

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 9 octobre 2023  
Par Mme BRIER Lucile**

---

**La protéase 3CL du SARS-CoV-2, une cible clé dans le développement de  
thérapies contre la COVID-19.**

---

**Membres du jury :**

**Directeur de thèse / Président :** Docteur Julie CHARTON, Maître de conférences,  
Laboratoire de chimie organique, Université de Lille.

**Assesseur :** Docteur Annie STANDAERT, Docteur en Pharmacie, Maître de conférences,  
Laboratoire de parasitologie et biologie animale, Université de Lille.

**Membre extérieur :** Docteur Alexis Pruvost, Docteur en Pharmacie, Pharmacie Catteau de  
Saint-Martin-Lez-Tatinghem.



**Faculté de Pharmacie de Lille**  
**3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille**  
**03 20 96 40 40**  
**<https://pharmacie.univ-lille.fr>**

### Université de Lille

Président  
Premier Vice-président  
Vice-présidente Formation  
Vice-président Recherche  
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens  
Vice-président Ressources humaines  
Directrice Générale des Services

Régis BORDET  
Etienne PEYRAT  
Christel BEAUCOURT  
Olivier COLOT  
Kathleen O'CONNOR  
Jérôme FONCEL  
Marie-Dominique SAVINA

### UFR3S

Doyen  
Premier Vice-Doyen  
Vice-Doyen Recherche  
Vice-Doyen Finances et Patrimoine  
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires  
Vice-Doyen RH, SI et Qualité  
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie  
Vice-Doyen Territoires-Partenariats  
Vice-Doyenne Vie de Campus  
Vice-Doyen International et Communication  
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX  
Guillaume PENEL  
Éric BOULANGER  
Damien CUNY  
Sébastien D'HARANCY  
Hervé HUBERT  
Caroline LANIER  
Thomas MORGENROTH  
Claire PINÇON  
Vincent SOBANSKI  
Dorian QUINZAIN

### Faculté de Pharmacie

Doyen  
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études  
Assesseur aux Ressources et Personnels  
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement  
Assesseur à la Vie de la Faculté  
Responsable des Services  
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE  
Benjamin BERTIN  
Stéphanie DELBAERE  
Anne GARAT  
Emmanuelle LIPKA  
Cyrille PORTA  
Honoré GUISE

### Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

### Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87

M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

### Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

### Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87

Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26

Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

### Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais



### Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

### Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

### Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

### Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

## Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille

03 20 96 40 40

<https://pharmacie.univ-lille.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



## **Remerciements**

### **A ma présidente de jury et directrice de thèse, le Docteur Julie Charton,**

Après une thèse de Sciences sous ta direction, c'est au tour de la thèse d'exercice. Je te remercie de m'avoir encadrée une nouvelle fois. Merci du temps que tu m'as accordé et tous tes précieux conseils, et ce depuis mon stage de Master 2 au sein du laboratoire.

### **Au Docteur Annie Standaert,**

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de relire ce manuscrit de thèse d'exercice et de juger mon travail. Je suis honorée que vous fassiez partie de mon jury de thèse.

### **Au Docteur Alexis Pruvost,**

Nous nous connaissons depuis maintenant quelques années puisque nous sommes de la même promo. C'est un réel plaisir que tu fasses partie de mon jury de thèse. Je ne pouvais rêver mieux que de boucler la boucle avec toi, futur confrère.

### **A mes anciens collègues de l'U1177,**

Un grand merci pour tout ce que vous m'avez apporté ces dernières années, que ce soit sur le plan personnel ou professionnel. Un merci tout particulier à la team COVID avec laquelle j'ai eu le plaisir de travailler, d'apprendre, d'évoluer et qui m'a motivée à la rédaction de cette thèse d'exercice. Je suis toujours ravie de vous revoir autour d'un verre ou d'un bon petit plat.

### **A mes amis,**

Clara, Caroline et Jean-François, mes très chers amis, merci encore de m'avoir encouragée à ne jamais lâcher et d'être toujours présents. Vous avez toujours été là pour moi dans les bons comme les mauvais moments. J'espère vous le rendre aussi bien car vous le méritez.

### **A ma famille,**

Papa, Maman, Thibault et Arielle, Geoffrey et Linda, et ma très chère Marraine, ça y est je l'ai fait ! Le chemin fut long mais j'ai enfin réussi à arriver au bout. Il est clair que c'est en grande partie grâce à vous. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir été à l'écoute. Je n'aurais pas réussi ce long parcours universitaire sans vous. J'espère vous rendre fiers.

**A Benoît,**

Merci encore de m'avoir supportée pour cette nouvelle thèse ! J'ai de la chance d'être à tes côtés. Merci de m'épauler au quotidien et de me soutenir depuis presque 4 ans maintenant. Promis, c'était la dernière !

**A Eugène,**

Et oui mon petit chat, tu auras été dans les remerciements de mes deux manuscrits. Mais en même temps tu es un soutien émotionnel sans faille alors j'étais bien obligée de te citer ! Tu seras donc couvert de croquettes pour tes bons et loyaux services.

# **Sommaire**

<b>Remerciements.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre I - Les coronavirus.....</b>	<b>20</b>
<b>1. Généralités sur les coronavirus.....</b>	<b>20</b>
1.1. Structure des particules virales des coronavirus .....	20
1.2. Le cycle de réplication virale.....	22
<b>2. Les pandémies liées aux coronavirus .....</b>	<b>23</b>
2.1. SARS-CoV .....	24
2.2. MERS-CoV .....	24
2.3. SARS-CoV-2 .....	25
2.4. Le risque d'émergence de nouveaux coronavirus .....	26
<b>3. Les thérapies anticoronavirales .....</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre II – La protéase 3CL, une cible clé pour lutter contre la COVID-19 et les potentiels coronavirus émergents .....</b>	<b>30</b>
<b>1. Généralités .....</b>	<b>30</b>
1.1. Fonctions.....	30
1.2. Structure .....	32
1.3. Site catalytique.....	33
1.4. Mécanisme catalytique .....	34
<b>2. Intérêt en tant que cible thérapeutique .....</b>	<b>35</b>
2.1. Rôle essentiel dans la réplication des coronavirus .....	35
2.2. Conservation du site catalytique .....	36
2.3. Spécificité de substrat et absence d'homologie .....	38
<b>3. Les inhibiteurs de la protéase 3CL du SARS-CoV-2 .....</b>	<b>40</b>
3.1. Les inhibiteurs peptidomimétiques .....	40
3.2. Les inhibiteurs non peptidomimétiques .....	45
3.2.1. Les molécules naturelles .....	45
3.2.2. Les petites molécules de synthèse .....	46
<b>Chapitre III – Les inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 autorisés sur le marché.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Le nirmatrelvir .....</b>	<b>51</b>
1.1. Données précliniques .....	51
1.1.1. Mode de liaison .....	51
1.1.2. Données pharmacocinétiques.....	53

1.1.3.	Données pharmacodynamiques .....	55
1.2.	Données cliniques .....	58
1.2.1.	Étude de phase 1.....	58
1.2.2.	Étude de phase 2/3 .....	62
1.3.	Autorisation de mise sur le marché .....	63
<b>2.</b>	<b>L'ensitrelvir.....</b>	<b>64</b>
2.1.	Données précliniques .....	64
2.1.1.	Mode de liaison .....	64
2.1.2.	Données pharmacocinétiques.....	65
2.1.3.	Données pharmacodynamiques .....	66
2.2.	Données cliniques .....	71
2.2.1.	Étude de phase 1.....	71
2.2.2.	Étude de phase 2.....	75
2.2.3.	Étude de phase 3.....	80
2.3.	Autorisation de mise sur le marché .....	82
<b>3.</b>	<b>Le simnotrelvir.....</b>	<b>83</b>
3.1.	Données précliniques .....	83
3.2.	Données cliniques .....	83
3.2.1.	Étude de phase 1.....	83
3.2.2.	Étude de phase 1b.....	84
3.2.3.	Étude de phase 2/3 .....	86
3.3.	Autorisation de mise sur le marché .....	87
<b>4.</b>	<b>Limites des traitements.....</b>	<b>87</b>
4.1.	Apparition de résistances .....	87
4.2.	Précautions d'utilisation.....	88
	<b><i>Conclusion et perspectives.....</i></b>	<b><i>89</i></b>
	<b><i>Bibliographie.....</i></b>	<b><i>91</i></b>



## Table des abréviations

Certaines des dénominations sont données sous leur forme anglo-saxonne.

AAP	Autorisation d'Accès Précoce
ACE2	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ADME	Absorption, distribution, métabolisation, élimination
AEM	Agence Européenne du Médicament
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN	Acide ribonucléique
ASMR	Amélioration du Service Médical Rendu
BID	<i>bis in die</i>
CCID <sub>50</sub>	« Cell Culture Infectious Dose 50% »
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CT	Commission de la Transparence
CYP	Cytochrome P450
dNHBE	« Differentiated Normal Human Bronchial Epithelial »
DPP4	Dipeptidyl peptidase-4
E	Protéine de l'enveloppe
EC <sub>50</sub> /EC <sub>90</sub>	Concentration efficace 50% ou 90%
ECG	Electrocardiogramme
ERGIC	Compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique de Golgi
F (%)	Biodisponibilité en %
FDA	« Food and Drug Administration »
FIPV	Coronavirus de la péritonite infectieuse féline
HAS	Haute Autorité de Santé
HCoV	Coronavirus humain
hERG	« human Ether-à-go-go-Related Gene »
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice 50%
IV	Intraveineuse
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition
M	Protéine de la membrane
MERS	Syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MHLW	« Ministry of Health, Labour and Welfare »
N	Protéine de la nucléocapside
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NCT	« National Clinical Trial »
NIID	« National Institute of Infectious Diseases »
NMPA	« National Medical Products Administration »
NOAEL	« No Observable Adverse Effect Level »
nsp	Protéine non-structurale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	« Open Reading Frame »
PO	<i>per os</i>
PDB	« Protein Data Bank »
PFU	« Plate Forming Unit »
PLP	« Papain-like protease »
RBD	« Receptor Binding Domain »
RT-PCR	« Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »
RT-qPCR	« Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction »
S	Protéine de spicule
SARS	Syndrome respiratoire aigu sévère
SD	Ecart-type (« Standard Deviation »)
SIMM	« Shanghai Institute of Materia Medica »
SMR	Service Médical Rendu
TCID <sub>50</sub>	« Tissue Culture Infectious Dose 50% »
TFDA	« Taiwan Food and Drug Administration »
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WIV	« Wuhan Institute of Virology »

## Introduction

Les coronavirus sont une vaste famille de virus à ARN capables d'infecter de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères, dont l'Homme. Au total, sept coronavirus peuvent infecter l'Homme. Parmi eux, les souches HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-OC43 et HCoV-NL63 sont responsables d'infections respiratoires courantes et bénignes. Outre ces quatre espèces endémiques, trois pandémies liées à l'émergence de nouvelles espèces de coronavirus ont eu lieu au cours des vingt dernières années avec tout d'abord l'apparition du SARS-CoV (« Severe Acute Respiratory Syndrome ») en 2002, puis du MERS-CoV (« Middle East Respiratory Syndrome ») en 2012 et enfin du SARS-CoV-2 en décembre 2019. Ces virus hautement pathogènes sont responsables d'infections respiratoires pouvant entraîner un syndrome de détresse respiratoire aiguë engageant le pronostic vital du patient.

L'émergence du SARS-CoV-2 a provoqué une crise sanitaire à l'échelle mondiale. De nombreux efforts ont alors été déployés afin de limiter sa propagation et d'améliorer la prise en charge des patients. Dès la fin de l'année 2020, une campagne de vaccination a débuté. Une forte proportion de la population mondiale est aujourd'hui vaccinée. Également, la prise en charge des patients s'est grandement améliorée avec le développement de différentes thérapies. Ces avancées ont permis de diminuer considérablement l'évolution de la maladie vers des formes graves et les hospitalisations.

Cette thèse d'exercice présentera tout d'abord des généralités concernant les coronavirus et les pandémies liées à ces virus. Ensuite, l'objectif sera de décrire un élément crucial du cycle de réplication viral : la protéase 3CL. Son intérêt en tant que cible thérapeutique pour combattre la COVID-19 mais également les coronavirus émergents sera développé. Enfin, afin d'illustrer son potentiel et son importance dans la lutte contre COVID-19, le développement des trois inhibiteurs de 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 actuellement autorisés sur différents marchés sera présenté. Il s'agit du **nirmatrelvir** (en association au **ritonavir** sous le nom de spécialité PAXLOVID™), de l'**ensitrelvir** (sous forme d'**acide fumarique ensitrelvir** sous le nom de spécialité XOCOVA™) et du **simnotrelvir** (en association au **ritonavir** sous le nom de spécialité XIANNUOXIN™).

# Chapitre I - Les coronavirus

## 1. Généralités sur les coronavirus

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin de 26 à 32 kb<sup>1</sup>. Les virions sont de forme sphérique et ont un diamètre variant de 80 à 220 nm<sup>1</sup>. Les coronavirus font partie de l'ordre des *Nidovirales*, sous-ordre des *Cornidovirineae*, famille des *Coronaviridae* et sous-famille des *Orthocoronavirinae*, elle-même divisée en quatre genres distincts, à savoir les *Alphacoronavirus* ( $\alpha$ CoV), les *Betacoronavirus* ( $\beta$ CoV), les *Gammacoronavirus* ( $\gamma$ CoV) et les *Deltacoronavirus* ( $\delta$ CoV).

Depuis la découverte du premier coronavirus murin en 1949<sup>2</sup>, sept coronavirus humains ont été identifiés avec tout d'abord les souches HCoV-229E<sup>3</sup> et le HCoV-OC43<sup>4</sup> dans les années 1960. L'émergence de nouveaux coronavirus humains s'est alors accélérée depuis les années 2000 avec le SARS-CoV<sup>5,6</sup> en 2003, le HCoV-NL63<sup>7</sup> et HCoV-HKU1<sup>8</sup> en 2004 et 2005, le MERS-CoV<sup>9</sup> en 2012 et enfin le SARS-COV-2<sup>10</sup> en 2019. La figure 1 reprend la chronologie d'apparition des coronavirus humains.

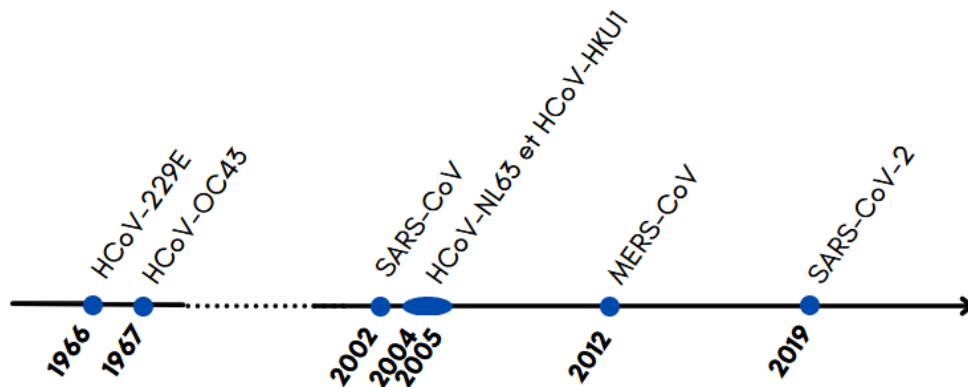


Figure 1 – Chronologie d'apparition des coronavirus humains.

### 1.1. Structure des particules virales des coronavirus

Le terme coronavirus tire son nom de l'apparence des virions sous microscope électronique qui présentent des projections ressemblant à une couronne solaire, correspondant aux protéines de spicule se trouvant à la surface du virion (figure 2)<sup>11</sup>. Le génome des coronavirus est constitué d'un ARN positif simple brin organisé en plusieurs cadres de lecture (ou ORF, « Open Reading Frame »)<sup>1</sup>. Les deux premiers cadres de lecture représentent les deux tiers du génome et codent pour deux longues polyprotéines appelées pp1a et pp1ab. Ces polyprotéines sont les précurseurs de 16 protéines non-structurales (nsp1-nsp16) ayant divers rôles<sup>1,12,13</sup>. Les cadres de lecture présents dans le dernier tiers du génome codent pour les protéines structurales des coronavirus et les protéines accessoires.

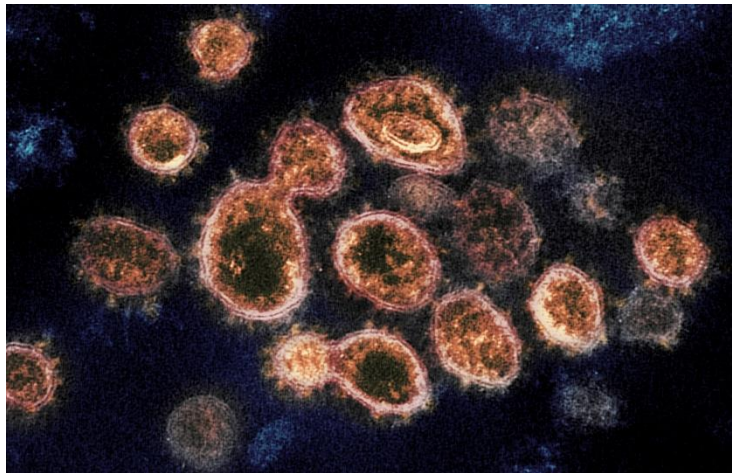


Figure 2 - Image colorisée du SARS-CoV-2 observé par microscopie électronique à transmission (crédit : NIAID-RML)<sup>11</sup>.

Les virions sont constitués de quatre protéines structurales (figure 3), à savoir le spicule (S), l'enveloppe (E), la membrane (M) et la nucléocapside (N)<sup>12,13</sup>. La protéine de spicule est un homotrimère qui permet au virus de se fixer sur le récepteur de la cellule hôte<sup>14,15</sup>. Chaque monomère de cette protéine se compose de deux domaines, S1 et S2, qui sont responsables de la liaison et de la fusion respectivement. Le domaine S1 contient un domaine de liaison au récepteur (ou RBD, « Receptor Binding Domain »), qui donne l'affinité au récepteur de l'hôte. La protéine de la membrane est la plus abondante. Il s'agit d'une petite protéine contenant 3 domaines transmembranaires et permettant de donner la forme du virion<sup>16</sup>. La protéine de l'enveloppe est moins présente que les autres protéines et joue un rôle dans l'assemblage et la libération du virus<sup>17</sup>. Enfin, la protéine de la nucléocapside se lie à l'ARN viral. Elle peut également interagir avec d'autres protéines virales afin d'aider à attacher le génome au complexe de réplication-transcription et empaqueter le génome encapsidé dans les virions<sup>1,18</sup>.

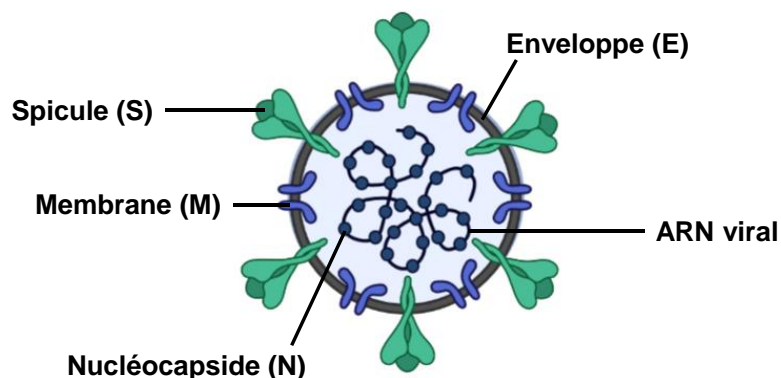


Figure 3 – Schéma d'un coronavirus.

