effizienter als das natürliche Nukleosidtriphosphat in die RNS eingebaut wird. SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 zeigen beide sehr niedrige Selektivitätswerte von 0,32 und 0,26. Die Remdesivir-Wirkform wird demnach wesentlich effizienter in die RNS eingebaut als Adenosin-triphosphat. Hier haben die 2'-C-methylierten Verbindungen, einschließlich des Anti-Hepatitis-C-Medikaments Sofosbuvir sowie der Breitspektrum-Virustatika Favipiravir und Ribavirin, deutliche Defizite (Gordon et al. 2020). Bei der RNS-Polymerase des Ebola-Virus liegt der Selektivitätswert im Bereich von 2, d. h., ATP wird leichter und effizienter eingebaut als die Wirkform des Remdesivirs. Für die RNS-Polymerase des Lassa-Virus ergibt sich sogar ein Wert von etwa 20 (Gordon et al. 2020).

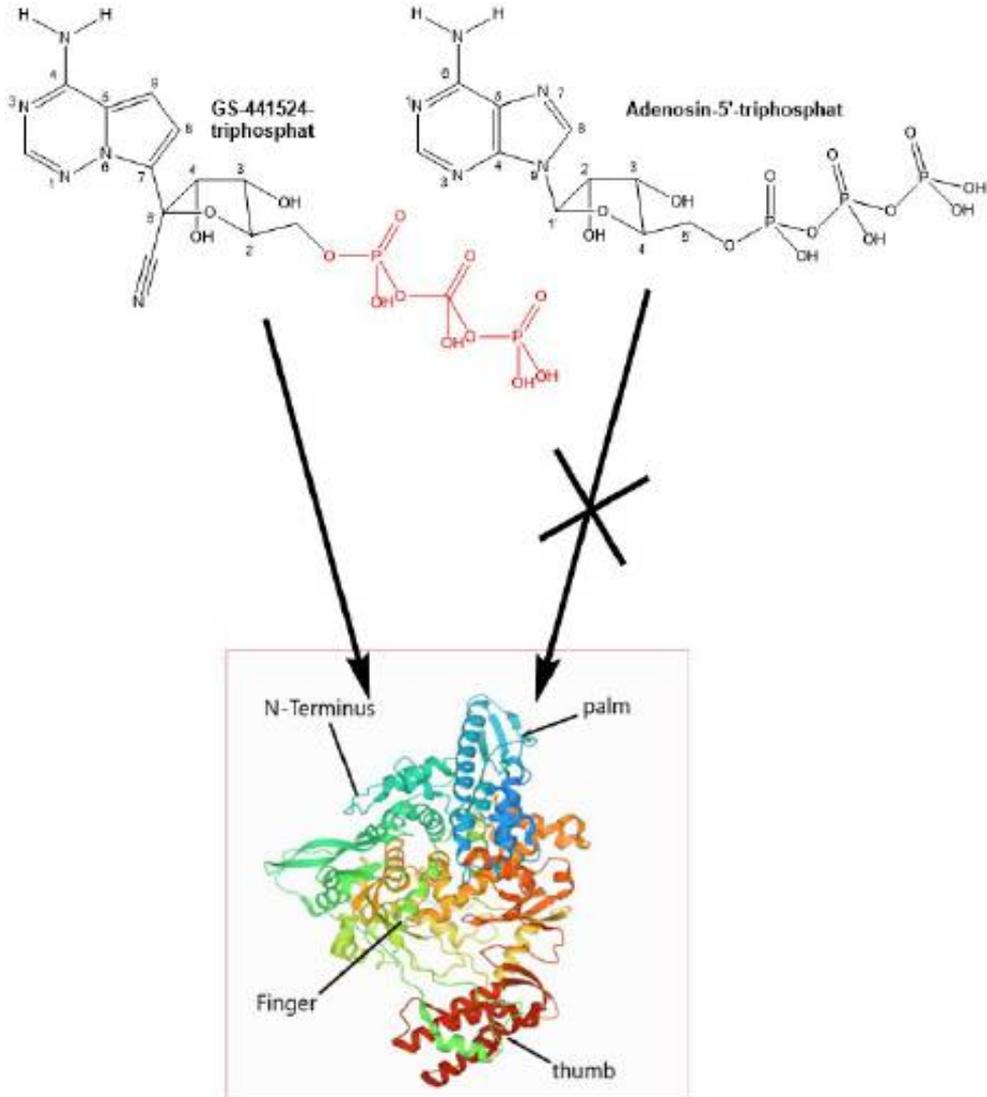


Abbildung 45: GS-441524-triphosphat, der bioaktive Metabolit des Remdesivirs, verdrängt das natürliche Substrat Adenosin-5'-triphosphat im kompetitiven Wettstreit von seinem Target, der Bindungstasche innerhalb der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (NSP12).

Zhang und Zhou (2020) haben interessante Ergebnisse hinsichtlich der Bindungen des natürlichen Substrates Adenosin-5'-triphosphat und der Wirkform des Remdesivirs erhalten. Dabei konnten sie noch von keiner Kristall- oder elektronenmikroskopischen Struktur ausgehen, sondern konstruierten ein Homologiemodell auf Grundlage der bekannten Struktur der SARS-CoV-1-Polymerase, die eine Sequenzidentität