## 1.2. Le cycle de réplication virale

Le cycle de réplication chez les coronavirus se déroule en trois étapes principales : l'entrée, la réplication et la formation et sécrétion de nouveaux virions<sup>1,19-21</sup>. Le cycle commence par l'attachement d'un virion à la surface de la cellule hôte grâce à la liaison de la protéine virale de spicule avec le récepteur de la cellule hôte. Il s'agit par exemple du récepteur ACE2 pour le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 et du récepteur DPP4 pour le MERS-CoV. Une fois que le virus est attaché, il est internalisé dans la cellule hôte par endocytose et peut alors libérer son ARN génomique dans le cytosol grâce à la fusion des membranes virales et cellulaires.

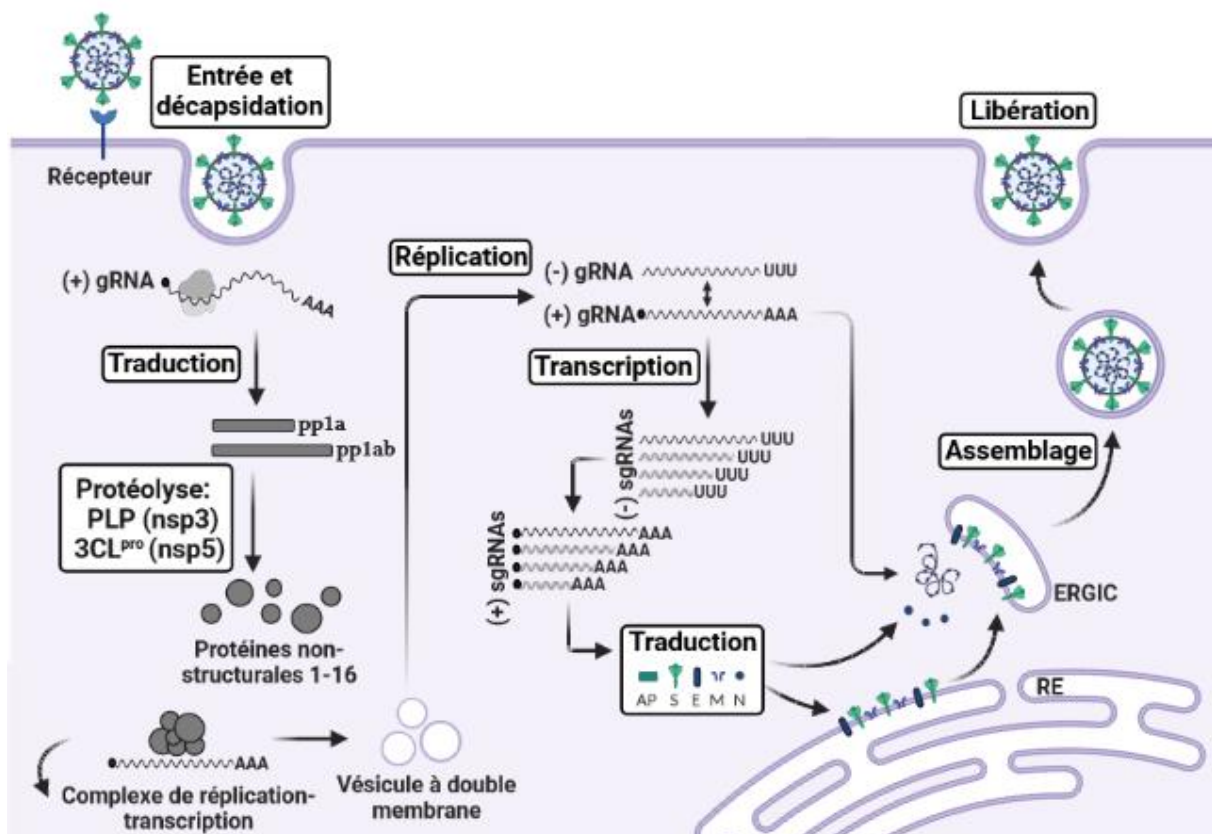


Figure 4 – Cycle de réplication virale chez les coronavirus.

Le génome viral est ensuite traduit en deux longues polyprotéines, pp1a et pp1ab. Leur clivage protéolytique est réalisé par deux protéases virales internes permettant d'obtenir 16 protéines non-structurales. La première protéase correspond à la nsp3 ou papain-like protease (PLP). Elle réalise les clivages afin de libérer les trois premières protéines non-structurales (nsp1 à nsp3). La seconde protéase correspond à la nsp5 ou protéase 3CL (3CL<sup>pro</sup> ou M<sup>pro</sup>). Elle est responsable des clivages restants, afin d'obtenir les protéines non-structurales 4 à 16.

Ces protéines non-structurales vont ensuite s'assembler afin de former le complexe de réplication-transcription. Ce dernier permet de répliquer l'ARN génomique viral (gRNA) mais également d'obtenir des ARNs sous-génomiques (sgRNA) qui sont alors traduits en protéines structurales et protéines accessoires. Une fois traduites, les protéines accessoires, E, M et S sont adressées au réticulum endoplasmique puis transportées vers le lieu d'assemblage des virions, le compartiment ERGIC. La protéine N est quant à elle sécrétée dans le cytosol et permet d'encapsuler l'ARN génomique viral. Cet ARN encapsulé, une fois au contact du compartiment ERGIC, va pouvoir former un nouveau virion grâce à la présence des protéines structurales virales présentes à sa surface.

Une fois que les nouveaux virions ont été assemblés, ils sont libérés de la cellule hôte par exocytose. Ces nouvelles particules virales peuvent alors infecter d'autres cellules hôtes et continuer ainsi leur réplication.

## 2. Les pandémies liées aux coronavirus

En 20 ans, le monde a connu 3 pandémies liées à l'émergence de trois nouvelles espèces de coronavirus. Lors de ces infections, les patients présentent initialement de la fièvre, des douleurs musculaires, de la toux, des difficultés respiratoires, des frissons, de la diarrhée, des vomissements, des nausées, des douleurs thoraciques, des maux de tête, des maux de gorge et un écoulement nasal<sup>22-25</sup>. Cependant, certains patients peuvent développer des formes graves de la maladie capables d'engager le pronostic vital, avec notamment le risque de développer un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Le tableau 1 résume les informations générales relatives aux trois pandémies liées aux coronavirus<sup>26-30</sup>.

	<b>SARS-CoV</b>	<b>MERS-CoV</b>	<b>SARS-CoV-2</b>
<b>Genre</b>	Betacoronavirus		
<b>Réservoir</b>	Chauve-souris		
<b>Hôte intermédiaire</b>	Civette	Dromadaire	Incertain
<b>Origine</b>	Guandpong, Chine	Péninsule arabique	Wuhan, Chine
<b>Nombre de pays</b>	29	27	216
<b>Nombre de cas</b>	8096	2605	770 437 327
<b>Nombre de décès</b>	774	936	6 956 900
<b>Période</b>	2002 - 2003	2012 - maintenant	2019 - maintenant

Tableau 1 – Caractéristiques et données épidémiologiques des pandémies liées aux coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV et SARS-CoV-2 (données issues de rapports l'OMS datant de 2003, de juillet 2023 et du 1<sup>er</sup> septembre 2023 respectivement)<sup>26-30</sup>.

## **2.1. SARS-CoV**

En novembre 2002, le SARS-CoV a émergé dans la province de Guangdong, située dans le sud de la Chine<sup>5,6,31,32</sup>. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, ce virus s'est rapidement propagé dans plusieurs pays d'Asie, d'Amérique du Nord et d'Europe au cours des mois suivants. Au total, 8096 cas ont été signalés, entraînant 774 décès, ce qui représente un taux de mortalité de 9%<sup>28</sup>. Cette pandémie a pu être rapidement maîtrisée puisqu'en juillet 2003, elle a été déclarée comme étant terminée.

Ce virus aurait une origine zoonotique avec comme hôte intermédiaire la civette palmiste à masque et comme réservoir la chauve-souris<sup>33</sup>. Le SARS-CoV se propage par voie aérienne par le biais des gouttelettes salivaires et peut également se transmettre indirectement par contact avec des surfaces touchées par une personne infectée.

Après une incubation allant de 2 à 11 jours, les patients atteints du SARS-CoV présentaient des symptômes tels que de la fièvre, des douleurs musculaires, une sensation de malaise, des maux de tête et des frissons. Environ 30 à 40% des patients ont également rapporté une diarrhée pendant la phase fébrile. Des symptômes respiratoires pouvaient apparaître après 3 à 7 jours, notamment une toux sèche non-productive, une dyspnée (parfois associée à une hypoxémie), voire une évolution vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Chez 10 à 20% des patients, une intubation ou une ventilation mécanique était nécessaire. Certains cas ont également présenté d'autres symptômes comme des infections du tractus gastro-intestinal, des reins, du cerveau ou du foie.

## **2.2. MERS-CoV**

En 2012, le virus du MERS-CoV a été découvert à Jeddah, en Arabie Saoudite, après avoir été isolé des poumons d'un patient de 60 ans décédé des suites d'une maladie respiratoire<sup>9</sup>. En comparaison au SARS-CoV, ce virus est moins contagieux et se propage donc moins rapidement. Néanmoins, il n'a pas encore été éradiqué et s'avère être très virulent. Le dernier rapport de l'OMS datant de juillet 2023 fait état de 2605 cas et 936 décès, soit un taux de mortalité d'environ 35%<sup>29</sup>.

Ce virus est également d'origine zoonotique, contracté par contact direct ou indirect avec des dromadaires infectés, qui sont les hôtes intermédiaires de ce virus<sup>34-36</sup>. Son origine précise n'est pas établie avec certitude, mais il proviendrait également des chauves-souris. La transmission d'humain à humain est possible mais peu fréquente,



se produisant principalement lorsque plusieurs membres de la famille du malade vivent sous le même toit ou dans des environnements hospitaliers.

Les personnes atteintes du MERS-CoV présentent des manifestations cliniques variées, allant d'une forme asymptomatique à une pneumonie sévère, entraînant une détresse respiratoire aiguë, un choc septique et une insuffisance rénale pouvant conduire au décès du patient. Après une période d'incubation de 2 à 13 jours, la maladie débute généralement par de la fièvre, des frissons, de la toux, des maux de gorge, des douleurs musculaires et articulaires, puis elle évolue rapidement vers une dyspnée et une pneumonie. Environ un tiers des patients ont également rapporté des symptômes gastro-intestinaux tels que de la diarrhée et des vomissements.

### **2.3. SARS-CoV-2**

En décembre 2019, le SARS-CoV-2 est apparu à Wuhan en Chine avant de rapidement se propager à travers le monde<sup>10,37-40</sup>. Au 1<sup>er</sup> septembre, l'OMS dénombre plus de 770 millions de cas et plus de 6,9 millions de décès. Son origine exacte n'est à ce jour pas certaine. L'hôte intermédiaire serait le pangolin et le réservoir serait la chauve-souris<sup>30</sup>. Comme pour le SARS-CoV, la transmission du SARS-CoV-2 se fait par les particules libérées par une personne malade lors des éternuements, de la toux et de la respiration.

Dans la majeure partie des cas, les personnes infectées développent des formes asymptomatiques, légères ou modérées de la maladie, ne nécessitant pas de traitement spécifique. Les symptômes les plus fréquents incluent la fièvre, la fatigue, la toux, les douleurs musculaires, ainsi qu'une perte du goût et de l'odorat. D'autres patients peuvent également présenter des maux de tête, des maux de gorge, et de la diarrhée. Comme lors des précédentes pandémies liées aux coronavirus, certains malades peuvent évoluer vers des formes graves de la maladie, notamment un syndrome de détresse respiratoire aiguë mettant en jeu le pronostic vital. D'autres complications ont également été identifiées comme une insuffisance cardiaque, une insuffisance rénale aiguë, une dysfonction hépatique, des problèmes de coagulation ou encore des maladies thrombotiques.

L'infection entraîne une augmentation des niveaux de cytokines et des marqueurs inflammatoires. La réponse immunitaire est perturbée, provoquant une libération intense de cytokines appelée "tempête cytokinique" qui peut entraîner des complications graves, principalement chez les personnes âgées ou ayant des comorbidités<sup>41</sup>.

## 2.4. Le risque d'émergence de nouveaux coronavirus

Depuis 1966, 7 coronavirus capables d'infecter l'Homme ont été identifiés, dont 3 d'entre eux ont conduit à des pandémies au cours des vingt dernières années. Les virus à ARN, tels que les coronavirus, sont la classe d'agents pathogènes la plus courante parmi les nouvelles causes de maladies humaines<sup>42</sup>.

Les coronavirus ont le génome le plus long parmi les virus à ARN positifs ce qui leur confère un risque accru d'erreurs de réplication avec des phénomènes d'insertions, de délétions ou de substitutions de nucléotides<sup>43,44</sup>. Néanmoins, le SARS-CoV-2 présente un taux de mutation modéré en comparaison à d'autres virus à ARN comme le Virus de l'Hépatite C (VHC) ou le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), et ce grâce à la présence d'une exonucléase permettant de corriger les erreurs de réplication<sup>45</sup>. Outre les mutations, des phénomènes de recombinaisons génétiques peuvent également avoir lieu. Un vaste réservoir de coronavirus se trouve dans la faune sauvage, incluant de nombreuses espèces animales et créant ainsi ces opportunités de recombinaisons génétiques<sup>43,46</sup>. C'est notamment le cas des chauves-souris, qui constituent le réservoir le plus important des *alphacoronavirus* et *betacoronavirus*<sup>47</sup>, incluant notamment le SARS-CoV, le MERS-CoV et le SARS-CoV-2<sup>46</sup>.

Ces événements biologiques de mutation et recombinaison génétique peuvent offrir le potentiel aux coronavirus d'acquérir de nouvelles caractéristiques, comme la capacité à infecter de nouveaux types cellulaires, y compris ceux d'espèces différentes. Cela représente un risque non-négligeable de variations intra-espèces, de saut inter-espèces, et d'émergence de nouveaux coronavirus pouvant entraîner de nouvelles épidémies ou pandémies. Ces propriétés leur confèrent également la possibilité d'échapper à l'immunité induite par les vaccins et de résister aux traitements<sup>44</sup>.

## 3. Les thérapies anticoronavirales

Avec l'émergence du SARS-CoV et du MERS-CoV, le monde de la recherche s'est intéressé au développement de thérapies anticoronavirales. Néanmoins, la pandémie de SARS-CoV s'étant résolue spontanément en 2003 et le MERS-CoV touchant peu d'individus depuis son apparition en 2012, cet intérêt est resté relativement faible. Du fait de l'absence de traitement antiviral et de vaccin au début de la pandémie de COVID-19, la prise en charge des patients, très nombreux en comparaison aux précédentes pandémies, a été particulièrement difficile.

Depuis, cette prise en charge s'est nettement améliorée et des vaccins ont été élaborés, permettant une diminution des formes graves et du nombre de décès<sup>48-50</sup>. Sur la base de la physiopathologie de la maladie, des traitements symptomatiques ont tout d'abord été utilisés comme l'oxygénothérapie et la ventilation assistée<sup>51,52</sup>. La réponse inflammatoire excessive observée chez certains patients hospitalisés a conduit à l'utilisation de corticostéroïdes<sup>53</sup> et également d'immunosuppresseurs tels que le **tocilizumab** (ROACTEMRA™)<sup>54</sup>, antagoniste des récepteurs de l'interleukine-6 et l'**anakinra** (KINERET™)<sup>55</sup>, inhibiteur des récepteurs à l'interleukine-1. Concernant les antiviraux, des molécules non spécifiques du SARS-CoV-2 se sont montrées efficaces (**remdesevir**, **molnupiravir**)<sup>56,57</sup>. De nombreuses recherches ont également été menées, et le sont encore à l'heure actuelle, dans le but de développer des antiviraux spécifiques du SARS-CoV-2 ou à large spectre contre les coronavirus. Des anticorps monoclonaux ciblant la protéine de spicule ont été conçus et ont reçu une autorisation de mise sur le marché par l'Agence Européenne du Médicament (AEM). Il s'agit du **sotrovimab** (XEVDY™), du **regdanvimab** (REGKIRONA™), de l'association **tixagevimab/cilgavimab** (EVUSHELD™) et de l'association **casirivimab/imdevimab** (RONAPREVE™)<sup>58-61</sup>. Des médicaments antiviraux de type « petites molécules » ont également vu le jour avec premièrement le **nirmatrelvir** (associé au **ritonavir** dans la spécialité PAXLOVID™) développé par Pfizer et autorisé entre autres en Europe et aux Etats-Unis. Ensuite, l'**ensitrelvir** (sous forme d'**acide fumarique d'ensitrelvir** dans la spécialité XOCOVA™) a été développé par la société Shionogi et est à ce jour autorisé au Japon et à Taiwan. Enfin, le **simnotrelvir** (associé au **ritonavir** dans la spécialité XIANNUOXIN™) est une molécule autorisée en Chine et qui a été développée par l'entreprise Simcere Pharmaceutical. Le tableau 2 reprend les médicaments ayant reçu une autorisation par l'Agence Européenne du Médicament et indiqués dans le traitement de la COVID-19.

Le **nirmatrelvir**, l'**ensitrelvir** et le **simnotrelvir** sont trois inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2. Cette protéase est étudiée en tant que cible thérapeutique depuis la première pandémie de SARS-CoV puisqu'elle est indispensable à la réplication virale chez les coronavirus. Également, elle montre une bonne conservation chez les coronavirus, et ne présente pas d'homologue chez l'Homme, la rendant très attractive pour le développement de thérapies anticoronavirales.

<b><u>Inhibiteurs de l'ARN polymérase ARN-dépendante :</u></b>	
<b>Molnupiravir</b> (LAGEVRIO™)	En traitement chez les adultes non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. Avis positif d'accès précoce par l'AEM, mais avis final négatif d'AMM le 23/02/2023. Autorisation d'accès précoce refusée par la HAS.
<b>Remdesevir</b> (VEKLURY™)	En traitement chez les adultes et les enfants* présentant une pneumonie et nécessitant une supplémentation en oxygène (non invasive) ou non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. AMM européenne accordée depuis le 08/08/2022.
<b><u>Inhibiteur de la protéase 3CL :</u></b>	
<b>Nirmatrelvir/Ritonavir</b> (PAXLOVID™)	En traitement chez les adultes non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. AMM européenne accordée depuis le 28/01/2022.
<b><u>Anticorps monoclonaux antiviraux :</u></b>	
<b>Regdanvimab</b> (REGKIRONA™)	En traitement chez les adultes non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. AMM européenne accordée le 12/11/2021. Non disponible en France.
<b>Sotrovimab</b> (XEVDY™)	En traitement chez les adultes et les adolescents** non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. AMM européenne accordée depuis le 17/12/2021.
<b>Tixagevimab/Cilgavimab</b> (EVUSHELD™)	En prophylaxie préexposition chez les adultes et les adolescents** ayant un déficit d'immunité, répondant peu ou pas à la vaccination et à risque de développer une forme sévère. En traitement chez les adultes et les adolescents** non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. AMM européenne accordée depuis le 25/03/2022.
<b>Casirivimab/Imdevimab</b> (RONAPREVE™)	En traitement chez les adultes et les adolescents** non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère. AMM européenne accordée depuis le 12/11/2021.

<b>Etesevimab/Bamlanivimab</b>	<p>En traitement chez les adultes et les adolescents** non supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère.</p> <p>L'AEM a fourni des conseils d'utilisation en mars 2021 mais aucune AMM n'a été délivrée car la compagnie a retiré son dossier pour l'obtention d'une AMM européenne le 02/11/2021. La France avait accordé une autorisation temporaire d'utilisation du 08/03/2021 au 31/12/2021, date d'arrêt de la commercialisation.</p>
<b><u>Inhibiteurs d'interleukines :</u></b>	
<b>Anakinra</b> (KINERET™)	<p>En traitement chez les adultes supplémentés en oxygène et à risque de développer une forme sévère.</p> <p>AMM européenne pour l'indication COVID-19 accordée depuis le 17/12/2021.</p>
<b>Tocilizumab</b> (ROACTEMRA™)	<p>En traitement chez les adultes recevant une corticothérapie et nécessitant une supplémentation en oxygène ou une ventilation mécanique.</p> <p>AMM européenne pour l'indication COVID-19 accordée le 07/12/2021.</p>
<b><u>Corticoïdes :</u></b>	
<b>Dexaméthasone</b>	<p>En traitement chez les adultes et les adolescents** nécessitant une supplémentation en oxygène ou une ventilation mécanique.</p> <p>Approbation de l'utilisation pour l'indication COVID-19 accordée par l'AEM le 18/09/2020.</p>

Tableau 2 – Liste des médicaments utilisés dans le traitement de la COVID-19 et ayant reçu une autorisation par l'Agence Européenne du Médicament.

Chaque médicament est présenté au sein de sa classe thérapeutique avec sa dénomination commune internationale, sa spécialité, son indication et les informations relatives à son autorisation de mise sur le marché européen.

\*Enfant : plus de 4 semaines et pesant plus de 3 kg.

\*\*Adolescent : plus de 12 ans et pesant plus de 40 kg.

## **Chapitre II – La protéase 3CL, une cible clé pour lutter contre la COVID-19 et les potentiels coronavirus émergents**

### **1. Généralités**

La protéase 3CL est également nommée 3CL<sup>pro</sup> pour « 3C-like protease » du fait de sa ressemblance avec la protéase picornaine 3C des virus de la famille des *Picornaviridae* ou « 3-chymotrypsin-like protease » pour ses similitudes avec la chymotrypsine, une enzyme pancréatique. Il est également possible de la retrouver sous l'abréviation M<sup>pro</sup> qui signifie « main protease », en raison de son rôle crucial dans la réplication virale. Enfin, cette protéase est également dénommée nsp5 car il s'agit de la cinquième protéine non-structurale issue des polyprotéines pp1a et pp1ab.

#### **1.1. Fonctions**

La fonction principale de la protéase 3CL des coronavirus est de cliver les polyprotéines pp1a et pp1ab afin d'obtenir une partie des protéines non-structurales essentielles à la formation du complexe de réplication-transcription. Son action protéolytique est donc nécessaire au cycle de réplication virale (figure 4). Elle réalise au total 11 clivages afin de libérer les protéines non-structurales 4 à 16 comme illustré figure 5<sup>62,63</sup>. La PLP, deuxième protéase virale, réalise quant à elle les 3 premiers clivages afin de libérer les 3 premières protéines non-structurales.

Les protéases virales peuvent également jouer un rôle dans la pathogénicité en réalisant des clivages de protéines de l'hôte. Dans le cas de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2, le répertoire de substrats humains, ou dégradome<sup>64</sup>, reste peu étudié. Quelques travaux de recherche ont été publiés à ce sujet<sup>65-67</sup>.

Une première équipe de chercheurs a notamment démontré que la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 est capable de dégrader la protéine galectine-8 (Gal8), ce qui contribue à un échappement de la réponse immunitaire<sup>65</sup>. Présente du côté intracellulaire, la galectine-8 se lie aux glycanes et cible les vésicules endommagées ou contenant des pathogènes. Elle recrute ensuite le récepteur NDP52, responsable du processus de xénophagie<sup>68</sup>. En cas d'infection au SARS-CoV-2, la galectine-8 serait capable de détecter l'infection par reconnaissance de la protéine de spicule, une protéine fortement glycosylée se situant au niveau des endosomes contenant les virions. Il a été montré que la galectine-8 peut se lier à la protéine de spicule, et que cette liaison n'a plus lieu en présence de 3CL<sup>pro</sup><sup>65</sup>. De plus, le clivage de la galectine-8 par la 3CL<sup>pro</sup>

du SARS-CoV-2 entraîne la perte de sa capacité à recruter le récepteur NDP52, ce qui pourrait permettre au virus d'échapper à la xénophagie.

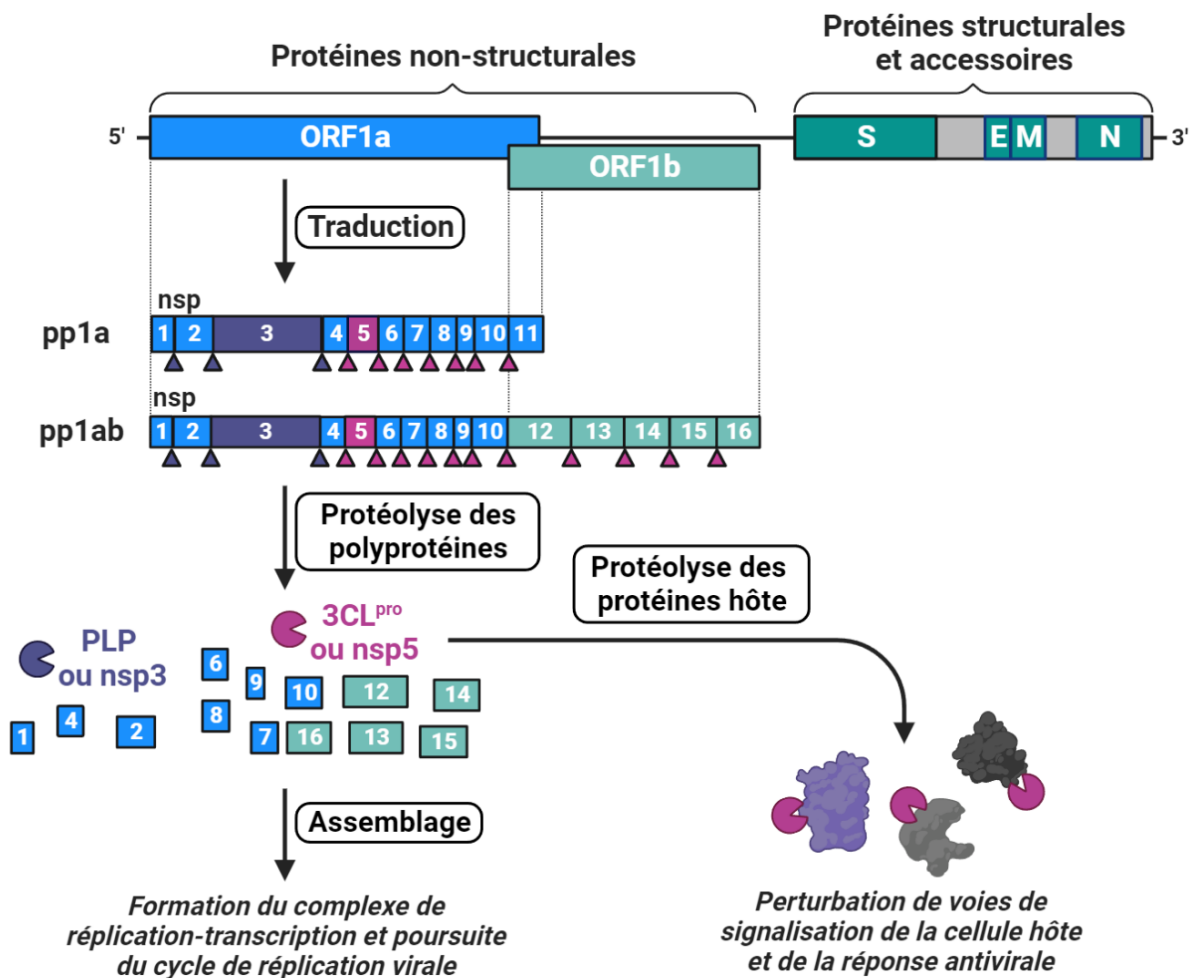


Figure 5 – Processus de protéolyse des polyprotéines par la 3CL<sup>pro</sup> et la PLP du SARS-CoV-2.

Les deux premiers tiers du génome comportent les cadres de lecture ORF1a et ORF1b codant pour deux polyprotéines pp1a et pp1ab. Le dernier tiers contient les gènes codant pour les protéines structurales et accessoires. Après traduction, les deux polyprotéines sont obtenues. Elles sont ensuite protéolysées par la PLP et la 3CL<sup>pro</sup> afin d'obtenir les protéines non-structurales 1 à 3 et 4 à 16 respectivement. Les sites de clivage sont indiqués par des triangles colorés en fonction de la protéase responsable du clivage. Les protéines non-structurales libérées vont alors s'assembler afin de former le complexe de réplication-transcription. La 3CL<sup>pro</sup> est également capable de cliver des protéines cellulaires de l'hôte impliquées dans la réponse antivirale et des voies de signalisation cellulaire.

Une seconde équipe de chercheurs a identifié deux autres protéines clivées par la protéase 3CL du SARS-CoV-2 : NLRP12 et TAB1<sup>69</sup>. Ces protéines jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire et l'immunité innée. La protéine TAB1 fait partie d'un complexe qui régule l'activité de la kinase TAK1, pouvant activer la voie NFκB impliquée dans l'apoptose, la croissance cellulaire et la réponse inflammatoire. Le fonctionnement de la protéine NLRP12 n'est quant à lui pas encore entièrement compris, mais cette protéine est impliquée dans la régulation de la voie NFκB, l'activation de l'inflammasome et elle est connue pour réguler négativement la production de cytokines pro-inflammatoires<sup>70,71</sup>. Le clivage de la protéine NLRP12 par

la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 pourrait ainsi expliquer l'hyper-inflammation observée dans les formes graves de la COVID-19<sup>69</sup>.

Les résultats de ces recherches mettent en évidence la capacité de la protéase 3CL du SARS-CoV-2, et possiblement des coronavirus en général, à agir sur des voies de signalisation impliquées dans l'immunité et la réponse inflammatoire. Le développement d'inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 pourrait donc entraver la réplication virale mais également rétablir certains mécanismes de défense cellulaire contre les virus susceptibles d'être altérés par cette protéase.

## 1.2. Structure

La 3CL<sup>pro</sup> est une protéase à cystéine d'environ 30 kDa qui est catalytiquement active sous forme d'homodimère<sup>72-74</sup>. Chaque monomère est constitué de 3 domaines : I, II et III<sup>75-77</sup>. Les domaines I et II sont constitués de tonneaux bêta antiparallèles, et le domaine III, appelé également domaine C-terminal, est composé de 5 hélices alpha. Le domaine III joue un rôle dans la dimérisation et donc l'obtention de la forme active de la protéase<sup>78</sup>. La liaison entre les domaines II et III est assurée par une longue boucle. En position N-terminale se trouve un élément appelé « N-finger » jouant également un rôle crucial dans la dimérisation de la protéase<sup>74,79</sup>. Le site actif de la protéase est situé à l'interface entre les domaines I et II. Il contient notamment la dyade catalytique cystéine/histidine, la cystéine se situant sur le domaine II et l'histidine sur le domaine I. Dans le cas de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2, les résidus de cette dyade sont la cystéine 145 et l'histidine 41. La figure 6 représente les différents éléments structurels de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 sous forme de dimère à partir d'une structure radiocristallographique (PDB : 6Y2E)<sup>80</sup>.



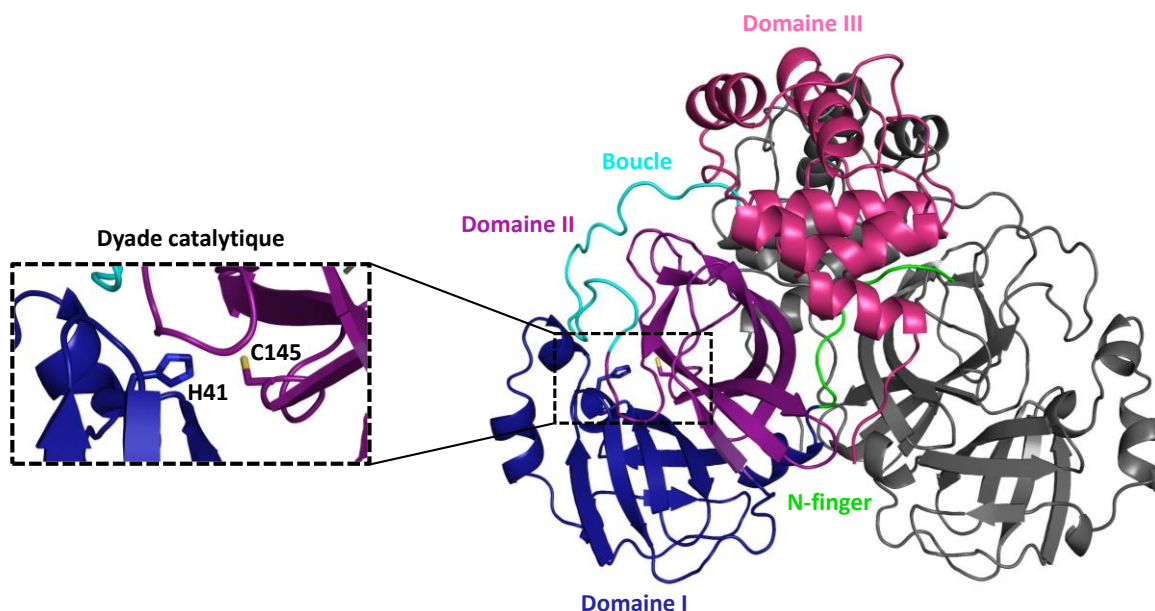


Figure 6 – Structure radiocristallographique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2.

L'homodimère est représenté sous forme de cartoon avec un monomère noir et le second dont la structure est détaillée comme suit : domaine I (résidus 10-96) en bleu foncé, domaine II (résidus 102-180) en violet, domaine III (résidus 200-303) en rose, N-finger (résidus 1-7) en vert et la boucle reliant les domaines II et III (résidus 181-199) en cyan. Sur ce monomère est également représentée la dyade catalytique Cys145-His41 avec les chaînes latérales en stick.

Figure générée avec le logiciel PyMol (Schrodinger LLC), PDB : 6Y2E<sup>80</sup>.

### 1.3. Site catalytique

Le site catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 est formé de 5 poches appelées S1', S1, S2, S3 et S4 comme représenté figure 7-1. La poche S1' est peu profonde et comporte la dyade catalytique ainsi que les résidus Thr25, Leu27 et His164. La poche S1 est profonde et formée avec les résidus Phe140, Leu141, Asn142, Gly143 et Ser144 d'une part et les résidus Tyr161, His163, Met165, Glu166 et His172 d'autre part. La poche S2 est profonde, flexible et hydrophobe, elle peut accueillir des groupements encombrés. Elle est proche du résidu His41 de la dyade catalytique et se compose des résidus Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50, Asp187, Gln189, Tyr54 et Met165. La poche S3 se situe en surface au niveau des résidus Glu166 et Met165. Elle s'accommode de groupements de nature et taille variées, comme la poche S1'. Pour finir, la poche S4 est hydrophobe et se compose des acides aminés Gln189, Thr190, Ala191, Gln192, Met165, Leu167 et Phe185. La figure 7-2 représente les acides aminés les plus importants du site catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2, c'est-à-dire les résidus impliqués dans la liaison du substrat et des inhibiteurs de type peptidomimétiques.

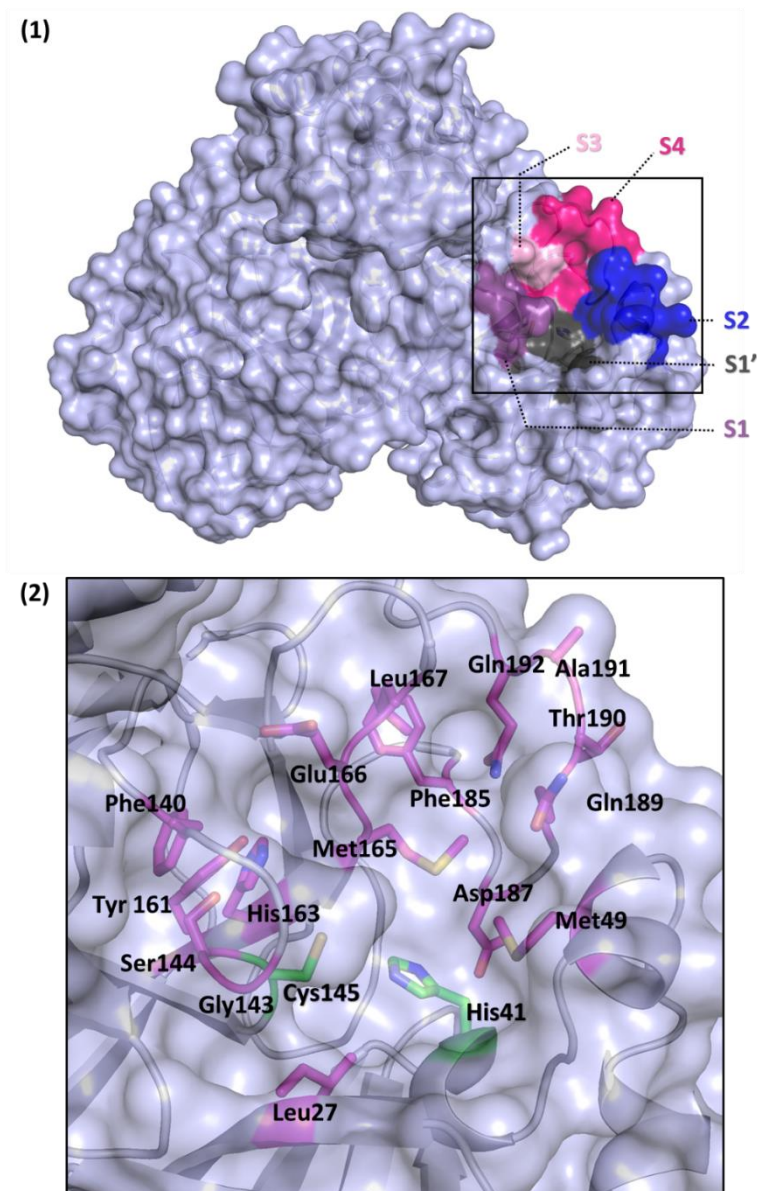


Figure 7 – Structure radiocristallographique du site catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2.

(1) Représentation de la surface de la protéase sous forme d'homodimère. Chaque poche (S1' à S4) est identifiée par une couleur et les chaînes latérales de la dyade catalytique sont sous forme de stick.

(2) Zoom sur le site catalytique d'un monomère de la protéase sous forme de cartoon avec la surface en transparence. Les résidus principaux du site catalytique sont indiqués en rose avec leur chaîne latérale en stick, et en vert pour les résidus de la dyade catalytique.

Figure générée avec le logiciel PyMol (Schrodinger LLC), PDB : 6Y2E<sup>80</sup>.