zur SARS-CoV-2-Polymerase von 95,8 % aufweist. Nach Bildung eines mutmaßlichen Komplexes der Wirkform des Remdesivirs und der RNS-Polymerase wurde dieser Komplex mit der ATP-gebundenen RNS-Polymerase des Poliovirus (PDB-ID: 2ILY) ohne RNS-Template angeglichen und weiter optimiert (Zhang und Zhou 2020). Durch eine neue kryoelektronenmikroskopische Struktur (PDB-ID: 6M71) konnte die Struktur von Zhang und Zhou verifiziert werden. Das Adenosin-5'-triphosphat bindet gut in einer Tasche innerhalb des „grips“. Die negativ geladene Triphosphat-Gruppe des ATP geht Wechselwirkungen mit Ser549, Lys 551, Arg553 und Arg555 ein, die allesamt innerhalb der Finger-Subdomäne liegen, sowie mit Arg836 innerhalb der Thumb-Subdomäne (Abbildungen 44 und 46). Diese Aminosäuren besitzen bis auf das Ser549 alle eine positiv geladene Seitenkette. Das Serin hat aber zumindest durch die Seitenketten-Hydroxyl-Gruppe H-Brücken-Donator-Eigenschaften und kann auf diese Weise ebenso Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sauerstoff-Atomen der Phosphat-Gruppen des ATP eingehen. Außerdem interagiert das Triphosphat mit dem zweiwertigen Kation im aktiven Zentrum. Im Fall von Zhang und Zhou (2020) ist es Mg^{2+} gewesen. Das zweiwertige Magnesium-Kation liegt zwischen der Triphosphat-Gruppe und der palm-Subdomäne des NSP12 und neutralisiert die leicht negativ geladene Proteinoberfläche an dieser Stelle (Asp618, Asp761, Glu811). Die planare Base, das Adenin des ATP, geht Wechselwirkungen mit Met542, Thr556, Val557, Ala558 und Ser682 der Finger-Subdomäne ein. Insgesamt ist die ATP-Bindungstasche nach den Berechnungen von Zhang und Zhou (2020) ein hervorragendes „druggable target“.

Die Bindung der Wirkform des Remdesivirs, GS-441524-triphosphat, weicht von der des ATP an die SARS-CoV-2-RNS-Polymerase nach Zhang und Zhou ein wenig ab (Abbildung 47) (Zhang und Zhou 2020). Dies liegt hauptsächlich in der zusätzlichen Bindung der Nitril-Gruppe ($-C\equiv N$) in einer flachen Tasche begründet, die durch Aminosäuren der Finger-Subdomäne (Lys545, Tyr546 und Ala547) gebildet wird. Ähnlich wie beim ATP interagiert der Triphosphat-Rest vornehmlich mit positiv geladenen Aminosäuren der Finger-Subdomäne (Lys551, Arg553, Arg555), der pal-Subdomäne (Lys621 und Lys798) und der Thumb-Subdomäne (Arg836). Auch das Mg^{2+} -Kation ist wie beim ATP zwischen der Triphosphat-Gruppe und der Palm-Subdomäne lokalisiert. Der Nukleosid-Part des GS-441524-triphosphats geht hauptsächlich Wechselwirkungen mit Lys545, Ala547, Ser549, Arg555 und Val557 der Finger-Subdomäne ein. Interessanterweise wird die Asparaginsäure an Position 618 der palm-Subdomäne direkt und signifikant durch die Bindung von GS-441524-triphosphat beeinflusst. Asp618 ist als wesentlicher Aminosäure-Rest der SARS-CoV-1-RNS-Polymerase identifiziert worden (Te Velthuis et al. 2010). GS-441524-triphosphat bildet eine H-Brücke zu Lys798. Dadurch geht die H-Brücke

zwischen Lys798 und Asp618 verloren. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Studien von Zhang und Zhou (2020) ist der Einfluss der GS-441524-triphosphat-Bindung auf den „grip“. Durch die Bindung scheint das Loch blockiert zu sein, das die drei NSP12-Subdomänen bilden und das die Eintrittspforte für das RNS-Template darstellt. Möglicherweise wird dadurch die Aktivität der SARS-CoV-2-Polymerase deutlich reduziert. Weitergedacht könnte Remdesivir tatsächlich ein „terminierendes Nukleotid“ für die RNS sein (Warren et al. 2016). Der Bindungsmodus, den Zhang und Zhou postulieren, stimmt mit dem von Gao und Mitarbeitern vorhergesagten überein (Gao et al. 2020). Auch dort finden sich Arg555, Val557 und Asp618 unter den entscheidenden Aminosäure-Resten.

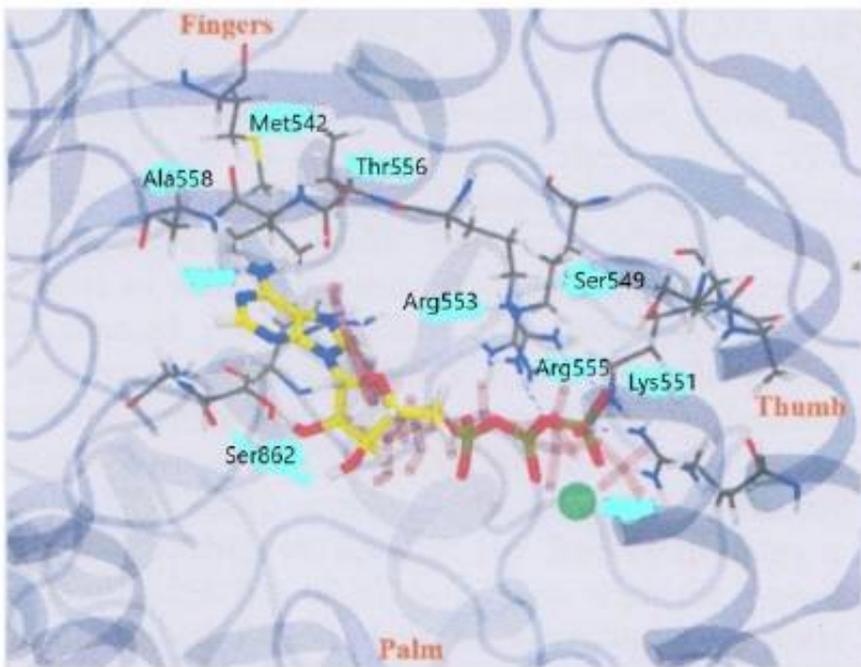


Abbildung 46: Adenosin-5'-triphosphat in seiner Bindungstasche der SARS-CoV-2-RNS-abhängigen RNS-Polymerase (NSP12) (nach Zhang und Zhou 2020).

Die Triphosphat-Gruppe ist umgeben von basischen Aminosäuren (Lys551, Arg553, Arg555, Arg836) mit Ausnahme des Ser549. Zusätzlich ist das Mg^{2+} -Kation an der Fixierung des Triphosphates beteiligt. Das Adenosin interagiert mit Met542 (nicht eingezeichnet), Thr556, Val557, Ala558 und Ser682.

Grüner Kreis: Mg^{2+} ; Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code; Adenosin gelb-blau-rot mit C-Atomen in Gelb, N-Atomen in Blau und O-Atomen in Rot; Triphosphat-Gruppe grün-rot mit P-Atomen in Grün und O-Atomen in Rot.

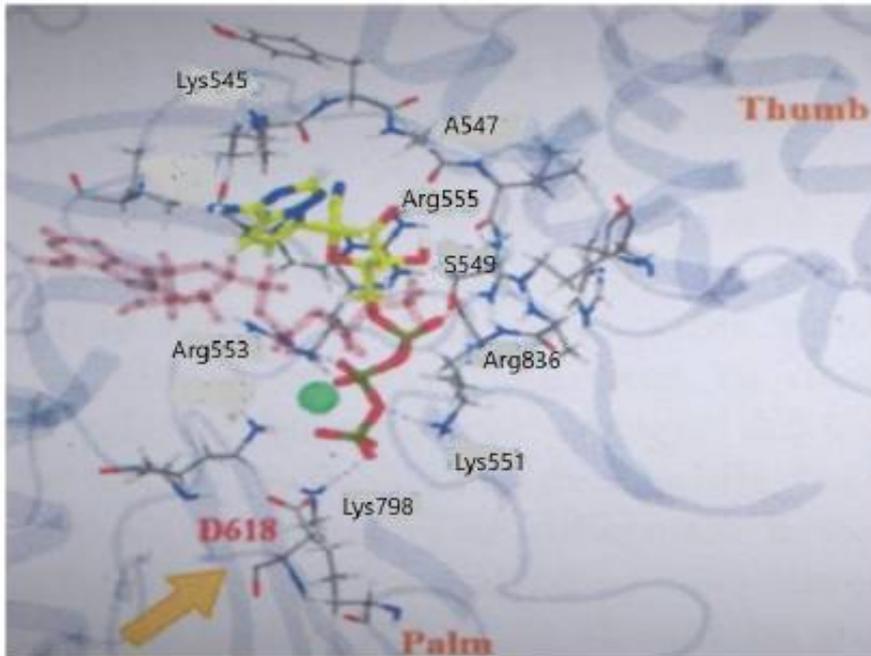


Abbildung 47: Der kompetitive Antagonist GS-441524-triphosphat, die Wirkform des Prodrugs Remdesivir, in seiner Bindungstasche der SARS-CoV-2-RNS-abhängigen RNS-Polymerase (NSP12) (nach Zhang und Zhou 2020).

Die Bindung des GS-441524-triphosphats ähnelt der des ATP, jedoch sind zwei Unterschiede sichtbar: 1. die Nitril-Gruppe des aktivierten Remdesivirs beansprucht Raum und ist eingebettet in eine kleine Tasche, die durch die Aminosäuren Lys545, Tyr546 und Ala547 der Finger-Subdomäne gebildet wird; 2. Asp618 büßt die stabilisierende H-Brücke zu Lys798 ein. Lys798 bildet seinerseits eine H-Brücke zu einem O-Atom des Triphosphat-Restes.

Pfeil: Asp618 als Schlüssel-Aminosäure. Grüner Kreis: Mg^{2+} ; Aminosäuren im Einbuchstaben-Code. Adenosin gelb-blau-rot mit C-Atomen in Gelb, N-Atomen in Blau und O-Atomen in Rot; Triphosphat-Gruppe grün-rot mit P-Atomen in Grün und O-Atomen in Rot.

Zhang und Zhou haben außerdem die relativen freien Bindungsenergien $\Delta\Delta G$ von Adenosin-5'-triphosphat und GS-441524-triphosphat berechnet. Die des GS441524-triphosphats beträgt ca. $-7,68$ kcal/mol, die des ATP $-4,80$ kcal/mol, was einen Unterschied von $-2,80$ kcal/mol bedeutet und erklärt, weshalb die Remdesivir-Wirkform wesentlich stärker an die RdRP des SARS-CoV-2 bindet als das natürliche Substrat ATP (Zhang und Zhou 2020). Zudem ist die Dissoziationskonstante K_d des ATP etwa 100-mal größer als die des GS-441524-triphosphats, was im kompetitiven Wettstreit um die Bindungsstelle eine komplette Verdrängung des ATP aus seiner Bindung durch GS-441524-triphosphat zur Folge hat (Zhang und Zhou 2020). Diese Ergebnis-

se stimmen mit Ergebnissen von Yin und Mitarbeitern überein, die zeigen konnten, dass Remdesivir die Aktivität der SARS-CoV-2-NSP12 bei einem Zehntel der normalen ATP-Konzentration vollkommen hemmt (Yin et al. 2020). Weitere Unterstützung finden die Ergebnisse von Zhang und Zhou durch einen Backbone-RMSD-Wert ihrer gemodelten RNS-Polymerase, der nur 3,3 Å von dem der kryoelektronenmikroskopischen Struktur der RNS-Polymerase mit RNS-Template abweicht (Zhang und Zhou 2020, Yin et al. 2020). Das Übereinanderlegen beider Polymerase-Strukturen zeigt zusätzlich, dass GS-441524-triphosphat perfekt positioniert ist, um H-Brücken mit der sich bildenden RNS einzugehen und damit in die RNS eingebaut werden kann (Zhang und Zhou 2020).

Remdesivir zeigt eine Target-Spezifität: GS-441524 wird wesentlich ineffizienter und langsamer in die RdRP des Ebola-Virus oder gar der des fern verwandten Lassa-Virus eingebaut. Der Stopp der RNS-Synthese nach Inkorporation des GS-441524-triphosphats in den sich entwickelnden Strang dieser Polymerase erfolgt nicht. Dagegen wird Remdesivir leicht und effizient in die RNS-Polymerasen von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV eingebaut (Gordon et al. 2020). Die Aminosäure-Sequenzen von NSP8 und NSP12 sind zwischen SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 zu ca. 96 % identisch, während die Identität dieser Sequenzen zwischen MERS-CoV und SARS-CoV-2 bei 71 % liegt. Trotz der größeren Sequenzunterschiede zwischen SARS-CoV-2 und MERS-CoV liegen wichtige Sequenzen für Substrat-Bindung und Katalyse der beiden RNS-Polymerasen konserviert vor. Dementsprechend werden auch ähnliche Wechselwirkungen mit den inhibitorisch wirkenden Nukleotid-Analoga zu erwarten sein (Gordon et al. 2020).