#### 1.4. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> est illustré figure 8. Il fait intervenir la dyade catalytique Cys-His et une molécule d'eau<sup>76,77,85</sup>. Tout d'abord, l'histidine déprotone le thiol de la cystéine catalytique. Le thiolate formé réalise ensuite une attaque nucléophile au niveau de la fonction amide du substrat. Un réarrangement permet ensuite d'obtenir un thioester et de libérer la partie C-terminale du substrat. Enfin, l'hydrolyse du thioester formé est facilitée par une molécule d'eau. La partie N-

terminale du substrat est alors libérée et la fonction thiol de la cystéine catalytique est restaurée.

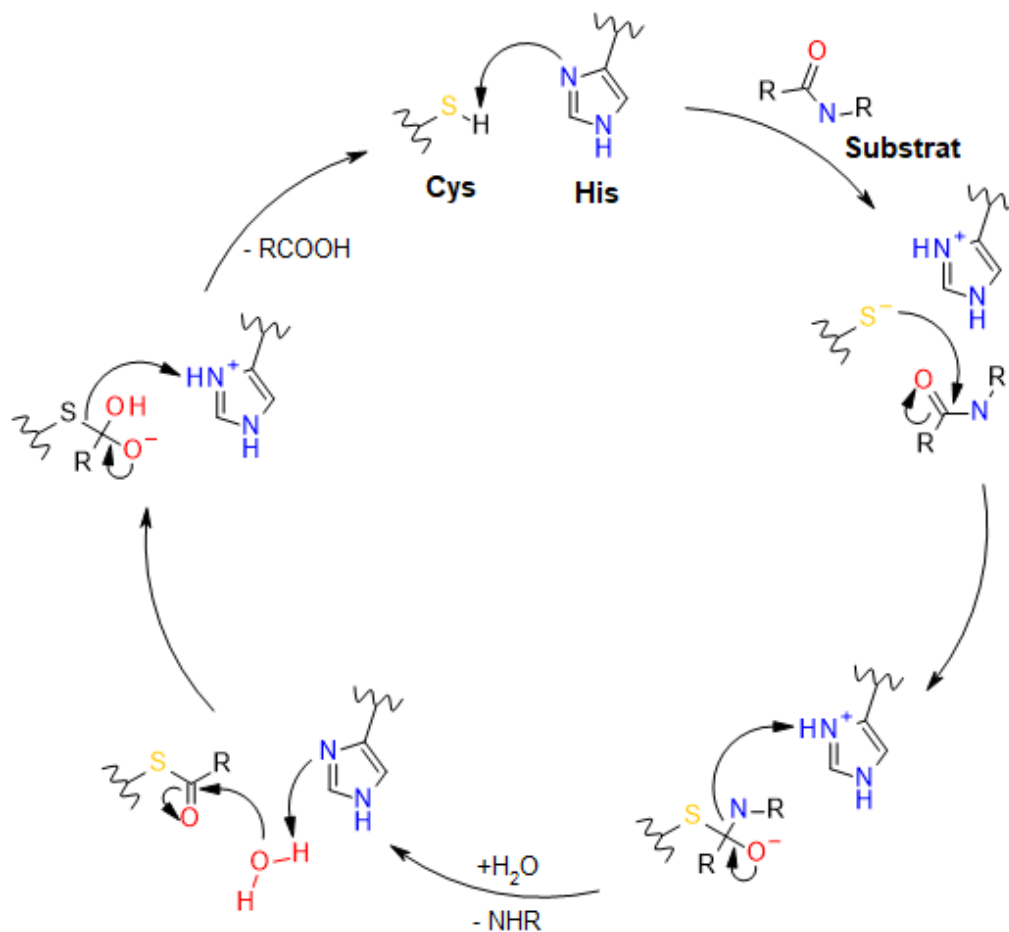


Figure 8 – Schéma général du mécanisme catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> des coronavirus.

## 2. Intérêt en tant que cible thérapeutique

### 2.1. Rôle essentiel dans la réplication des coronavirus

La protéase 3CL du SARS-CoV-2 est une cible de choix principalement en raison de son rôle crucial dans la réplication virale. Les clivages qu'elle réalise au niveau des polyprotéines virales pp1a et pp1ab permettent d'obtenir les protéines non-structurales essentielles à la production de nouveaux virions. En inhibant l'activité de la 3CL<sup>pro</sup>, le clivage des polyprotéines est empêché et la réplication virale est alors enrayerée.

De plus, son attractivité est renforcée par son implication probable dans la pathogénicité. Elle serait également capable de cliver des protéines cellulaires de l'hôte jouant un rôle dans la réponse inflammatoire et dans l'immunité. En plus de bloquer la réplication virale, inhiber cette protéase pourrait donc restaurer certains mécanismes de défense cellulaires.

## 2.2. Conservation du site catalytique

L'un des points forts de cette cible réside son grand degré de conservation entre les différents coronavirus. La protéase 3CL dans son ensemble est bien conservée, comme illustré figure 9. On peut voir que les pourcentages d'identité et de similarité sont élevés entre les 7 coronavirus humains (figure 9-1), en particulier entre le SARS-CoV et le SARS-CoV-2. Les protéases 3CL de ces deux espèces montrent une identité de 96,1% et une similarité de 99,7%. La superposition des structures tridimensionnelles illustre également cette conservation (figure 9-2)<sup>80,86-90</sup>.

(1)

3CL <sup>pro</sup>	SARS-CoV	MERS-CoV	HCoV-229E	HCoV-NL63	HCoV-HKU1	HCoV-OC43
SARS-CoV-2	96,1% 99,7%	50,6% 79,0%	41,0% 73,0%	44,3% 73,3%	49,2% 74,9%	48,4% 75,8%
SARS-CoV		51,6% 78,7%	40,4% 72,0%	43,6% 73,0%	48,5% 75,2%	48,7% 75,8%
MERS-CoV			49,0% 75,5%	48,5% 75,6%	54,8% 77,6%	52,3% 76,1%
HCoV-229E				70,6% 88,8%	45,0% 74,0%	43,6% 73,3%
HCoV-NL63					43,2% 61,1%	42,8% 73,4%
HCoV-HKU1						82,3% 95,3%

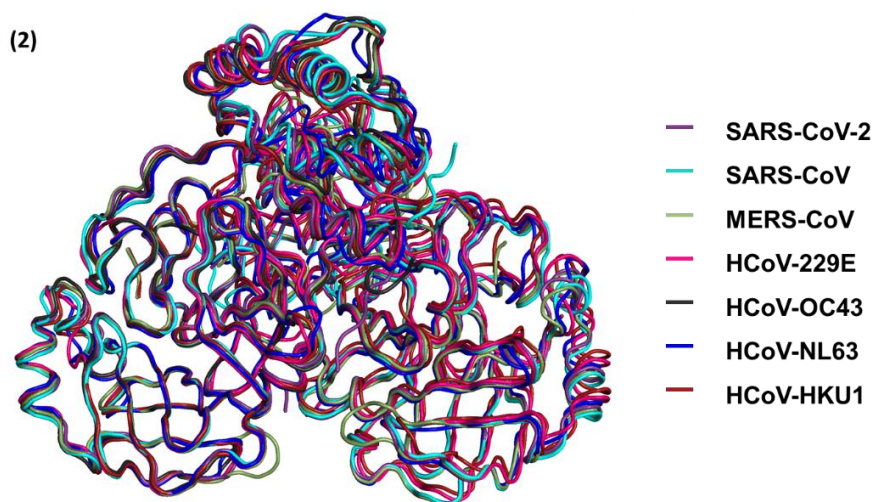


Figure 9 – Conservation de la protéase 3CL entre les 7 coronavirus humains<sup>80,86-90</sup>.

(1) Pourcentages d'identité (en bleu foncé) et de similarité (en bleu clair) des séquences de la 3CL<sup>pro</sup> des 7 espèces de coronavirus humains. Les calculs ont été réalisés avec LALIGN (EMBL-EBI).

(2) Superposition des structures tridimensionnelles de la protéase 3CL. La figure a été générée avec le logiciel PyMol (Schrodinger LLC).

Les calculs et les alignements ont été réalisés à partir des séquences et structures radiocristallographiques de la 3CL<sup>pro</sup> ci-après : SARS-CoV-2 (PDB : 6Y2E), SARS-CoV (PDB : 2GZ9), MERS-CoV (PDB : 4RSP), HCoV-229E (PDB : 2ZU2), HCoV-NL63 (PDB : 3TLO) et HCoV-HKU1 (PDB : 3D23). La séquence et la structure de la 3CL<sup>pro</sup> du HCoV-OC43 provient d'un modèle et seul un monomère est représenté (PMDB : PM0079872).



Par ailleurs, cette cible est étudiée depuis la première pandémie liée aux coronavirus, et l'est d'autant plus depuis l'apparition de la COVID-19. La grande majorité des inhibiteurs actuellement décrits dans la littérature, ainsi que les inhibiteurs disponibles sur le marché, inhibent la protéase 3CL au niveau de son site catalytique. Il s'agit d'une partie très conservée de la protéase entre les coronavirus puisque les acides aminés clés des 5 poches du site catalytique sont pour la plupart conservés. La figure 10 illustre cette conservation en représentant les sites catalytiques du SARS-CoV-2<sup>80</sup>, du MERS-CoV<sup>88</sup> et du SARS-CoV<sup>89</sup>. Cette conservation est également vraie chez d'autres espèces, comme entre autre le HCoV-229E, le HCoV-HKU1 ou encore le HCoV-NL63<sup>86,87</sup>.

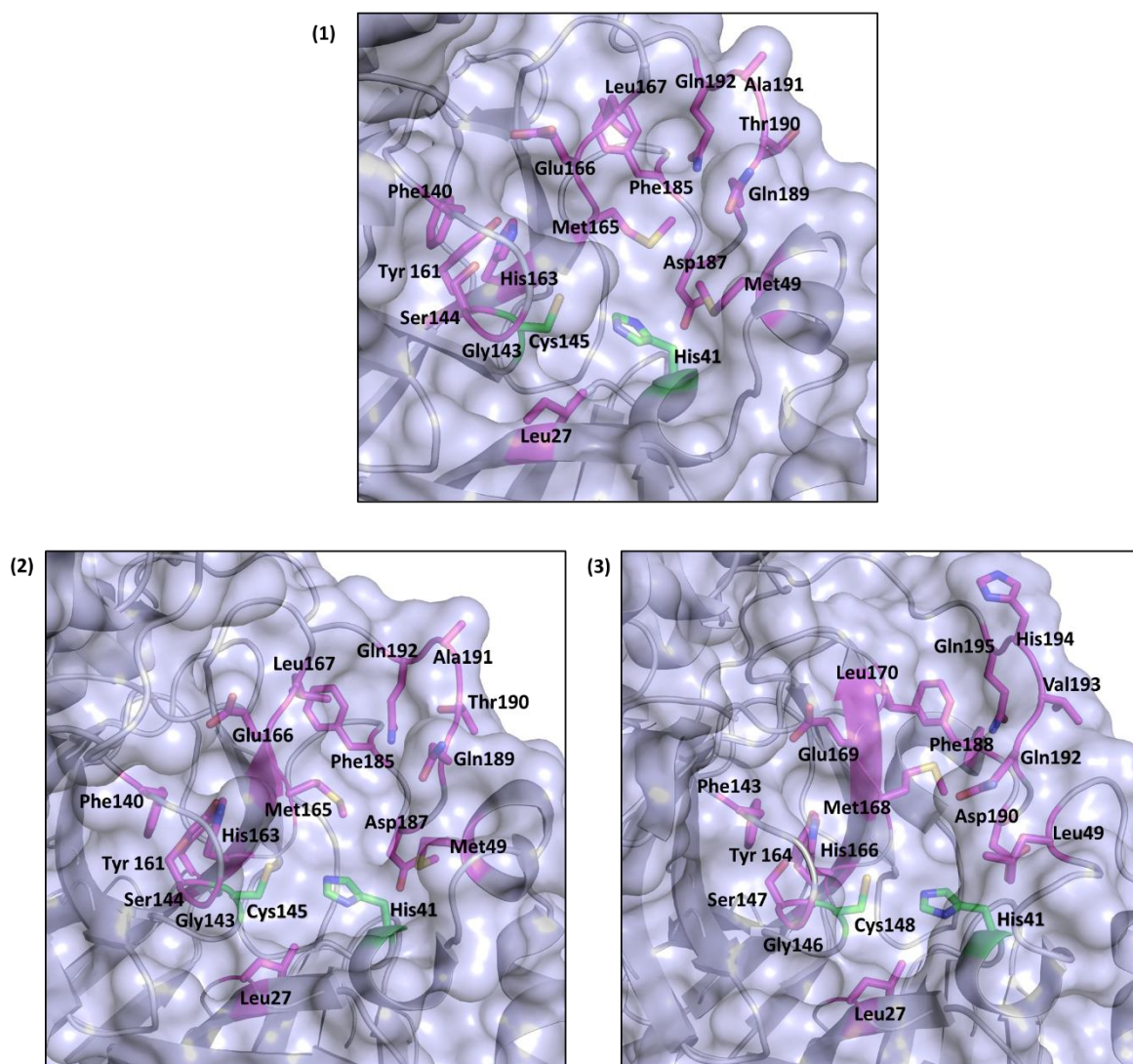


Figure 10 – Structure radiocristallographique du site catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 (1), du SARS-CoV (2) et du MERS-CoV (3).

Indication des résidus principaux du site catalytique en rose avec leur chaîne latérale en stick, et en vert pour les résidus de la dyade catalytique. Figure générée avec le logiciel PyMol (Schrodinger LLC), PDB : 6Y2E (1), 2GZ9 (2) et 4RSP (3)<sup>80,88,89</sup>.

Pour la 3CL<sup>pro</sup> de ces trois espèces, la poche S1' contient la dyade catalytique cystéine-histidine mais aussi le résidu leucine en position 27, et ce chez toutes les

espèces. Au sein de la poche S1, les résidus Phe140, Gly143, Ser144, Tyr161, His163 et Glu166 de la 3CL<sup>pro</sup> sont conservés chez ces trois espèces, tout comme le résidu Met165, situé entre les poches S1 et S2. Pour la 3CL<sup>pro</sup> du MERS-CoV, la méthionine 49 de la poche S2 est remplacée par une leucine, un résidu similaire. Le résidu Asp187 est quant à lui conservé. En ce qui concerne la poche S4, elle présente le plus de variations entre les espèces. La leucine 167, la phénylalanine 185, la glutamine 189 et la glutamine 192 sont conservées. En revanche, la thréonine 190 et l'alanine 191 sont remplacées respectivement par une valine et une histidine chez la 3CL<sup>pro</sup> du MERS-CoV. Les structures radiocristallographiques nous montrent donc une conservation totale du site catalytique de la protéase 3CL entre le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV et une bonne conservation chez le MERS-CoV.

Cette caractéristique ouvre la possibilité de développer des pan-inhibiteurs, c'est-à-dire des molécules antivirales à large spectre pouvant inhiber la 3CL<sup>pro</sup> de différentes espèces de coronavirus circulants actuellement, et peut-être des futures espèces émergentes.

### **2.3. Spécificité de substrat et absence d'homologie**

La protéase 3CL chez les coronavirus permet de cliver les polyprotéines pp1a et pp1ab au niveau de 11 sites. Le substrat peptidique est numéroté P4-P3-P2-P1-P1' selon la nomenclature de Schechter-Berger<sup>91</sup>. Les positions P1' à P4 du substrat occupent les poches S1' à S4 respectivement, avec le site de clivage situé entre P1 et P1' comme illustré figure 11-1. L'analyse des séquences de clivage du substrat a permis de montrer que les résidus situés en ces positions sont les plus importants<sup>76</sup>. Également, un motif de clivage peut être dessiné, avec une spécificité forte concernant les résidus en positions P1, P2 et P1' (figure 11-2)<sup>76,92</sup>. Le résidu en position P1 est le plus conservé, avec la présence d'une glutamine au niveau des 11 sites de clivage. Concernant la position P2, on observe des résidus hydrophobes avec principalement la leucine, ainsi que des résidus valine et phénylalanine. En P1' on retrouve des résidus de petite taille tels que la sérine ou l'alanine. En position P4, on peut voir la présence de résidus hydrophobes (valine, alanine) ou polaires (thréonine, sérine). Enfin, la position P3 ne montre pas de spécificité particulière. Cette spécificité de substrat, notamment aux positions P1, P2 et P1', est conservée chez la protéase 3CL d'autres espèces de coronavirus, comme le SARS-CoV et le MERS-CoV (figure 11-3)<sup>76,93</sup>.

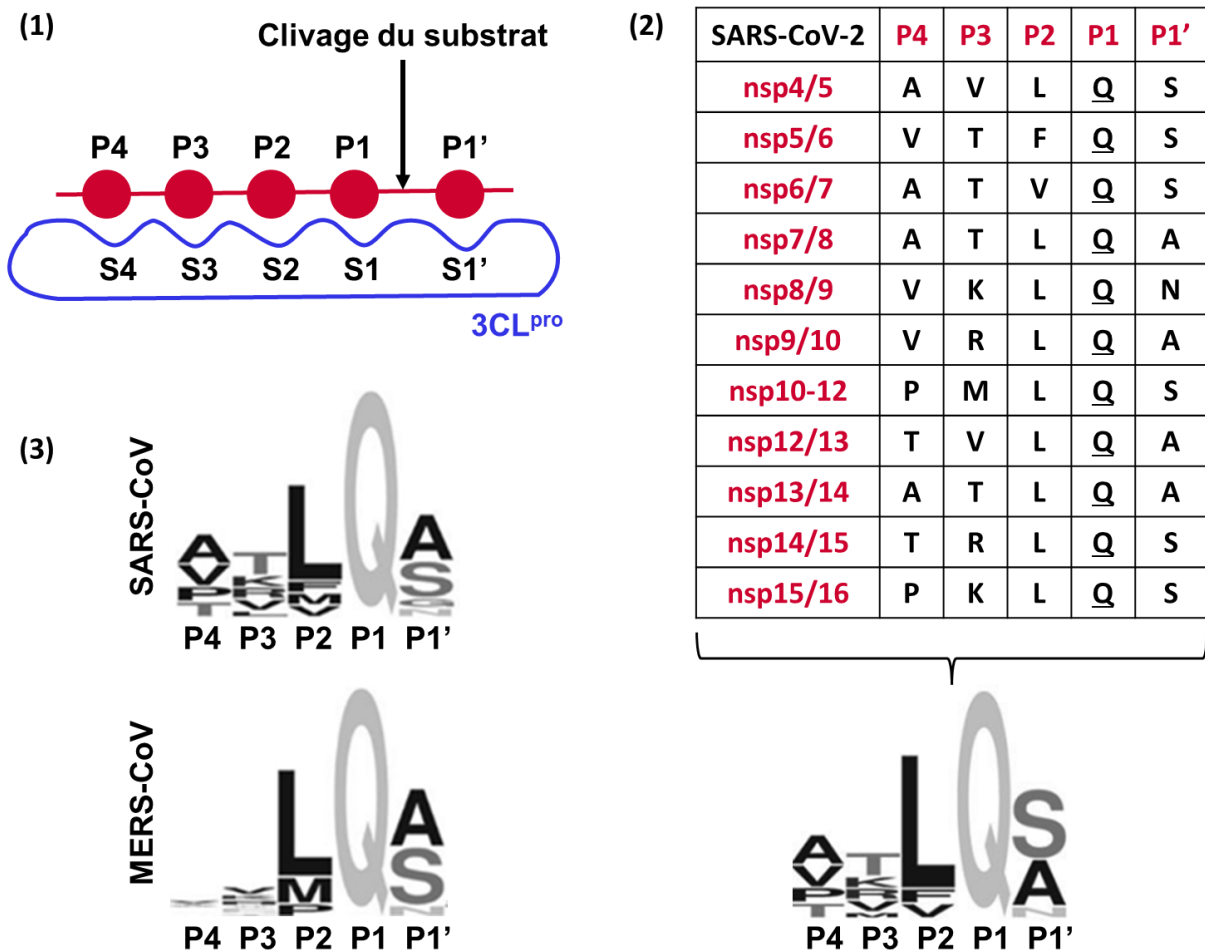


Figure 11 – La spécificité de substrat de la 3CL<sup>pro</sup>.