Gordon und Mitarbeiter haben die Selektivitäten auch für andere Substrate im Vergleich zum natürlichen Substrat ATP ermittelt. Der Selektivitätswert für die 2'-Desoxy-Variante dATP des ATP liegt bei ca. 1000. dATP dient nur DNS-Polymerasen als Substrat, als 2'-Desoxyribose-Derivat aber nicht den RNS-Polymerasen. Ähnliche Resultate zeigen die Virustatika Favipiravir und Ribavirin (Oesterreich et al. 2014, Furuta et al. 2017, Hawman et al. 2018). Für beide Virustatika werden Selektivitätswerte von ca. 500 bzw. 1000 gegenüber dem natürlichen Substrat ATP ermittelt. Für Substanzen mit Modifikationen an der 2'β-Position des Zuckers werden ebenso sehr hohe Selektivitätswerte gegenüber dem natürlichen Substrat erzielt. Das Uridin-Analogon Sofosbuvir hemmt effizient und mit hoher Aktivität die Hepatitis-C-RNS-abhängige RNS-Polymerase (Appleby et al. 2015). Jedoch erreichen dessen Wirkform Sofosbuvir-triphosphat sowie 2'-C-Methyl-ATP lediglich Selektivitätswerte von ca. 1000 bzw. 170 im Vergleich zu UTP bzw. ATP. Ein vermeintliches Homologie-Modell für SARS-CoV-2 zeigt eine mutmaßliche sterische Behinderung der Aminosäure-Reste Asp623 und Ser682 (Gordon et al. 2020). Ursächlich hierfür

ist wahrscheinlich eine sterische Kollision der 2' β -Modifikation (beim Sofosbuvir ein Fluor-Atom) mit der Asparaginsäure an Position 623 sowie dem Serin an Position 682 der Polymerase (Abbildung 49) (Gordon et al. 2020).

In Tabelle 13 sind die Selektivitätswerte für die RNS-abhängige RNS-Polymerase von SARS-CoV-2 zusammengestellt. Selektivitätswerte unter 1 bedeuten, dass das synthetische oder nichtphysiologische Nukleotid-Analogon leichter und effizienter in den sich entwickelnden DNS-Strang eingebaut wird als das natürliche Substrat ATP bzw. UTP (für Sofosbuvir-triphosphat). Selektivitätswerte über 1 bedeuten, dass das natürliche Substrat ATP leichter und effizienter in die DNS eingebaut wird.

Tabelle 13: Selektivitätswerte in Bezug zum Referenzsubstrat Adenosin-5'-triphosphat (ATP) bzw. Uridin-triphosphat für die RNS-abhängige RNS-Polymerase von SARS-CoV-2 (nach Gordon et al. 2020).

Nukleotid-triphosphat	Selektivitätswert
Adenosintriphosphat (ATP)	1 (Referenz)
2'-Desoxadenosin-triphosphat (dATP)	975
2'-C-Methyl-adenosin-triphosphat (2' CMe-ATP)	173
Favipiravir-triphosphat	570
Ribavirin	>> 1000
GS-441524-triphosphat	~ 0,3
Uridin-triphosphat (UTP)	1 (Referenz)
Sofosbuvir-triphosphat	1056

GS-441524-triphosphat ist ein nichtobligater RNS-Ketten-Terminator, da im 1' β -Cyano-ribose-Part eine 3' β -Hydroxyl-Gruppe enthalten ist, die immer noch wie beim physiologischen ATP in der Lage sein sollte, über einen nukleophilen Angriff mit dem nächsten ankommenden Nukleotid eine Phosphordiester-Bindung zu bilden (Abbildung 48). Die verzögerte Kettenabbruch-Reaktion sollte demnach ein plausibler Wirkmechanismus für das GS-441524-triphosphat sein (Jordan et al. 2018, Tchesnokov et al. 2019, Gordon et al. 2020). Hohe Konzentrationen des natürlichen Nukleotid-Pools können die Stilllegung der RNS-Synthese durch Remdesivir verhindern oder rückgängig machen. Die natürlichen Nukleotide können Konzentrationen bis in den niedrigmillimolaren Bereich erreichen (Traut 1994, Kennedy et al. 2010). Die intrazelluläre Konzentration des GS-441524-triphosphats kann zwischen niedrigen und hohen mikromolaren Werten schwanken (Warren et al. 2016). Große Quotienten Nukleotid/Remdesivir-Wirkform wirken sich nachteilig auf eine Polymerase-Hemmung aus. Allerdings vermag Remdesivir immer noch dadurch zu wirken, dass es eine wesentlich effizientere Inkorporation in den DNS-Strang auf-

weist als ATP und somit eventuell höhere Konzentrationen an natürlichem Substrat teilweise ausgleichen kann (Gordon et al. 2020).

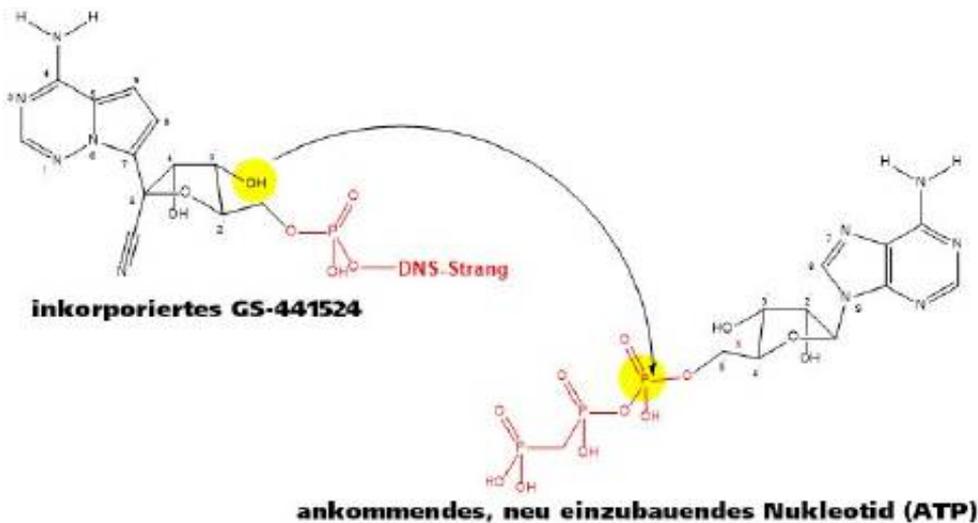


Abbildung 48: Die Remdesivir-Wirkform GS-441524-triphosphat als nichtobligater, verzögert wirksamer RNS-Ketten-Terminator.

Nach Inkorporation als falsches Substrat in den sich entwickelnden DNS-Strang kommt es nicht sofort zum Kettenabbruch, sondern durch die $3'\beta$ -Hydroxyl-Gruppe ist ein nukleophiler Angriff auf das neu ankommende und zum Einbau bereitstehende Nucleotid an die Phosphorester-Bindung möglich. Die Termination der RNS-abhängigen RNS-Polymerase erfolgt meist erst an der Stelle $i+3$ (bis $i+5$), sofern die Remdesivir-Wirkform an Position i eingebaut wurde (Gordon et al. 2020).

Bei der Remdesivir-Wirkform hingegen nehmen Asp623 und Ser682 der SARS-CoV-2-RNS-Polymerase dieselbe Konformation an wie beim natürlichen Substrat ATP. Der $1'\beta$ -Cyano-Substituent des GS-441524-triphosphats passt exakt in eine kleine Tasche, die aus den Aminosäuren Thr687 und Ala688 gebildet wird (Abbildungen [50](#) und [51](#)).

Die Daten der Arbeitsgruppe um Gordon bestätigen, dass eine konsekutive Inkorporation und/oder viele Inkorporationen des GS-441524-triphosphats den RNS-Syntheseabbruch beschleunigen. Allerdings muss die Wirksamkeit dieses Effektes erst noch nachgewiesen werden (Gordon et al. 2020). Die $3'-5'$ -Exonuklease-Aktivität des Nichtstrukturproteins NSP14 kann die Wirksamkeit von Nucleotid-Analoga wie Remdesivir reduzieren (Agostini et al. 2018, Ferron et al. 2018, Gordon

et al. 2020). In Zusammenarbeit mit NSP10 besitzt diese Exonuklease Proofreading-Aktivität (Minskaia et al. 2006, Bouvet et al. 2012, Ferron et al. 2018). Zukünftige Studien sollten Auskunft über die Inkorporationsraten des Nukleotid-Analogons geben, genauso wie über die Anzahl der wieder entfernten Nukleotid-Analoga.

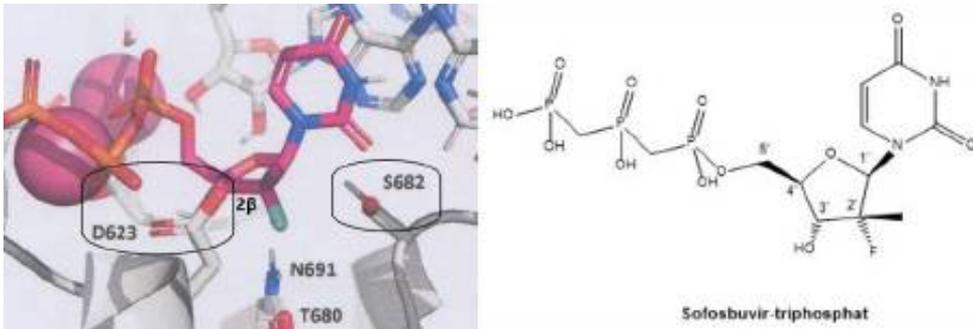


Abbildung 49: Modell der SARS-CoV-2-RNS-Polymerase mit der Wirkform des Sofosbuvirs, dem Sofosbuvir-triphosphat (nach Gordon et al. 2020).

Die Aminosäuren Asp623 (D623) und Ser682 (S682) behindern sterisch die optimale Ausrichtung des Nucleosid-Grundgerüsts wegen des 2'β-Methyl-Substituenten im Zucker (Gordon et al. 2020).

Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code; Sofosbuvir-Base und Zucker: C-Atome: lila, N-Atome: blau, 2αF-Atom: grün, Triphosphat-Gruppe: orangefarben-rot. Orangefarben: P-Atome, rot: O-Atome.

Die Proofreading-Funktion mittels intakter Exonuklease (NSP14) ist für die Coronaviren ungemein wichtig. NSP14-negative murine Hepatitis-Viren (MHV) sind 4,5-mal sensitiver gegenüber einer Remdesivir-Therapie als Wild-Typ-MHV. Allerdings lässt die extrem starke Hemmung der Wild-Typ-Coronaviren einen neuartigen Wirkmechanismus der RNS-Synthese-Hemmung vermuten. Dieser Mechanismus sollte das Virus in die Lage versetzen, die Exonuklease-Aktivität und damit das Proofreading des NSP14 zu umgehen. Remdesivir verbreitet seine antivirale Wirkung sehr früh während der Infektion und reduziert RNS-Level dosisabhängig. Dabei ist Remdesivir 3- bis 30-mal effektiver als GS-441524 gegenüber allen Coronaviren, die bislang getestet worden sind (Sheahan et al. 2017). Dies steht im Einklang mit der Entdeckung, dass das eigentliche Prodrug GS-5734 wesentlich effektiver zur Triphosphat-Wirkform metabolisiert wird als GS-441524, bei dem der Phosphoramidat-Rest fehlt (Warren et al. 2016).