(1) Schéma du clivage du substrat représentant les positions des acides aminés du substrat (P4 à P1') au sein des poches du site catalytique (S4 à S1') de la 3CL<sup>pro</sup>.

(2) Représentation des 11 séquences de clivage de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 des résidus P4 à P1' et logo illustrant la spécificité de ces résidus.

(3) Logos illustrant la spécificité des résidus du substrat de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV et du MERS-CoV.

Figure adaptée de Xiong *et al.*<sup>76</sup>.

La spécificité de substrat est un argument supplémentaire montrant l'intérêt de cette cible dans la lutte contre les coronavirus puisque cela suggère une fois encore la possibilité de développer des inhibiteurs puissants à large spectre. Pour y parvenir, il est essentiel d'optimiser la liaison aux poches S1, S2 et S1'.

Également, aucun homologue de cette protéase n'a été reporté chez l'Homme. Elle ne partage sa spécificité de substrat avec aucune protéase humaine, notamment la nécessité du résidu glutamine en position P1. Il paraît donc possible d'inhiber sélectivement la 3CL<sup>pro</sup> chez les coronavirus sans inhiber les protéases humaines, minimisant ainsi le risque d'effets « off-target ».

### **3. Les inhibiteurs de la protéase 3CL du SARS-CoV-2**

Avec les pandémies de SARS-CoV et MERS-CoV, la 3CL<sup>pro</sup> a été l'une des cibles étudiée pour la recherche de nouveaux médicaments antiviraux<sup>94</sup>. Face à l'émergence de la COVID-19 et son ampleur sans précédent parmi les pandémies liées aux coronavirus, cette cible a montré un immense regain d'intérêt dans le monde de la recherche<sup>95,96</sup>. Plusieurs stratégies ont été adoptées afin de découvrir des inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 comme le repositionnement thérapeutique, les criblages virtuels ou encore les criblages à haut débit. Parmi les molécules identifiées, on trouve des inhibiteurs de nature variée avec des petites molécules de synthèse, des inhibiteurs peptidomimétiques ou encore des molécules naturelles, pouvant être des inhibiteurs irréversibles, covalents réversibles ou non covalents. Pour la plupart des molécules décrites dans la littérature, l'inhibition s'exerce au niveau du site catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2. Il est également possible de développer des inhibiteurs allostériques capables de perturber la stabilité ou la dimérisation de la protéase, mais peu de travaux ont été publiés sur le sujet.

Dans la suite de ce chapitre, le but est de présenter de façon non exhaustive différents types d'inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 avec les inhibiteurs peptidomimétiques et les inhibiteurs non peptidomimétiques comprenant les molécules naturelles et les petites molécules. Certaines de ces molécules sont encore à un stade précoce de développement, d'autres sont en revanche plus avancées et sont entrées dans des phases de développement préclinique ou clinique. Trois d'entre-elles sont aujourd'hui autorisées sur différents marchés et leur développement sera détaillé dans le chapitre suivant.

#### **3.1. Les inhibiteurs peptidomimétiques**

De nombreux inhibiteurs de type peptidomimétiques ont été décrits dans la littérature. Ces inhibiteurs possèdent une tête électrophile (ou « warhead ») capable de réagir avec la cystéine catalytique et ont un mécanisme d'action en deux temps<sup>94</sup>. Tout d'abord, comme le substrat peptidique naturel, ils viennent se placer au sein du site catalytique afin de former un complexe non covalent qui positionne la tête électrophile proche de la cystéine catalytique. L'attaque du thiolate de la Cys145 sur l'atome électrophile conduit à la formation d'un complexe covalent, ce qui inactive l'enzyme. On retrouve diverses têtes électrophiles comme des accepteurs de Michael, des époxydes, des cétones, des aldéhydes, des nitriles ou encore des  $\alpha$ -cétoamides. La



figure 12 illustre quelques exemples d'inhibiteurs peptidomimétiques décrits dans la littérature.

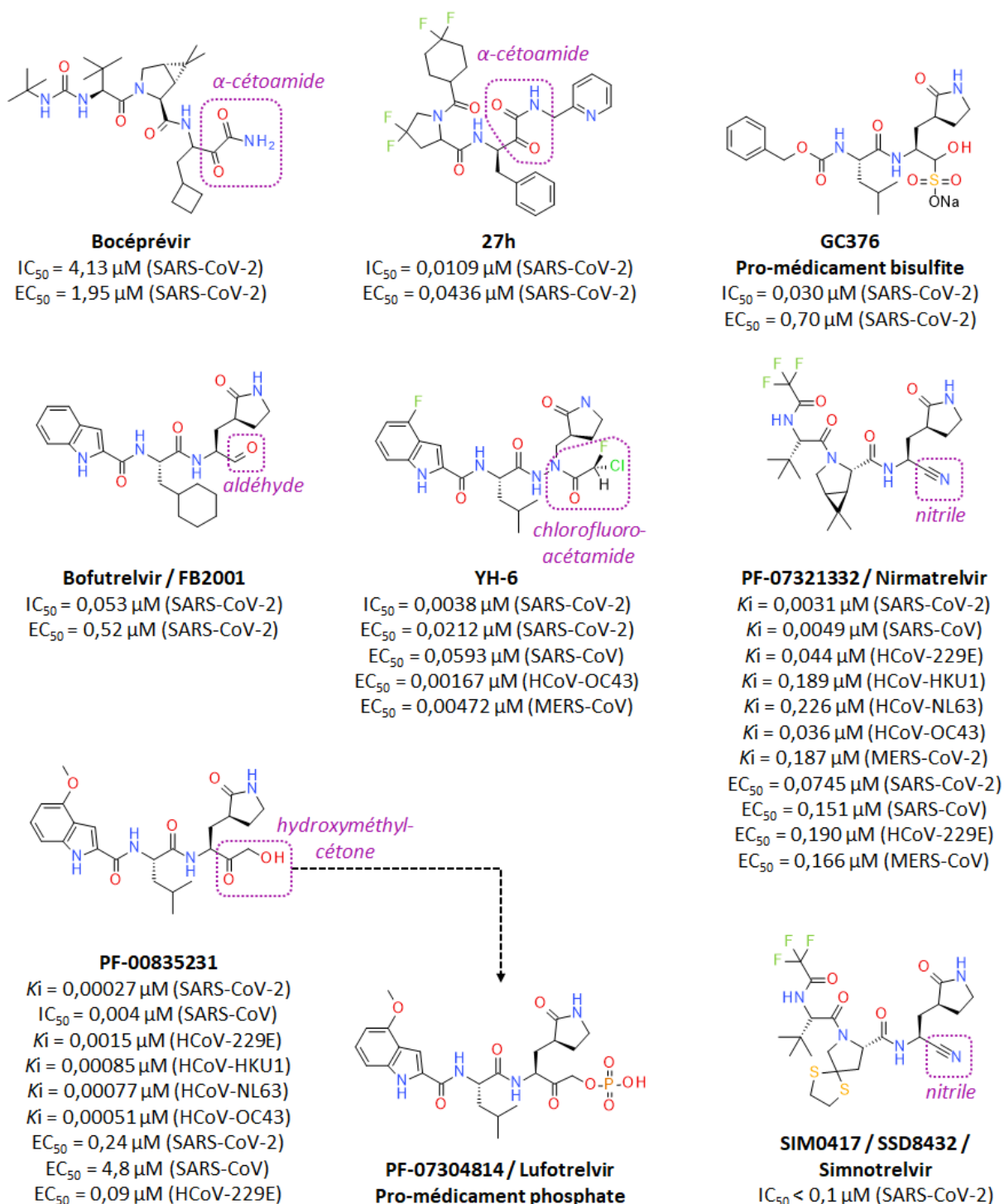


Figure 12 – Inhibiteurs peptidomimétiques associés à leur activité enzymatique sur la 3CL<sup>pro</sup> ( $IC_{50}$  ou  $K_i$ ) et leur activité antivirale sur cellules infectées ( $EC_{50}$ ).

Les données sont issues de la littérature : bocéprévir<sup>97</sup>, 27h<sup>99</sup>, GC376<sup>97,100</sup>, bofutrelvir<sup>102</sup>, YH-6<sup>107</sup>, PF-00835231 et PF-07304814<sup>103,104</sup>, nirmatrelvir<sup>108</sup> et simnotrelvir<sup>112</sup>.

Le premier inhibiteur présenté sur la figure 12 est le **bocéprévir**. Il s'agit d'un médicament antiviral développé contre le Virus de l'Hépatite C en tant qu'inhibiteur la protéase NS3/4A. Il possède une tête électrophile  $\alpha$ -cétamide. Il s'est avéré capable

d'inhiber la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et a montré une activité antivirale dans un test sur cellules infectées par le SARS-CoV-2<sup>97</sup>. Le **bocéprévir** inhibe la protéase de façon covalente réversible<sup>97</sup>. Les inhibiteurs peptidomimétiques possédant ce motif  $\alpha$ -cétamide ont fait l'objet de plusieurs recherches<sup>80,98</sup>. Récemment, le composé **27h** a également été décrit, avec le même mode d'inhibition covalent réversible<sup>99</sup>. Ce composé s'est avéré prometteur dans les tests *in vitro* avec une puissante inhibition de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 (IC<sub>50</sub> = 10,9 nM) ainsi qu'une bonne activité antivirale (EC<sub>50</sub> = 43,6 nM). Il s'est montré sélectif vis-à-vis d'un panel de protéases humaines. Enfin, son profil pharmacocinétique a été étudié chez le rat et s'est avéré intéressant. Pour le moment, aucune preuve de concept *in vivo* n'a été publiée.

Le composé **GC376** est également un inhibiteur covalent réversible présentant une fonction bisulfite. Il s'agit d'un pro-médicament qui est converti en aldéhyde afin d'inhiber la protéase<sup>100</sup>. Initialement, ce composé était développé comme inhibiteur de la 3CL<sup>pro</sup> du coronavirus félin (FIPV), mais il s'est montré également actif sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 ainsi que dans un test antiviral cellulaire<sup>97,100</sup>. Une étude *in vivo* dans un modèle de souris infectées par le SARS-CoV-2 a montré des résultats encourageants<sup>101</sup>.

Le **bofutrelvir**, également nommé **FB2001**, est un inhibiteur peptidomimétique covalent réversible développé par la société Frontier Biotech<sup>102</sup>. Cette molécule, présentant une tête électrophile aldéhyde, est très puissante *in vitro* avec une puissance sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 de 53 nM et une activité antivirale de 0,52  $\mu$ M. Le **bofutrelvir** est actuellement en essais cliniques chez l'Homme avec un mode d'administration par voie intraveineuse ou par inhalation. Le tableau 3 reprend les différents essais cliniques en cours ou terminés impliquant le **bofutrelvir**.

Numéro NCT	Statut	Information
<b>NCT04766931</b>	Phase 1/2 Terminée	Etude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité du <b>bofutrelvir</b> par voie intraveineuse chez les patients avec une forme modérée à sévère de la COVID-19.
<b>NCT05197179</b>	Phase 1 Terminée	Etude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo afin d'évaluer la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique du <b>bofutrelvir</b> par voie intraveineuse chez le sujet sain.

<b>NCT05583812</b>	Phase 1 Terminée	Etude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo afin d'évaluer la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique d'une préparation inhalée de <b>bofutrelvir</b> chez le sujet sain.
<b>NCT05675072</b>	Phase 2/3 Recrutement	Etude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'une préparation inhalée de <b>bofutrelvir</b> chez les patients avec une forme modérée à sévère de la COVID-19.
<b>NCT05445934</b>	Phase 2/3 (Étude BRIGHT) Recrutement	Etude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité par voie intraveineuse du <b>bofutrelvir</b> chez les patients hospitalisés avec une forme modérée à sévère de la COVID-19.

Tableau 3 – Essais cliniques réalisés avec le **bofutrelvir** dans le cadre de la COVID-19. Données issues du site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) en date du 31 août 2023.

La société Pfizer a aussi développé un inhibiteur peptidomimétique covalent réversible nommé **PF-00835231**. Cet inhibiteur avait déjà été étudié lors de la première pandémie de SARS-CoV et présente une tête électrophile hydroxyméthylcétone<sup>103</sup>. Son profil d'activité *in vitro* est très intéressant avec une inhibition subnanomolaire de la protéase 3CL du SARS-CoV-2 et une activité antivirale submicromolaire<sup>103,104</sup>. Cette molécule est également active sur la 3CL<sup>pro</sup> d'autres espèces de coronavirus et dans des tests sur cellules infectées par le SARS-CoV et le HCoV-229E. Les études de pharmacocinétique *in vivo* ont révélé néanmoins une forte métabolisation du composé par les cytochromes hépatiques et les études des paramètres ADME ont montré une faible solubilité du composé (< 1 mg/mL)<sup>104</sup>. Le composé doit donc être administré par voie intraveineuse sous forme de pro-médicament présentant une fonction phosphate : le composé **PF-07304814** ou **lufotrelvir**. La suite des essais précliniques s'est montrée encourageante et le composé a atteint la phase 1 des essais cliniques qu'il a complété avec succès<sup>104,105</sup>. Il s'agit d'une étude randomisée, en double aveugle et contrôlée contre placebo qui visait à évaluer la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique chez des volontaires sains (NCT04627532)<sup>106</sup>. Une étude de phase 1b randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo a également été réalisée dans le but d'évaluer la sécurité et la pharmacocinétique chez les patients hospitalisés atteints de la COVID-19 (NCT04535167). Cependant, aucune étude clinique de phase supérieure n'est en cours.

Le composé **YH-6** a été récemment décrit dans la littérature<sup>107</sup>. Il s'agit d'un inhibiteur peptidomimétique covalent réversible présentant une fonction chlorofluoroacétamide. Ce composé est structurellement très proche du composé **PF-00835231** et possède une très bonne puissance sur la 3CL du SARS-CoV-2 de l'ordre du nanomolaire. Elle a également une activité antivirale de l'ordre du nanomolaire à la dizaine de nanomolaires sur cellules infectées par le SARS-CoV-2, le SARS-CoV, le HCoV-OC43 et le MERS-CoV. Le composé **YH-6** s'est montré sélectif de la 3CL<sup>pro</sup> vis-à-vis de différentes protéases humaines et une expérience de pharmacocinétique chez la souris a montré des résultats encourageants. Pour le moment, aucune preuve de concept chez l'animal n'a été décrite.

Le **nirmatrelvir** est une molécule également développée par Pfizer. Cet inhibiteur peptidomimétique est covalent réversible et présente une fonction nitrile comme tête électrophile. Il s'est avéré très puissant *in vitro* avec une IC<sub>50</sub> de 3,1 nM sur la protéase 3CL du SARS-CoV-2 et une EC<sub>50</sub> de 74 nM dans un test sur cellules infectées par le SARS-CoV-2<sup>108</sup>. Le **nirmatrelvir** est également capable d'inhiber la 3CL<sup>pro</sup> de différentes espèces de coronavirus et possède une activité antivirale sur cellules infectées par le SARS-CoV, le HCoV-229E et le MERS-CoV<sup>108</sup>. En contraste avec le **lufotrelvir** administré par voie intraveineuse, le **nirmatrelvir** est compatible avec une administration par voie orale. Les études de pharmacocinétiques ont néanmoins indiqué la nécessité de co-administrer le **nirmatrelvir** avec le **ritonavir**, un inhibiteur des cytochromes P450 3A4, afin d'améliorer son profil pharmacocinétique<sup>108</sup>. Les études cliniques qui ont suivi ont permis à cette molécule d'obtenir une autorisation de mise sur le marché européen en janvier 2022 par l'Agence Européenne du Médicament<sup>109-111</sup>. Le **nirmatrelvir** est donné en association avec le **ritonavir** sous le nom de spécialité PAXLOVID™. Il s'agit du seul antiviral spécifique du SARS-CoV-2 à être autorisé sur le marché européen.

La dernière molécule présentée figure 12 correspond au **simnotrelvir**, un inhibiteur peptidomimétique structurellement très proche du **nirmatrelvir** présentant cette même tête électrophile nitrile. A ce jour, très peu de données *in vitro* et *in vivo* sont disponibles dans la littérature à propos de ce composé. Les essais cliniques ont néanmoins été un succès puisque la molécule a été autorisée en janvier 2023 en Chine<sup>112-114</sup>. Tout comme le **nirmatrelvir**, le **simnotrelvir** est administré par voie orale en association au **ritonavir** dans la spécialité XIANNUOXIN™.

## 3.2. Les inhibiteurs non peptidomimétiques

### 3.2.1. Les molécules naturelles

Parmi les inhibiteurs connus de la protéase 3CL du SARS-CoV-2, on retrouve également des molécules naturelles ou des dérivés de molécules naturelles de structures variées. Quelques-unes d'entre elles sont illustrées figure 13.

Divers flavonoïdes ont été décrits pour leur capacité à inhiber la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2. C'est notamment le cas de la **baicalein**, molécule provenant de la plante *Scutellaria baicalensis*<sup>115,116</sup>. Des acides phénoliques issus des feuilles de *gingko* ont présenté des puissances submicromolaires comme le **GA C15:0**<sup>117</sup>. Plusieurs quinones se sont révélées intéressantes, comme la **2-acétyl-8-méthoxy-1,4-naphtoquinone** qui présente une IC<sub>50</sub> de 72 nM sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2<sup>118</sup>. Les catéchines ont également des propriétés inhibitrices de cette 3CL<sup>pro</sup>. L'analyse d'un extrait de *Gingko Biloba* a identifié la **gallocatechin** comme étant la molécule la plus puissante parmi 38 autres<sup>119</sup>. L'alcaloïde **neoechinulin A** possède une puissance sur la protéase 3CL du SARS-CoV-2 de l'ordre du micromolaire<sup>120</sup>. Cette molécule a été isolée de l'*Aspergillus fumigatus* MR2012, un champignon marin, dans la mer Rouge. Enfin, des composés de la famille des tanins ont été décrits, comme la **1,2,3,4,6-pentagalloylglucose**<sup>121</sup>. Cette molécule présente une activité sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV de l'ordre du micromolaire.

Ces molécules sont relativement peu puissantes en comparaison aux inhibiteurs peptidomimétiques présentés précédemment ou aux inhibiteurs de type petites molécules de synthèse. Outre leur activité enzymatique sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et pour certaines molécules leur activité antivirale sur cellules infectées, peu de données caractérisent ces inhibiteurs. C'est notamment le cas de leur mode de liaison qui n'est pas décrit à ce jour.