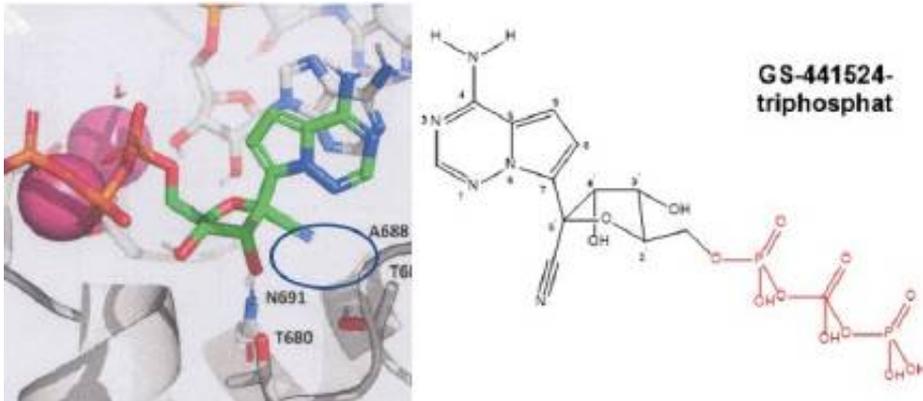


Abbildung 50: Die Wirkform des Remdesivirs, das GS-441524-triphosphat, in seiner Bindungstasche innerhalb der SARS-CoV-2-RNS-abhängigen RNS-Polymerase (Gordon et al. 2020). Die RNS-Polymerase-Reste Asp623 und Ser682 nehmen dieselbe Konformation wie beim natürlichen Substrat ATP ein. Der Kreis stellt die kleine Tasche – gebildet von Thr687 (T687 abgeschnitten) und Ala688 (A688) – dar, in die der 1'β-Cyano-Substituent optimal passt (Gordon et al. 2020). Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code; Remdesivir-Base und Zucker: Grün: C-Atome, blau: N-Atome, rot: O-Atome; Triphosphat-Gruppe: orangefarben-rot. Orangefarben: P-Atome, rot: O-Atome.

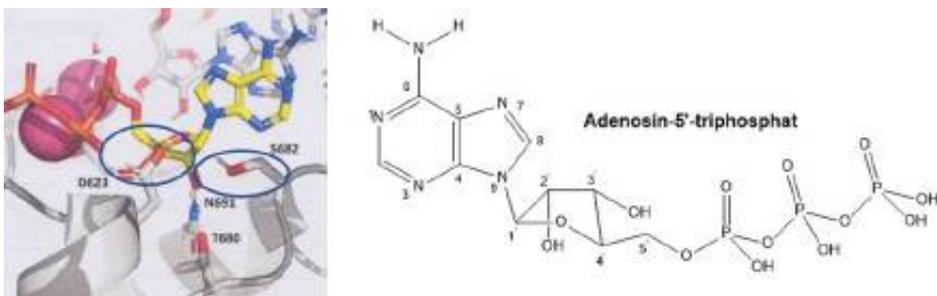


Abbildung 51: Das natürliche Substrat Adenosin-5'-triphosphat in seiner Bindungstasche innerhalb der SARS-CoV-2-RNS-abhängigen RNS-Polymerase (Gordon et al. 2020). Die 2'-OH-Gruppe des ATPs wird erkannt durch ein Aminosäuretrio Asp623, Ser682 und Asn691. Wasserstoffbrücken-Bindungen werden zum Serin und zum Asparagin ausgebildet (Gordon et al. 2020). Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code; Adenosin: Gelb: C-Atome, blau: N-Atome, rot: O-Atome; Triphosphat-Gruppe: orangefarben-rot. Orangefarben: P-Atome, rot: O-Atome.

Nukleosid-Analoga sind bei einer Vielzahl von RNS- und DNS-Viren wirksam (Smith et al. 2013). Allerdings haben sich einige Nukleosid-Analoga bei Coronaviren als unwirksam oder zumindest wenig effektiv erwiesen. Die Resistenz gegenüber einer potenten Hemmung, beispielsweise durch Ribavirin oder 5-Fluoruracil, wird

der Proofreading-Funktion der Exonuklease-Aktivität zugeschrieben. Nukleosid-Analoga, die Coronaviren effektiv hemmen sollen, müssen demnach die Exonuklease direkt hemmen und in den wachsenden RNS-Strang hinreichend effizient eingebaut werden, sodass die 5'-3'-Elongation wesentlich schneller als die Exonuklease-Spaltungs-Reaktion ist oder dass sie einfach nicht von der Proofreading-Maschinerie der Exonuklease erfasst werden. Der letztere Mechanismus wird dem Aciclovir und seiner Aktivität gegenüber Herpes-simplex-Viren zugeschrieben, insbesondere dass die HSV-Exonuklease nicht imstande ist, Aciclovir zu entfernen (Derse et al. 1981). Das lässt vermuten, dass GS-5734 zumindest teilweise von der Proofreading-Aktivität erkannt wird, dass aber die Exonuklease-Aktivität nicht ausreicht, um eine Coronavirus-Replikation effektiv zu unterbinden (Agostini et al. 2018).

Agostini und Mitarbeiter registrierten 2018 erstmals eine 5,6-fache Resistenz gegenüber GS-441524 bei MHV. Bei der Sequenzierung wurden zwei Mutationen innerhalb der NSP12-Kern-Polymerase-Region identifiziert: Phe476Leu und Val553Leu. Ein ähnlicher Resistenzlevel ist bei SARS-CoV-2 für die homologen Mutationen Phe480Leu und Val557Leu beobachtet worden. Da diese Mutationen nicht in der unmittelbaren Umgebung des katalytischen Zentrums der RNS-abhängigen RNS-Polymerase liegen, muss der genaue Resistenzmechanismus noch abgeklärt werden. Beide dieser Reste liegen konserviert über die gesamte Familie der Coronaviren vor, was darauf schließen lassen könnte, dass sie konservierte Funktionen ausüben. Molecular-Modelling-Untersuchungen der RNS-Polymerase von Coronaviren zeigen, dass Val553Leu innerhalb des Motivs F der Finger-Domäne positioniert ist, die einen Kanal für ankommende Nukleotide bildet und Kontakt zum 5'-Ende des Templates hat. Phe476Leu liegt außerhalb irgendeines strukturellen Motivs, ist allerdings ebenso in der Finger-Domäne lokalisiert (Xu et al. 2003). Resistenz-verleihende Mutationen bei Nukleosid-Analoga – einschließlich derer, die in der Finger-Domäne liegen – verändern die Replikationsgenauigkeit bei Picornaviren und HIV (Wainberg et al. 1996, Hsu et al. 1997, Pfeiffer et al. 2003). Tatsächlich ist die Aktivität von GS-5734 in Abwesenheit der NSP14-Proofreading-Exonuklease noch größer als sie beim Wild-Typ-Virus schon ist. Allerdings codiert die Coronaviren-Replikase für viele Proteine. Daraus hervorgehende Mutationen können Wechselwirkungen zwischen solchen Proteinen verändern. Mit einem biochemischen System *in vitro*, das sowohl Polymerase- als auch Exoribonuklease-Aktivität abbildet, könnte man den GS-5734-Resistenz-Mutationen spezifische Effekte auf die Polymerase oder die Proofreading-Aktivität zuordnen. So wird es interessant sein zu beobachten, ob Phe476Leu und Val 553Leu zu einer „Klassen-Resistenz“ gegenüber Nukleosid-Analoga führen, oder ob sie zu einer allgemein erhöhten Genauigkeit beim Kettenzusammenbau führen, zu veränderten Protein-Protein-Interaktionen oder zu völlig neuen Mechanismen.