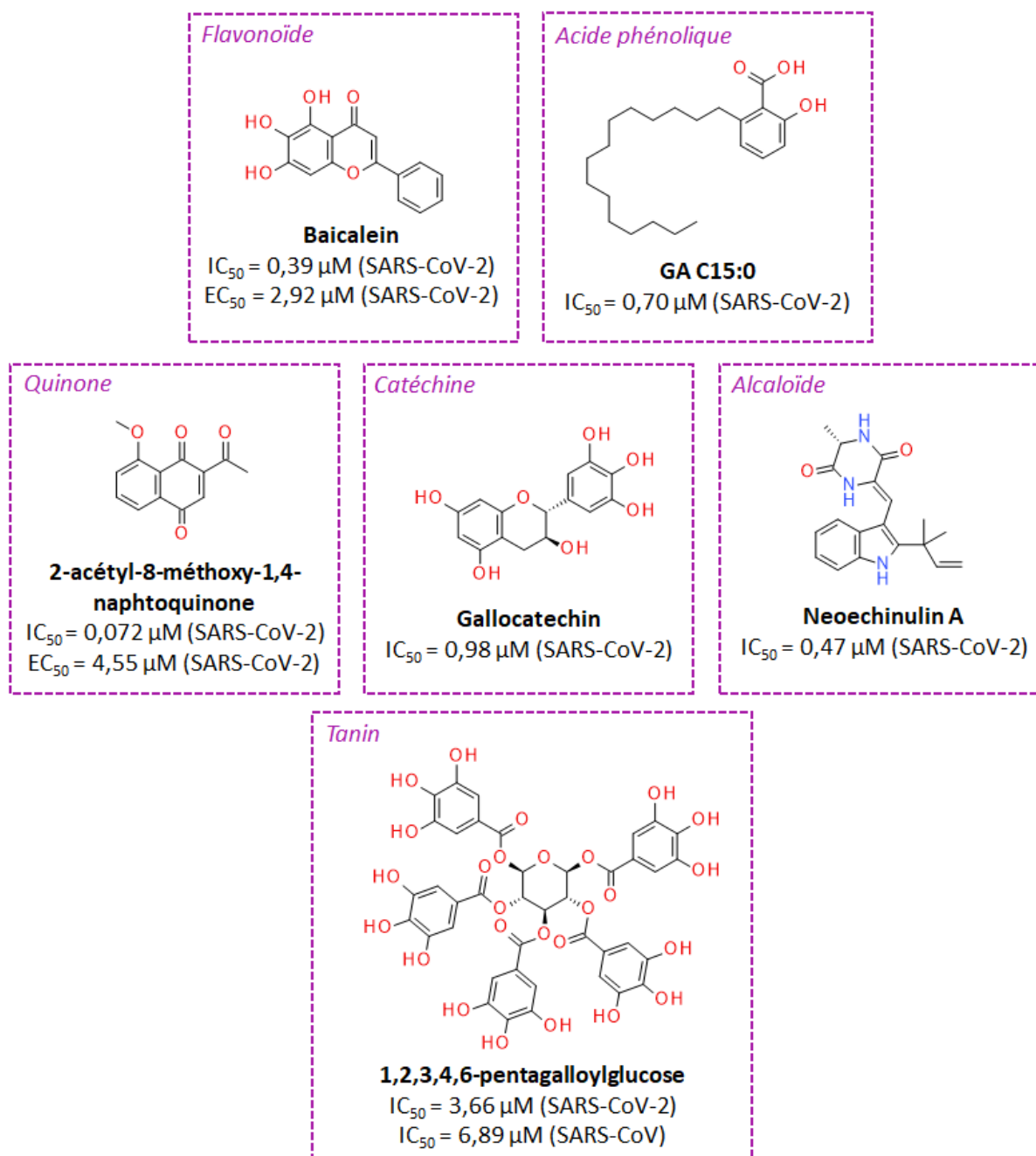


Figure 13 – Inhibiteurs de type molécules naturelles associés à leur activité enzymatique sur la 3CL<sup>pro</sup> ( $IC_{50}$ ) et leur activité antivirale sur cellules infectées ( $EC_{50}$ ).

Les données sont issues de la littérature : **baicalein**<sup>115,116</sup>, **GA C15:0**<sup>117</sup>, **2-acétyl-8-méthoxy-1,4-naphtoquinone**<sup>118</sup>, **gallocatechin**<sup>119</sup>, **neoechinulin A**<sup>120</sup> et **1,2,3,4,6-pentagalloylglucose**<sup>121</sup>.

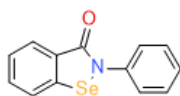
### 3.2.2. Les petites molécules de synthèse

De nombreuses petites molécules non peptidomimétiques de synthèse ont également été identifiées comme inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2<sup>77,95,96,122</sup>. Leur profil d'inhibition sont variés, avec des inhibiteurs irréversibles, covalents réversibles ou non covalents. Le figure 14 présente une liste non exhaustive d'inhibiteurs décrits dans la littérature.

La première molécule présentée figure 14 est l'**abselen**, un organoselenium de synthèse possédant des activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et cytoprotectrice<sup>123</sup>. Cette molécule a été utilisée dans le cadre de différents essais cliniques dans des pathologies variées comme le trouble bipolaire, la dépression, la maladie de Ménière, le diabète ou encore la perte d'audition. Plusieurs articles ont montré son activité antivirale contre le SARS-CoV-2<sup>124-126</sup>. En effet, l'**abselen** a montré une puissance submicromolaire sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et une activité antivirale micromolaire dans un test cellulaire<sup>125</sup>. L'**abselen** et ses dérivés sont en revanche non spécifique de la 3CL<sup>pro</sup> puisqu'il sont également actifs sur la PLP, la seconde protéase virale<sup>127,128</sup>. Cette molécule est actuellement évaluée dans un essai clinique de phase 2 multicentrique, randomisé et contrôlé contre placebo afin d'évaluer son efficacité et sa sécurité chez les patients avec une forme modérée ou sévère de la COVID-19 (NCT04483973 et NCT04484025). Aucuns résultats relatifs à ces deux études ne sont disponibles pour le moment.

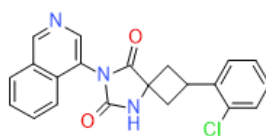
Luttens *et al.* ont développé le composé **19\_1**, un inhibiteur non covalent présentant un noyau hydantoïne<sup>129</sup>. Il démontre une très bonne activité submicromolaire *in vitro* dans les tests sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et dans les tests antiviraux sur cellules infectées par le SARS-CoV-2, le SARS-CoV et le MERS-CoV. Ce composé est sélectif de la 3CL<sup>pro</sup> vis-à-vis de différentes protéases humaines et son profil pharmacocinétique *in vitro* s'est révélé intéressant. A ce jour, aucune preuve de concept chez l'animal n'a été décrite.

Une série chimique d'inhibiteurs covalents réversibles présentant un motif thioester s'est également avérée puissante sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2<sup>130</sup>. Après analyse des relations structure-activité, le composé **3w** a été le plus puissant obtenu avec une IC<sub>50</sub> de 11 nM. Il est également actif sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV et du MERS-CoV et possède une action antivirale dans un test sur cellules infectées par le SARS-CoV-2 avec une EC<sub>50</sub> de 111 nM. Malgré ces résultats encourageants, aucunes données pharmacocinétiques ou preuve de concept *in vivo* n'ont été publiées pour le moment.



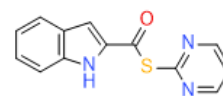
**Ebselen**

IC<sub>50</sub> = 0,67 μM  
EC<sub>50</sub> = 4,67 μM



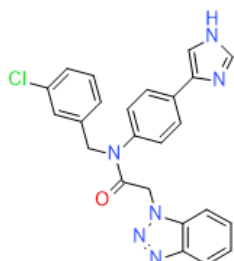
**19\_1**

IC<sub>50</sub> = 0,077 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,11 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,39 μM (SARS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 0,20 μM (MERS-CoV)



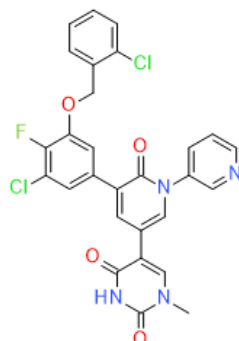
**3w**

IC<sub>50</sub> = 0,011 μM (SARS-CoV-2)  
K<sub>i</sub> = 0,014 μM (SARS-CoV-2)  
IC<sub>50</sub> = 0,06 μM (SARS-CoV)  
IC<sub>50</sub> = 0,303 μM (MERS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 0,111 μM (SARS-CoV-2)



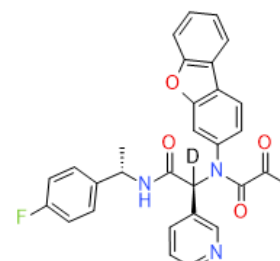
**CCF981**

IC<sub>50</sub> = 0,068 μM (SARS-CoV-2)  
IC<sub>50</sub> = 0,019 μM (SARS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 0,497 μM (SARS-CoV-2)



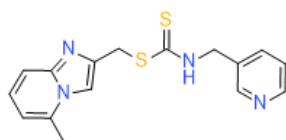
**19\_2**

IC<sub>50</sub> = 0,044 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,175 μM (SARS-CoV-2)



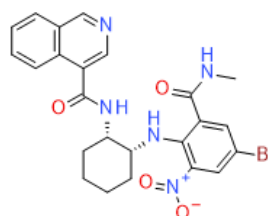
**Y180**

IC<sub>50</sub> = 0,008 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,011 μM (SARS-CoV-2)



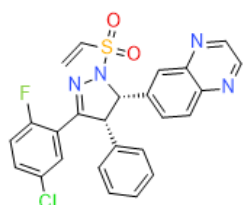
**1**

IC<sub>50</sub> = 0,021 μM (SARS-CoV-2)  
IC<sub>50</sub> = 0,383 μM (SARS-CoV)  
IC<sub>50</sub> = 0,016 μM (HCoV-229E)  
IC<sub>50</sub> = 2,00 μM (MERS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 1,06 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 1,34 μM (HCoV-229E)



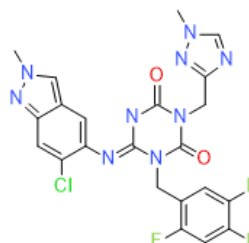
**WU04**

IC<sub>50</sub> = 0,072 μM (SARS-CoV-2)  
IC<sub>50</sub> = 0,055 μM (SARS-CoV)  
IC<sub>50</sub> = 1,020 μM (MERS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 0,025 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,019 μM (SARS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 0,053 μM (MERS-CoV)



**(S,S)-PM-2-071**

IC<sub>50</sub> < 0,0025 μM (SARS-CoV-2)  
IC<sub>50</sub> = 0,012 μM (HCoV-229E)  
IC<sub>50</sub> < 0,0025 μM (HCoV-HKU1)  
IC<sub>50</sub> = 0,091 μM (HCoV-NL63)  
IC<sub>50</sub> < 0,0025 μM (HCoV-OC43)



**S-217622 / Ensitrelvir**

IC<sub>50</sub> = 0,013 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,37 μM (SARS-CoV-2)  
EC<sub>50</sub> = 0,21 μM (SARS-CoV)  
EC<sub>50</sub> = 5,5 μM (HCoV-229E)  
EC<sub>50</sub> = 0,074 μM (HCoV-OC43)  
EC<sub>50</sub> = 1,4 μM (MERS-CoV)

Figure 14 – Inhibiteurs de type petites molécules de synthèse associés à leur activité enzymatique sur la 3CL<sup>pro</sup> (IC<sub>50</sub> ou K<sub>i</sub>) et leur activité antivirale sur cellules infectées (EC<sub>50</sub>).

Les données sont issues de la littérature : **ebselen**<sup>125</sup>, **19\_1**<sup>129</sup>, **3w**<sup>130</sup>, **CCF981**<sup>133</sup>, **19\_2**<sup>135</sup>, **Y180**<sup>136</sup>, **1**<sup>137</sup>, **WU04**<sup>138</sup>, **(S,S)-PM-2-071**<sup>139</sup> et **ensitrelvir**<sup>140</sup>.



Le motif benzotriazole est également présent sur divers inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et est étudié depuis la pandémie de SARS-CoV<sup>131,132</sup>. Le composé **CCF981** en est un exemple. Il s'agit d'un inhibiteur non covalent avec une puissance de l'ordre de la dizaine de nanomolaires sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV, ainsi qu'une activité antivirale sur cellules infectées par le SARS-CoV-2 de l'ordre du submicromolaire<sup>133</sup>.

Une série dérivée du **perampanel** ayant un motif triarylpyridinone a été identifiée comme inhibiteur non covalent de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2<sup>134</sup>. Le **perampanel** est un antagoniste des récepteurs au glutamate et est utilisé dans le traitement de l'épilepsie. Après optimisation, le composé **19\_2** est le plus puissant ayant été obtenu, avec une IC<sub>50</sub> de 44 nM sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et une EC<sub>50</sub> de 175 nM sur cellules infectées par le SARS-CoV-2<sup>135</sup>.

Plus récemment, le composé **Y180** a été publié<sup>136</sup>. Comme le composé **27h** et le **bocéprévir**, cette molécule est un inhibiteur covalent réversible possédant un motif  $\alpha$ -cétamide. Le composé **Y180** est très puissant sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 avec IC<sub>50</sub> de 8 nM. Il montre une activité antivirale *in vitro* très puissante avec une EC<sub>50</sub> de 11 nM. Il ne montre d'activité sur un panel de protéases humaines, indiquant un bon profil de sélectivité. L'évaluation de sa pharmacocinétique *in vitro* et *in vivo* a indiqué la nécessité d'une co-administration avec le **ritonavir**. Une expérience dans un modèle de souris infectées a démontré une réduction de la charge virale, une diminution des dommages tissulaires et une augmentation de la survie<sup>136</sup>.

Un motif dithiocarbamate capable d'inhiber la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 a été décrit par une équipe du Pr. Déprez<sup>137</sup>. A l'issue d'un criblage haut débit, le composé **1** a été identifié comme hit. Cet inhibiteur covalent réversible est puissant sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et est également actif sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV, du HCoV-229E et du MERS-CoV. Il a également une activité antivirale de l'ordre du micromolaire sur cellules infectées par le SARS-CoV-2 et le HCoV-229E. En plus de son activité de pan-inhibiteur, cette molécule est sélective de la 3CL<sup>pro</sup> vis-à-vis de plusieurs protéases humaines.

La molécule **WU04** a été dernièrement publiée comme inhibiteur non covalent de la protéase 3CL<sup>138</sup>. Son IC<sub>50</sub> est de 72 nM sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et son EC<sub>50</sub> de 25 nM sur cellules infectées par le SARS-CoV-2. Le composé **WU04** a une activité pan-inhibitrice puisqu'il inhibe également la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV et du MERS-CoV et il possède une activité antivirale sur cellules infectées par ces deux espèces. Les

études de pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo* soulignent la nécessité d'ajouter le **ritonavir** pour améliorer la pharmacocinétique du composé. Une étude *in vivo* dans un modèle de souris infectées a donné des résultats très encourageants, comparables à ceux obtenus avec le **nirmatrelvir** utilisé comme contrôle dans cette expérience à la même dose administrée par voie orale<sup>138</sup>.

Des chercheurs ont découvert une série de composés présentant un motif pyrazoline et une tête électrophile chloroacétamide ou sulfonamide de vinyl, capable d'inhiber la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2<sup>139</sup>. Après optimisation, le composé **(S,S)-PM-2-071** est le meilleur obtenu avec une puissance de l'ordre du nanomolaire sur la 3CL<sup>pro</sup> de 5 espèces de coronavirus. Des problèmes de solubilité, de stabilité métabolique *in vitro* et de perméabilité cellulaire n'ont pas permis d'observer d'activité antivirale *in cellulo*.

La dernière petite molécule présentée figure 14 est l'**ensitrelvir**, ou **S-217622**, développée par la société japonaise Shionogi en collaboration avec l'université d'Hokkaido au Japon<sup>140</sup>. Ce composé est un inhibiteur non covalent très puissant sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 avec une IC<sub>50</sub> de 13 nM<sup>140</sup>. Il est également actif dans les tests d'infection cellulaire sur un panel de coronavirus<sup>140</sup>. Il s'est montré sélectif de la 3CL<sup>pro</sup> face à diverses protéases humaines<sup>140</sup>. Les études de pharmacocinétique *in vitro* et *in vivo* ont été un succès, tout comme les expériences *in vivo* d'infection virale<sup>140,141</sup>. Les essais cliniques réalisés ont permis à cette molécule d'obtenir une autorisation d'utilisation au Japon le 22 novembre 2022<sup>142-147</sup> et à Taiwan le 11 avril 2023<sup>148</sup>. Le composé est administré par voie orale sous le nom de spécialité Xocova™, correspondant à la forme **acide fumarique ensitrelvir**.

## Chapitre III – Les inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 autorisés sur le marché

### 1. Le nirmatrelvir

Le **nirmatrelvir**, ou **PF-07321332**, est une molécule qui a été développée par la compagnie Pfizer. Elle a été obtenue à la suite d'un travail d'optimisation multiparamétrique de chimie médicinale. Le **nirmatrelvir** s'est rapidement présenté comme un candidat médicament très prometteur pour lutter contre la COVID-19 mais également contre les coronavirus en général. Son activité enzymatique sur la 3CL<sup>pro</sup> de 7 espèces de coronavirus et les activités antivirales sur cellules infectées par 4 espèces de coronavirus ont été décrites figure 12<sup>108</sup>. Ces résultats indiquent son potentiel en tant que pan-inhibiteur de coronavirus.

#### 1.1. Données précliniques

De nombreuses expériences précliniques *in vivo* et *in vitro* ont été menées afin de caractériser le **nirmatrelvir** et d'évaluer son efficacité, sa pharmacocinétique et sa toxicité avant une administration chez l'Homme. Le rapport de l'AEM sur le **nirmatrelvir** présente de façon complète les expériences *in vitro* et *in vivo* relatives à l'étude de la pharmacodynamie et de la pharmacocinétique du **nirmatrelvir**<sup>109</sup>. La suite de ce manuscrit vise à illustrer le développement préclinique de cette molécule au travers d'une sélection de résultats clés. Des données complémentaires sont disponibles dans la littérature et dans le rapport de l'AEM<sup>108,109,149</sup>.

##### 1.1.1. Mode de liaison

Le mode liaison du **nirmatrelvir** a été élucidé afin de comprendre au mieux son mode d'action. Il s'agit d'un inhibiteur covalent réversible de la protéase 3CL (figure 15-1). Sa structure radiocristallographique avec la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 est illustrée figure 15-2, avec l'indication des résidus clés impliqués dans les interactions entre le **nirmatrelvir** et la protéase<sup>149</sup>. On peut voir que le composé occupe les 5 poches du site catalytique. Une liaison covalente est établie entre le thiol de la cystéine catalytique et le carbone de la fonction nitrile du **nirmatrelvir**, ce qui forme une fonction thioimide réversible. Le lactame se trouve au niveau de la poche S1 avec les atomes d'azote et d'oxygène qui forment des liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales des résidus His163 et Glu166, ainsi que le squelette du résidu Phe140. Le squelette de l'histidine 164 réalise une liaison hydrogène avec l'azote de la fonction amide en position P1. Le groupement diméthylcyclopropyle proline fait principalement des interactions

hydrophobes dans la poche S2. La *tert*-leucine se place au niveau de la poche S3. Les atomes d'oxygène et d'azote des fonctions amides situées de part et d'autre de ce *tert*-butyle réalisent des liaisons hydrogènes avec le squelette du résidu Glu166. Enfin, le trifluorométhyle se situe dans la poche S4 et effectue une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu Gln192.

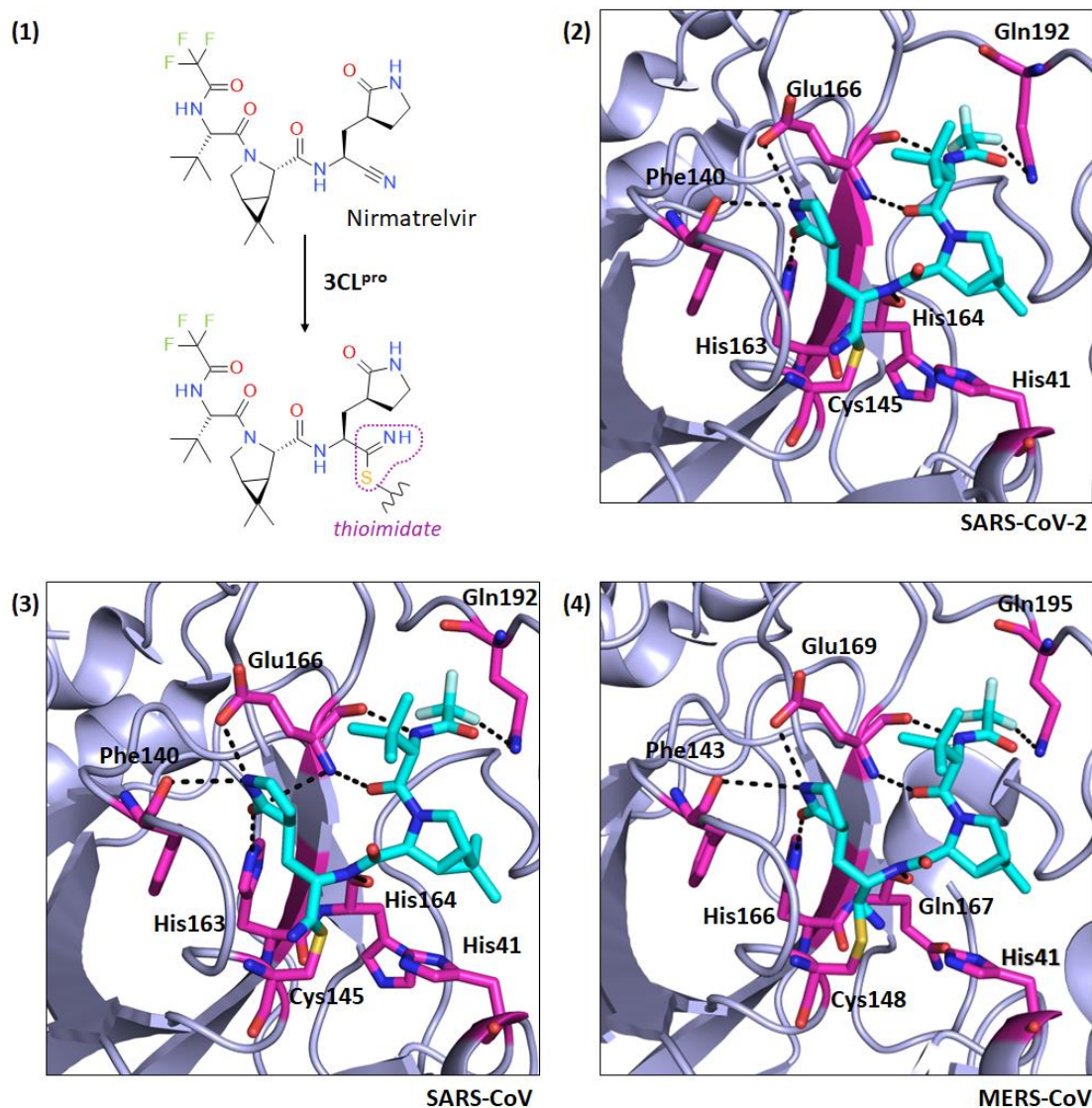


Figure 15 – Mode de liaison du **nirmatrelvir** à la 3CL<sup>pro</sup>.

(1) Schéma de la liaison covalente entre le **nirmatrelvir** et la cystéine catalytique de la 3CL<sup>pro</sup>.

(2-4) Structures radiocristallographiques du **nirmatrelvir** dans la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 (2), du SARS-CoV (3) et du MERS-CoV (4). Les résidus impliqués dans des interactions clés sont représentés en stick rose et le **nirmatrelvir** en cyan. Les lignes pointillées indiquent les liaisons hydrogènes.

Figures générées avec le logiciel PyMol (Schrodinger LLC), PDB : 7VLQ (2), 7VLO (3) et 7VTC (4)<sup>149</sup>.

Le **nirmatrelvir** a également été co-cristallisé avec la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV et du MERS-CoV. Leurs structures radiocristallographiques sont illustrées figures 15-3 et 15-4 respectivement<sup>149</sup>. On peut voir que le **nirmatrelvir** se place de façon similaire au sein des trois sites catalytiques et réalise les mêmes interactions clés.

### 1.1.2. Données pharmacocinétiques

Le profil pharmacocinétique du **nirmatrelvir** a été étudié *in vitro*<sup>108</sup>. Dans une expérience de stabilité métabolique sur microsomes hépatiques humains, 5 métabolites ont été identifiés après une incubation d'une heure à 37 °C (figure 16). La structure de ces métabolites a été élucidée par RMN après leur biosynthèse et purification à partir des microsomes hépatiques humains. Le profil de métabolisation du **nirmatrelvir** obtenu avec les microsomes hépatiques humains a pu être reproduit après incubation avec des cytochromes P450 3A4 humains recombinants comme illustré sur le second chromatogramme figure 16. Les CYP3A4 semblent donc jouer un rôle prédominant dans la métabolisation du **nirmatrelvir**.

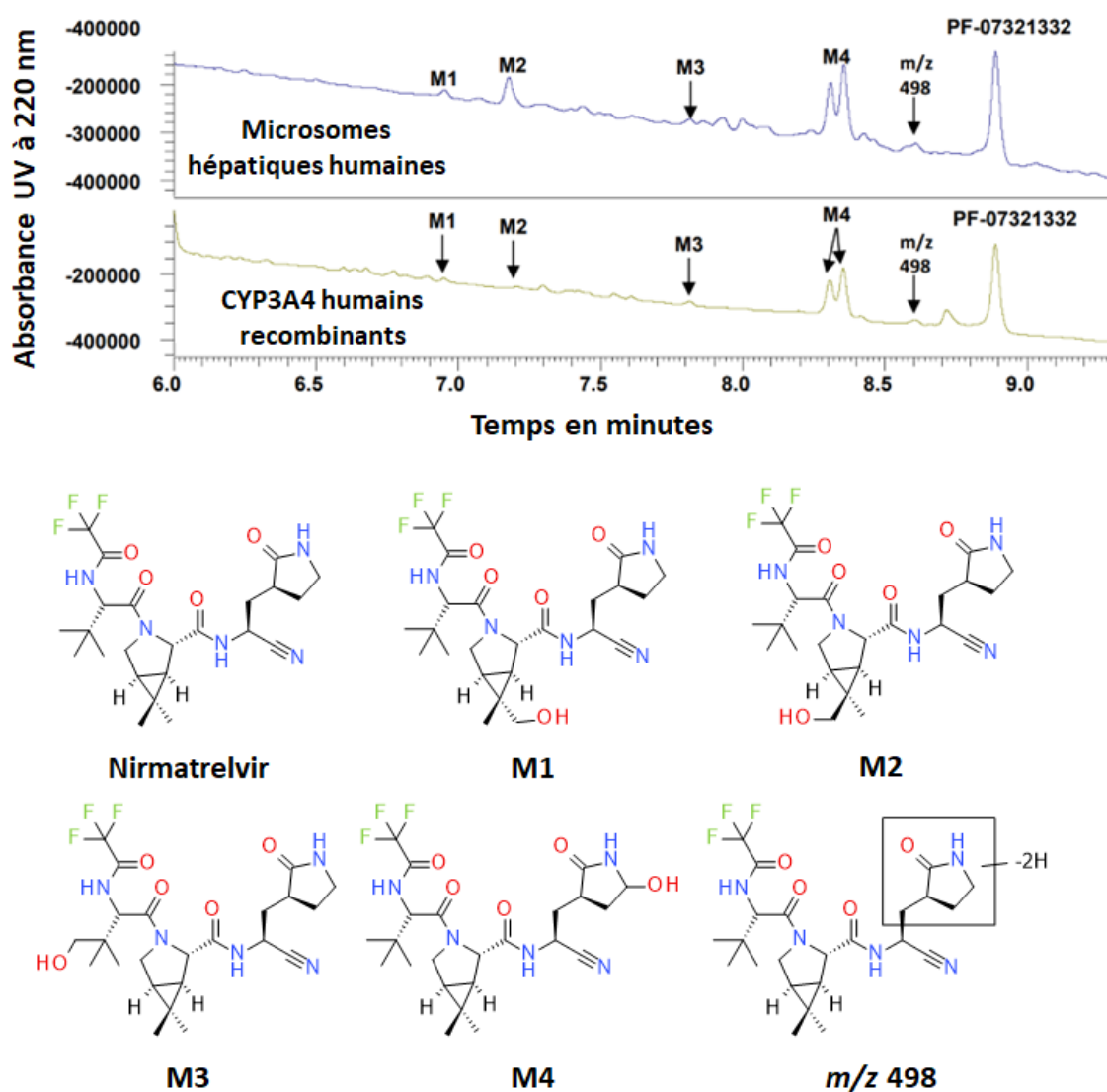


Figure 16 – Chromatogrammes du **nirmatrelvir** incubé avec des microsomes hépatiques humains ou des CYP3A4 humains recombinants et structure des métabolites identifiés.

Analyse effectuée par UHPLC-UV après incubation du **nirmatrelvir** (10 mM) pendant une heure à 37 °C avec des microsomes hépatiques humains (2 mg/mL) ou des CYP3A4 humains recombinants (100 pmol/mL) dans un tampon phosphate (pH 7,4) contenant du NADPH (1,3 mM) et du MgCl<sub>2</sub> (3,3 mM)<sup>108</sup>.

Ce rôle a été confirmé dans une expérience de stabilité sur microsomes hépatiques humains réalisée en présence ou non d'un inhibiteur des CYP3A4, le **kétoconazole**. Les résultats illustrés tableau 4 indiquent que le **nirmatrelvir** présente une clairance intrinsèque modérée, et que celle-ci est nettement améliorée en présence de **kétoconazole**. Ces résultats suggèrent que l'ajout d'un inhibiteur de CYP3A4 comme le **ritonavir** en tant que potentialisateur pharmacocinétique pourrait être utile en clinique.

Co-facteur	Inhibiteur CYP3A4	t <sub>1/2</sub> (min)	Cl <sub>int</sub> (µL/min/mg)
- NADPH	-	>120	<5,78
+ NADPH	-	28,2 (± 0,2)	24,5 (± 0,2)
+ NADPH	<b>kétoconazole</b>	>160	<4,33

Tableau 4 – Stabilité métabolique du **nirmatrelvir**.

La stabilité métabolique du **nirmatrelvir** (0,1 µM) a été évaluée sur microsome hépatique humain (1 mg/mL) en absence ou non de co-facteur NADPH et de **kétoconazole** (1 µM). Les incubations sans NADPH ont été réalisées en duplicate et avec NADPH en triplicate. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne (± SD)<sup>108</sup>.

Le profil pharmacocinétique de la molécule a été évalué plus en détail dans des expériences *in vivo* chez le rat et le singe, en doses uniques ou répétées<sup>108</sup>. Les résultats en doses uniques sont présentés tableau 5 et indiquent que le produit a été rapidement absorbé. Une clairance modérée a été observée avec une demi-vie d'élimination de 5 heures chez le rat et de moins d'une heure chez le singe. La biodisponibilité par voie orale (F) est quant à elle modérée chez le rat (50%) mais faible chez le singe (8,5%). Cette faible biodisponibilité par voie orale pourrait être attribuée à l'effet de premier passage hépatique, ce qui concorde avec les données obtenues dans les expériences ADME *in vitro*. La figure 17 présente une partie des résultats obtenus avec administration de doses répétées sur une durée de deux semaines<sup>108</sup>. Une augmentation de l'exposition de façon dose-dépendante chez le rat et le singe est visible, avec une augmentation de la C<sub>max</sub> et de l'AUC. Aucune différence liée au sexe n'a été observée dans l'expérience. D'un point de vue toxicologique, cette expérience a montré que le **nirmatrelvir** est bien toléré. Aucun effet indésirable n'a été détecté, permettant de fixer la NOAEL (« No Observable Adverse Effect Level ») à la plus forte dose administrée chez les deux espèces.

Espèce	Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	F orale (%)
Rat	1 (IV)	-	-	5,1	-
	10 (PO)	1290	1,5	4,0	50
Singe	1 (IV)	-	-	0,79	-
	10 (PO)	1450	0,25	-	8,5

Tableau 5 – Etude pharmacocinétique du **nirmatrelvir** sur doses uniques chez le rat et le singe<sup>108</sup>.

Expérience réalisée chez le rat et le singe mâle, après administration d'une dose unique de **nirmatrelvir** par voie intraveineuse (IV) ou orale (PO). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne (n = 2).

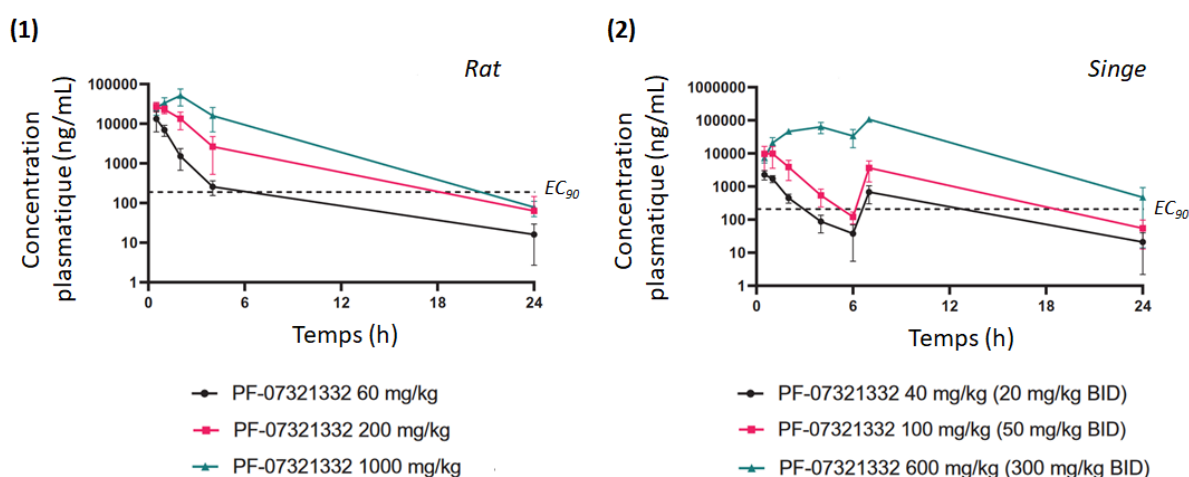


Figure 17 – Etude pharmacocinétique du **nirmatrelvir** sur doses répétées chez le rat et le singe<sup>108</sup>.

(1) Exposition plasmatique chez le rat après 14 jours de traitement (15 animaux/sexe/dose). Administration par voie orale de 60, 200 ou 1000 mg/kg une fois par jour.

(2) Exposition plasmatique chez le singe après 15 jours de traitement (5 animaux/sexe/dose). Administration par voie orale de 20, 50 ou 600 mg/kg deux fois par jour (BID).

La valeur d'EC<sub>90</sub> de 181 nM obtenue dans le test *in vitro* d'infection virale sur cellule dNHBE a été convertie en ng/mL en utilisant le poids moléculaire du **nirmatrelvir** (499.5 g/mol). Cette valeur a été ensuite divisée par la fraction libre plasmatique du **nirmatrelvir** ou fu (0,479 pour le rat et 0,208 pour le singe) afin d'obtenir des EC<sub>90</sub> libres finales de 189 et 208 ng/mL chez le rat et le singe respectivement. Figure adaptée de Owen *et al.*<sup>108</sup>.

### 1.1.3. Données pharmacodynamiques

Une expérience *in vivo* de preuve de concept a été menée afin de déterminer l'activité antivirale du **nirmatrelvir** dans un modèle de souris BALB/c infectée par le SARS-CoV-2<sup>108,150</sup>. Les souris infectées ont été traitées 4 heures post-inoculation avec 300 mg/kg ou 1000 mg/kg de **nirmatrelvir**, ou avec le véhicule, à raison d'une administration deux fois par jour par voie orale. Un groupe contrôle de souris n'ayant pas été infectées était également présent en parallèle dans cette expérience. Les souris ont été sacrifiées 4 jours après infection. Les résultats obtenus sont présentés figure 18.



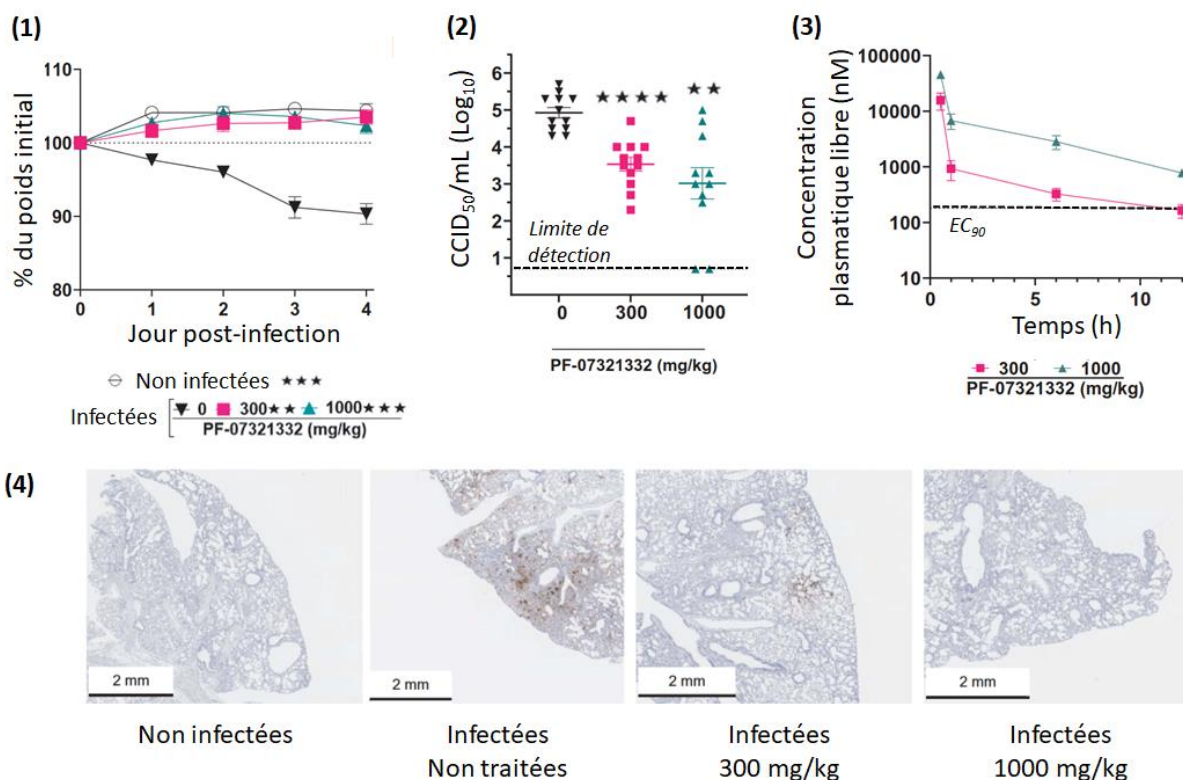


Figure 18 – Efficacité *in vivo* du **nirmatrelvir** dans un modèle de souris infectées par le SARS-CoV-2 et exposition plasmatique chez les souris non infectées.