Genauso wird es interessant sein, ob andere Proteine zur Resistenz beitragen (Agostini et al. 2018). Die Resistenz gegenüber einem Nukleosid-Analogen kann immer auch zu einer Stärkung des Virus führen, zu einer höheren Transmission oder zu einer Zunahme der Schwere der Erkrankung. Die Resistenz des MHV gegenüber GS-5734 entwickelt sich sehr langsam und nur teilweise, sodass man eine hohe genetische Resistenzbarriere vermuten kann, ähnlich wie es für die Hepatitis-C-Virus-Resistenz gegenüber Sofosbuvir beobachtet wird (Svarovskaia et al. 2016). Ebenso zeigt rekombinanter MHV mit beiden Mutationen gegenüber dem Wild-Typ über mehrere Passagen eine Beeinträchtigung seiner Leistungsfähigkeit und fällt gegenüber dem Wild-Typ-Virus ab, sodass das Auftreten dieser Mutationen sogar das Auftreten von Notfällen während einer Therapie mit Remdesivir verringern könnte (Agostini et al. 2018).

All diese Entdeckungen unterstützen einen Wirkmechanismus, bei dem Remdesivir in die naszierende Coronavirus-RNS inkorporiert wird, wo aber nicht zwischen Kettenabbruch und einem mutagenen Effekt der Inkorporation unterschieden wird. Andere Nukleosid-Analoga besitzen viele verschiedene Wirkmechanismen hinsichtlich der Hemmung der Virus-Replikation, eingeschlossen Favipiravir beim Influenza- und Ribavirin beim Hepatitis-C-Virus (HCV) (Te et al. 2007, Baranovich et al. 2013, Sangawa et al. 2013). Zukünftige Studien werden auch hier sicherlich helfen, die genauen Wirkmechanismen des Remdesivirs gegen Coronaviren zu entschlüsseln (Agostini et al. 2018, Ko et al. 2020).

Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen EC_{50} des Remdesivirs gegen Corona- und Filoviren liegen im submikromolaren Bereich, was für ein Breitspektrum-Virustatikum ungewöhnlich niedrig ist (Warren et al. 2016, Lo et al. 2017, Sheahan et al. 2017, Brown et al. 2019, Pruijssers et al. 2019). Eine hohe Wirksamkeit in Zellkulturtests korreliert mit der hocheffektiven Inkorporation der Remdesivir-Wirkform in die RNS der drei Coronaviren SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV sowie des Ebola-Virus. Gegen das Lassa-Virus zeigt Remdesivir nur eine marginale antivirale Aktivität, wofür auch die geringen Einbauraten in die Lassa-Virus-RNS sprechen (Lo et al. 2017). Vergleicht man ATP und Remdesivir in ihrer Wirkung gegenüber humaner RNS-Polymerase, lässt sich eine hohe Selektivität für ATP gegenüber Remdesivir ausmachen. Das geht einher mit der geringen Zytotoxizität des Remdesivirs (Warren et al. 2016, Sheahan et al. 2017, Tchesnokov et al. 2019). Im Vergleich zu Favipiravir und Ribavirin lässt sich feststellen, dass die Triphosphate der beiden Virustatika weniger effizient in die SARS-CoV-2-RNS-Polymerase eingebaut werden als dies bei der Remdesivir-Wirkform der Fall ist. In Zellkultur liegen die EC_{50} -Werte für Favipiravir und Ribavirin in Abhängigkeit vom jeweiligen RNS-Virus häufig im hohen mikromolaren Bereich (Delang et al. 2018, Pruijssers et al. 2019).

Entsprechend hohe Konzentrationen an Favipiravir ($EC_{50} = 109,5 \mu\text{M}$) und Ribavirin ($EC_{50} = 61,88 \mu\text{M}$) sind nötig, um eine SARS-CoV-2-Infektion zu reduzieren (³Wang et al. 2020).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die derzeitige Datenlage von einem einzigartigen, charakteristischen Wirkmechanismus für die Remdesivir-Wirkform bezüglich der Inhibition der RNS-abhängigen RNS-Polymerase der Coronaviren ausgeht. Wichtige Punkte der Inhibition der RNS-Polymerasen von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV sind eine günstige Selektivität gegenüber seinem kompetitiven natürlichen Gegenspieler, dem ATP, sowie ein verzögerter RNS-Synthesestopp an Position i+3. Die zusätzlich vorhandenen Sicherheitsdaten sowie die antiviralen Studien in Zellkultur und in Tiermodellen und der Wirkmechanismus als DAA (direct-acting antiviral) rechtfertigen in jedem Fall die zuletzt angelaufenen klinischen Studien, bei denen Remdesivir gegen die COVID-19-Erkrankung getestet wird (Gordon et al. 2020).

Literatur:

- Agostini, M.L. et al. MBio 2018, doi: 10.1128/mBio.00221-18
- Ahn, D.-G. et al. Arch Virol 2012, 157, 2095
- Appleby, T.C. et al. Science 2015, 347, 771
- Arzneistoffprofile 2011, 2.Aufl., in: Monographie Tenofovir, Govi-Verlag
- Baranovich, T. et al. J Virol 2013, 87, 3741
- ¹Beigel, J.H. et al. N Engl J Med 2020, doi: 10.1056/NEJMoa.2007764
- ²Beigel, J.H. et al. N Engl J Med 2020 Oct. 8, NEJMoa2007764, doi: 10.1056/NEJMoa2007764
- Bouvet, M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2012, 109, 9372
- Brown, A.J. et al. Antiviral Res 2019, 169, 104541
- Chao, J.Y. et al. J Pediatr 2020, 223, 14, doi: 10.1016/j.jpeds.2020.05.006
- Cho, A. et al. Antimicrob Agents Chemother 2008, 52, 458
- Cho, A. et al. Bioorg Med Chem Lett 2012, 22, 2705
- Cockrell, A.J. et al. Nat Microbiol 2016, 2, 16226
- Delang, L. et al. Antiviral Res 2018, 183, 85
- Ders, D. et al. J Biol Chem 1981, 256, 11447
- Doggrell, S.A. Exp Opin Invest Drugs 2020, doi: 10.1080/13543784.2020.1821645
- McDonald, S.M. et al. WIREsRNA 2013, 4, 351
- Dong, Y. et al. Pediatrics 2020, 145: e20200702
- ¹European Medicines Agency 2020, Presseerklärung vom 25.6.2020
- ²European Medicines Agency 2020, Summary on compassionate use, Remdesivir, 3. April 2020, EMA/178637/2020- Rev.2, Human Medicines Division
- ³European Medicines Agency 2020, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/veklury>
- FDA Fact Sheet for Health Care Providers 2020, Emergency Use Authorization of Remdesivir
- Ferron, F. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2018, 115, E162
- Furuta, Y. et al. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2017, 93, 449
- Gao, Y. et al. Science 368, 779
- Goldman J.D. et al. N Engl J Med. 2020, 383, 19, doi: 10.1056/NEJMoa2015301
- Gong, P. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010, 107, 22505

- Gordon, C.J. et al. *J Biol Chem* 2020, 295, 6785
- Grein, J. et al. *N Engl J Med* 2020, doi: 10.1056/NRJM2007016
- Hawman, D.W. et al. *Antiviral Res* 2018, 157, 18
- Hsu, M. et al. *Nucleic Acids Res* 1997, 25, 4532
- Jordan, P.C. et al. *PLoS Pathog* 2018, 14, e1006889
- Kennedy, E.M. et al. *J Biol Chem* 2010, 285, 39380
- Kirchdoerfer, R.N. et al. *Sci Rep* 2018, 8, 15701
- Kirchdoerfer, R.N. und Ward, A.B. *Nat Commun* 2019, 10, 2342
- Ko, W.-C. et al. 2020, *Intern J Antimicrob Agents* 2020, 55, 105933, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105933
- Lo, M.K. et al. *Sci Rep* 2017, 7, 43395
- McKee, D.L. et al. *Pharmacol Res* 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104859
- Lee, M.T. et al. *Biophys J* 2005, 89, 4006
- Lehmann, K.C. et al. *Nucleic Acids Res* 2015, 43, 8416
- Mackman, R.L. et al. *US Patent* 2011045102, 2011, July 22
- Mehellou, Y. et al. *Chem Med Chem* 2009, 4, 1779
- Minskaia, E. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 102, 5108
- Mulangu, S. et al. *N Engl J Med* 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1910993
- Oesterreich, L. et al. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8, e2804
- Pardo, J. et al. *Drugs in Context* 2020, 9, 2020-4-14, doi: 10.7573/dic.2020-4-14
- Patil, S.A. et al. *Tetrahedron Lett* 1994, 35, 5339
- Pfeiffer, J.K. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100, 7289
- Powell, J.R. *Am J Trop Med Hyg* 2018, 98, 1563
- Pruijssers, A.J. et al. *Curr Opin Virol* 2019, 35, 57
- Qiu, H. et al. *Lancet Infect Dis* 2020, 20, 689
- Sangawa, H. et al. *Antimicrob Agents* 2013, 57, 5702
- Sheahan, T.P. et al. *Sci Transl Med* 2017, 9, eaal3653
- Sheahan, T.P. et al. *Sci Transl Med* 2020, doi: 10.1126/scitranslmed.aal3653
- Siegel, D. et al. *J Med Chem* 2017, 60, 1648
- Smith, E.C. et al. *PLoS Pathog* 2013, 9, e1003565
- Sofia, M.J. *J Med Chem* 2010, 53, 7202
- Spinner C.D. et al. *JAMA* 2020, 324, 11, doi: 10.1001/jama.2020.16349
- Svarovskaja, E.S. et al. *J Infect Dis* 2016, 213, 1240
- Tchesnokov, E.P. et al. *Viruses* 2019, 11, 326, doi: 10.3390/v11040326
- Te, H.S. et al. *Gastroenterol Hepatol* 2007, 3, 218
- Traut, T.W. *Mol Cell Biochem* 1994, 140, 1
- Tu, Y.-F. et al. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 2657
- Te Velthuis, A.J. et al. *Nucleic Acids Res* 2010, 38, 203
- Wainberg, M.A. et al. *Science* 1996, 271, 1282
- Wang D. et al. *Front Med.* 2021, doi: 10.1007/s11684-020-0824-3
- ³Wang, M. et al. *Cell Res* 2020, 30, 269
- ¹Wang, Y. et al. *Trials* 2020, 422, doi: 10.1186/s13063-020-04352-9
- ²Wang, Y. et al. *Lancet* 2020, 395, 1569, doi: 10.1016/S0140-6736(20)31022-9, Erratum in *The Lancet* 2020, 395, 1694
- Warren, T.K. et al. *Nature* 2016, 531, 381
- WHO, *N Engl J Med* 2021, 384, doi: 10.1056/NEJMoa2023184
- de Wit, E. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020, doi: 10.1073/PNAS.1922083117
- Xu, X. et al. *Nucleic Acids Res* 2003, 31, 7117
- Yin, W. et al. *Science* 2020, No. eabc1560
- Zhang, L. und Zhou, R. *J Phys Chem B* 2020, 124, 6955, doi: 10/1021/acs.jpcc.0c04198

JETZT IM HANDEL:

#Anticovidwissen

Arzneistoffe gegen SARS-CoV-2 Targets, Mechanismen, Wirksamkeit

Dr. Christian Asche • Florian Fani

1. Auflage April 2021

Softcover (343 Seiten): 49,97 €

E-Book (PDF): 39,99 €

Lehmanns Media GmbH

www.lehmanns.de

ISBN: 978-3-96543-201-7



Preise inkl. MwSt.

Das Produkt kann von der Abbildung abweichen.

Umschlag: Jasmin Plawicki

Alle Rechte vorbehalten.