(1,2 et 4) Des souris BALB/c ont été infectées ou non par le SARS-CoV-2 MA10. Les souris infectées ont été traitées par voie orale avec 300 mg/kg ou 1000 mg/kg de **nirmatrelvir**, ou avec le véhicule, à raison de deux administrations par jour pendant 5 jours. La première administration a eu lieu 4 heures post-infection. Les animaux ont été sacrifiés 4 jours après infection. 6 souris par groupe ont été utilisées, soit 18 souris au total. (1) Suivi du poids des souris pendant l'infection, avec deux pesées par jour. (2) Suivi de la charge virale dans le poumon. (4) Images obtenues par microscopie après analyse immunohistochimique du poumon des souris utilisant un anticorps dirigé contre la protéine de nucléocapside du SARS-CoV-2.

(3) Exposition plasmatique sur 12 heures suivie dans le groupe de souris BALB/c non infectées. L'EC<sub>90</sub> correspond à l'activité antivirale sur cellules dNHBE infectées par le SARS-CoV-2, à savoir 181 nM.

Figure adaptée de Owen *et al.*<sup>108</sup>.

Tout d'abord, une perte de poids d'environ 10% a été observée dans le groupe véhicule, ce qui n'a pas été le cas des groupes traités ou non infectés (figure 18-1). La charge virale dosée dans les poumons (CCID<sub>50</sub> ou « Cell Culture Infectious Dose 50% ») a été diminuée de façon significative et dose dépendante chez les souris traitées (figure 18-2). L'analyse histopathologique des poumons après sacrifice a montré que le **nirmatrelvir** limite l'infiltration cellulaire et protège le tissu pulmonaire des dommages causés par la réplication virale. L'analyse immunohistochimique utilisant un anticorps dirigé contre la protéine de nucléocapside pour détecter le niveau d'antigène viral dans le poumon a également été réalisée (figure 18-4). On peut voir grâce à aux images de microscopie que le **nirmatrelvir** inhibe la réplication virale de façon dose-dépendante, avec un marquage plus important dans le groupe de souris infectées n'ayant pas reçu de traitement. Le groupe de souris non infectées et non



traitées utilisées comme contrôle dans le suivi du poids a par la suite été traité aux mêmes doses afin d'étudier la pharmacocinétique (figure 18-3). La valeur d'EC<sub>90</sub> indiquée sur le graphique correspond à celle obtenue dans les tests antiviraux sur cellules dNHBE (« differentiated normal human bronchial epithelial »), à savoir 181 nM. A la dose de 300 mg/kg, la concentration plasmatique libre du composé a été d'environ 0,9 fois l'EC<sub>90</sub> à 12 heures. A la dose de 1000 mg/kg, cette concentration libre est passée à environ 4 fois l'EC<sub>90</sub>. Ces expériences confirment que le **nirmatrelvir** est efficace pour réduire la charge virale dans les poumons de la souris infectée à des concentrations en accord avec la puissance antivirale observée *in vitro*.

*In vitro*, le **nirmatrelvir** s'est montré très sélectif de la 3CL<sup>pro</sup>. Il n'exerce pas d'activité inhibitrice sur un panel de protéases humaines (caspase 2, cathepsin B, cathepsin L, chymotrypsin, elastase, thrombin A et cathepsin D) et un large éventail de récepteurs couplés aux protéines G, de kinases, de transporteurs, de phosphodiesterases et de canaux ioniques humains (incluant hERG)<sup>108</sup>. Ces résultats sont très encourageants quant aux risques d'effets « off-target ». Également, aucun problème de génotoxicité n'a été décelé dans des tests de micronoyaux *in vitro* et *in vivo* chez le rat. La reprotoxicité a également été évaluée avec des études sur la fertilité, le développement embryo-fœtal et le développement pré et post-natal. Les résultats communiqués indiquent des NOAEL correspondant à des doses induisant une exposition supérieure à la dose thérapeutique envisagée chez l'Homme.

Enfin, de nombreux variants ayant fait leur apparition depuis le début de la pandémie, la question du maintien de l'efficacité du **nirmatrelvir** face à ces différentes souches s'est posée. Dans des expériences *in vitro* d'infection cellulaire, le **nirmatrelvir** s'est montré efficace sur différents variants connus du SARS-CoV-2<sup>151,152</sup>. Vangeel *et al.* ont montré que le **nirmatrelvir** conserve son activité antivirale sur les variants alpha, beta, gamma, delta et omicron par rapport à la souche « wild-type »<sup>151</sup>. La même tendance a été observée par Rai *et al.* entre la souche « wild-type » et les variants alpha, beta, gamma, delta, et omicron<sup>152</sup>. Les EC<sub>50</sub> issues de ces deux articles sont présentées tableau 6.

	<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>	
	Vangeel <i>et al.</i>	Rai <i>et al.</i>
<b>Souche « wild-type »</b>	124,7	32,2
<b>Variant alpha</b>	264,4	41,0
<b>Variant beta</b>	139,7	127,2
<b>Variant gamma</b>	274,7	24,9
<b>Variant delta</b>	212,0	15,9
<b>Variant omicron</b>	100,5	16,2

Tableau 6 – Activités antivirales *in vitro* du **nirmatrelvir** sur différents variants de SARS-CoV-2.

Les données de Vangeel *et al.*<sup>151</sup> proviennent d'un test sur cellules VeroE6-GFP en présence d'un inhibiteur de Pgp (n = 4). Le niveau d'infection a été déterminé par fluorescence grâce à la GFP après 4 jours d'infections. Les souches utilisées proviennent de patients belges et sont répertoriées dans le GISAID : GHB-03021/2020 (wild-type), EPI\_ISL\_791333 (alpha), EPI\_ISL\_896474 (beta), EPI\_ISL\_1091366 (gamma), EPI\_ISL\_2425097 (delta) et EPI\_ISL\_6794907 (omicron).

Les données de Rai *et al.*<sup>152</sup> proviennent d'un test sur cellules VeroE6 avec un knock-out de la Pgp (n = 2). Le niveau d'infection a été déterminé par RT-qPCR après 48 heures d'infection. Les souches utilisées sont les suivantes : USA-WA1/2020 (wild-type), variant B.1.1.7 (alpha), variant B.1.351 (beta), variant P.1 (gamma), variant B.1.617.2 (delta) et variant B.1.1.529 (omicron).

## 1.2. Données cliniques

A l'issue des résultats prometteurs obtenus dans les études précliniques, le **nirmatrelvir** a fait l'objet de plusieurs essais cliniques ayant des objectifs variés, dont certains sont toujours en cours. En août 2023, 58 études, toutes phases confondues, sont répertoriées avec le **nirmatrelvir** sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). Dans cette partie, seuls les essais cliniques majeurs ayant permis son autorisation de mise sur le marché sont présentés.

### 1.2.1. Étude de phase 1

L'objectif de cette phase 1 a été d'apprécier la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique du **nirmatrelvir** seul ou en association au **ritonavir** chez le sujet sain, en doses uniques ou répétées (NCT04756531). Les résultats de cet essai figurent dans le rapport de l'AEM et ont été publiés dans la littérature<sup>109,110</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de l'essai clinique (tableau 7).

#### **Méthode :**

Dans cet essai multicentrique, randomisé et contrôlé contre placebo, 69 sujets sains adultes ont été inclus entre février et septembre 2021. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible dans l'article ou sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)<sup>109,110</sup>.

Cet essai s'est divisé en 5 parties :

- **Partie 1** : Cet essai croisé en double aveugle a compris 12 participants ayant reçu une administration par voie orale d'une dose unique de **nirmatrelvir** ou placebo. Une période de 5 jours d'espacement entre les traitements a été suivie.
  - **Cohorte 1** :
    - *Période 1* : **nirmatrelvir** 150 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), à jeun.
    - *Période 2* : **nirmatrelvir** 1500 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), à jeun.
    - *Période 3* : **nirmatrelvir** 750 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), associé à 100 mg de **ritonavir**, à jeun.
  - **Cohorte 2** :
    - *Période 1* : **nirmatrelvir** 500 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), à jeun.
    - *Période 2* : **nirmatrelvir** 250 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), associé à 100 mg de **ritonavir**, à jeun.
    - *Période 3* : **nirmatrelvir** 250 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), associé à 100 mg de **ritonavir** en postprandial.
- **Partie 2** : Cet essai en double aveugle a compris 29 sujets ayant reçu une administration par voie orale de doses répétées (deux prises par jour pendant 10 jours, à jeun, avec 100 mg de **ritonavir** dans tous les groupes). Chaque escalade de dose a été décidée à la suite des données de sécurité, tolérance et de pharmacocinétique obtenues de la dose précédente.
  - **nirmatrelvir** 75 mg (n = 4) ou placebo (n = 2\*). \*un patient a arrêté l'essai.
  - **nirmatrelvir** 250 mg (n = 4) ou placebo (n = 2).
  - **nirmatrelvir** 500 mg (n = 7) ou placebo (n = 4).
  - **nirmatrelvir** 250 mg (n = 4) ou placebo (n = 2), participants japonais.
- **Partie 3** : Cet essai ouvert a compris 12 sujets afin d'évaluer la biodisponibilité et l'impact de l'alimentation après administration de 250 mg de **nirmatrelvir**.
- **Partie 4** : Cet essai ouvert a compris 6 participants afin d'étudier le métabolisme et l'excrétion après une administration de 300 mg de **nirmatrelvir** avec 100 mg de ritonavir.
- **Partie 5** : Cet essai croisé en double aveugle a compris 10 sujets afin d'étudier l'exposition suprathérapeutique. Une période de 5 jours d'espacement entre les traitements a été suivie. Une dose de 2250 mg de **nirmatrelvir** ou un placebo a été administré en 3 fois 750 mg à 0, 2 et 4 heures. Le **ritonavir** (100 mg) a été administré à -12, 0 et 12 heures par rapport à la première prise de **nirmatrelvir** ou de placebo.

Différents critères d'évaluation principaux et secondaires ont été fixés pour chaque parties de cet essai et sont détaillés dans l'article ou sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)<sup>109,110</sup>. Pour les parties 1, 2 et 5, les mêmes critères principaux ont été utilisés, à savoir : le nombre de participants présentant des effets indésirables, le nombre de participants

présentant un changement des paramètres vitaux (tension artérielle, température, fréquence respiratoire et pouls) et de l'ECG par rapport à la normale, ainsi que le nombre de participants ayant des résultats d'analyse biologique de laboratoire anormaux (paramètres non décrits).

### **Résultats :**

Résultats de sécurité :

- Aucun effet indésirable grave n'a été reporté durant cet essai. Les effets indésirables apparus sous traitement étaient légers.
- Aucun effet dose-dépendant n'a été observé dans l'apparition des effets indésirables. Il n'y a pas eu de modifications significatives des analyses de biologiques de laboratoire, des paramètres vitaux et de l'ECG.

Résultats de pharmacocinétique :

- L'étude sur dose unique (partie 1) a montré une augmentation de l'exposition plasmatique dose-dépendante (figure 19-1). La  $C_{max}$  passe de 667,7 à 1538 ng/mL entre la dose 150 et 1500 mg et l'AUC est multipliée par deux entre la dose 150 et 500 mg. L'exposition plasmatique est également nettement améliorée lors de la co-administration avec le **ritonavir** (figure 19-1). A la dose de 250/100 mg de **nirmatrelvir/ritonavir**, la  $C_{max}$  est de 2882 ng/mL soit 4 fois plus élevée que 500 mg de **nirmatrelvir** seul, et l'AUC est également augmentée d'un facteur 5. A cette dose, la demi-vie est d'environ 7 h et la  $T_{max}$  de 2,75 h.
- L'étude sur doses répétées (partie 2) a montré que la concentration plasmatique du **nirmatrelvir** atteint un équilibre (ou « steady state ») au 2<sup>ème</sup> jour pour toutes les doses, et cet équilibre est maintenu jusqu'au dixième jour de traitement (figure 19-2).
- Des simulations ont montré qu'à la dose de 300 mg de **nirmatrelvir** associé à 100 mg de **ritonavir**, la concentration libre 12 heures après la première prise serait supérieure à la concentration efficace ( $EC_{90}$  *in vitro*), chez plus de 90% des participants.
- L'étude de l'excrétion du **nirmatrelvir** (partie 4) a montré que la molécule est excrétée dans les urines (48,6%) et les fèces (35,3%). Le profil de métabolisation a été étudié dans trois matrices (le plasma, les urines et les fèces) et a révélé que le **nirmatrelvir** se trouve majoritairement sous forme inchangée.
- La prise du traitement avec **ritonavir** à jeun ou après un repas n'a pas eu d'impact important sur la pharmacocinétique dans l'étude de la partie 1 (figure 19-1). Une légère augmentation de la  $C_{max}$  (d'un facteur 1,15) a été observée, l'impact sur l'AUC n'a en revanche pas été significatif. La  $T_{max}$  a été décalée de 1,25 h et la demi-vie a augmenté d'une heure.

### **Conclusion :**

Le **nirmatrelvir** s'est avéré sûr et bien toléré dans les cohortes de doses uniques, répétées et suprathérapeutiques. La dose de 300 mg de **nirmatrelvir** associée à

100 mg de **ritonavir** été choisie pour la suite des essais cliniques, avec deux prises par jour pendant 5 jours.

Tableau 7 – Synthèse de l'essai clinique de phase 1 du **nirmatrelvir** et du **nirmatrelvir/ritonavir** en doses uniques ou répétées chez le sujet sain<sup>109,110</sup>.

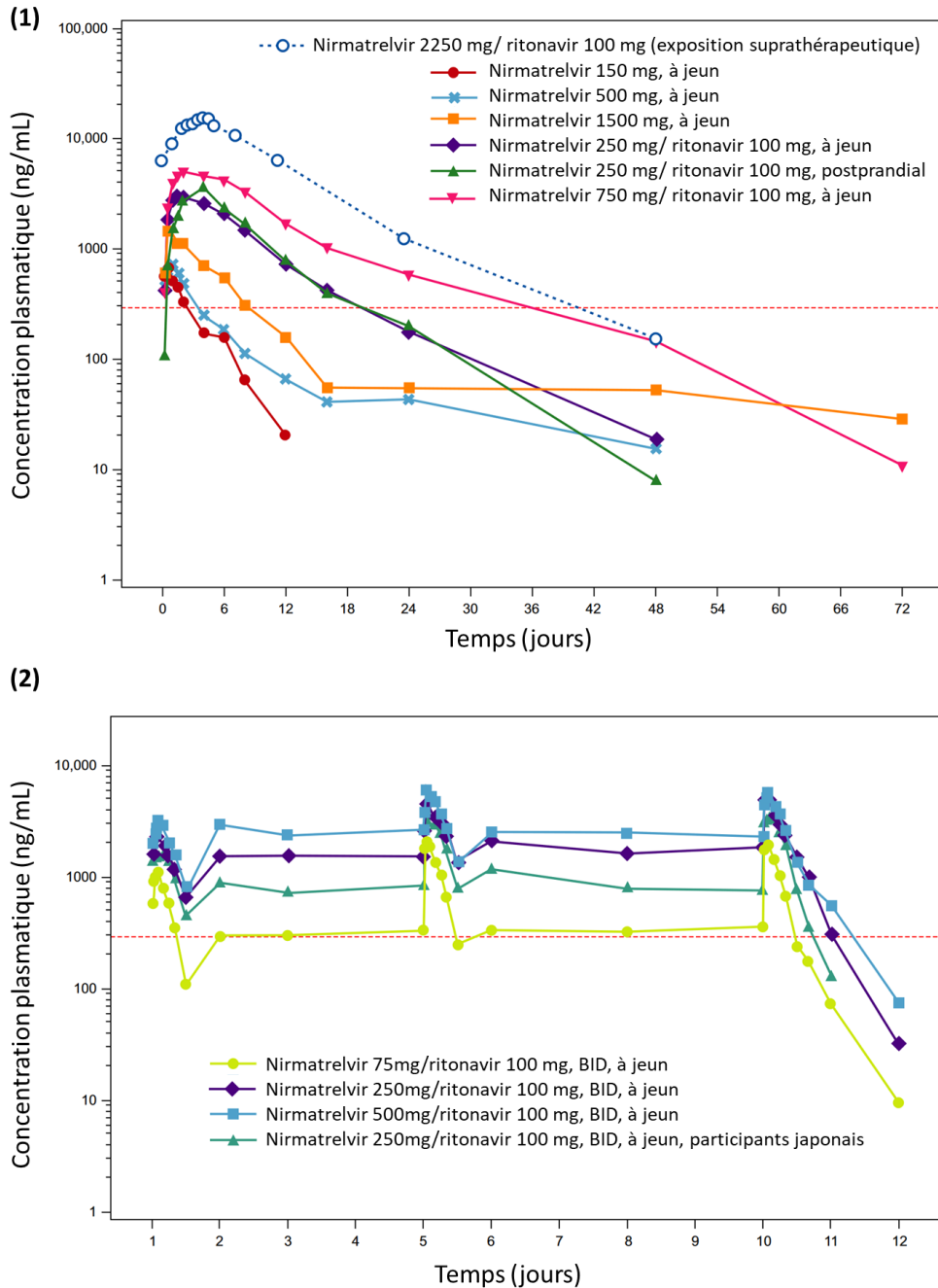


Figure 19 – Exposition plasmatique du **nirmatrelvir** après administration de doses uniques et suprathérapeutiques (1) et répétées (2) chez l'Homme.

La ligne pointillée rouge correspond à la valeur d'EC<sub>90</sub> (corrigée par rapport à la fraction libre), à savoir 292 ng/mL.

Figure adaptée de Singh *et al.*<sup>110</sup>.

### 1.2.2. Étude de phase 2/3

L'objectif de cette phase 2/3 a été d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'association **nirmatrelvir/ritonavir** par voie orale chez des patients adultes atteints de formes légères à modérées de la COVID-19, non-hospitalisés, et à risque de développer une forme sévère (NCT04960202). Cette étude porte également le nom de EPIC-HR (« Evaluation of Protease Inhibition for COVID-19 in High-Risk Patients »). Les résultats de cet essai figurent dans le rapport de l'AEM et ont été publiés sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) et dans la littérature<sup>109,111</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de l'essai clinique (tableau 8).

#### **Méthode :**

Il s'agit d'un essai multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé contre placebo réalisé entre juillet et avril 2022. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible dans l'article ou sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)<sup>109,111</sup>.

Les 2246 patients inclus ont été randomisés en 2 groupes pour recevoir par voie orale toutes les 12 heures pendant 5 jours l'association 300 mg de **nirmatrelvir** + 100 mg de **ritonavir** (n = 1120) ou un placebo (n = 1126).

Le critère d'évaluation principal était le pourcentage de patients pour lesquels sont survenus une hospitalisation ou un décès en lien avec la COVID-19. De nombreux critères d'évaluation secondaires ont été choisis, la liste détaillée se trouve dans l'article ou sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)<sup>109,111</sup>.

#### **Résultats :**

Sur les 2246 patients, 2102 ont complété l'étude (à 34 jours), avec 1053 dans le groupe traité et 1049 dans le groupe placebo.

Résultats d'efficacité :

- Chez les patients traités dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes et n'ayant pas reçu d'anticorps monoclonaux, l'association **nirmatrelvir/ritonavir** a permis de diminuer le risque de d'hospitalisation et de décès de 88,9% par rapport au placebo. 9 décès ont été reportés dans le groupe placebo, aucun dans le groupe traité.
- Chez les patients traités dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes, le risque d'hospitalisation et de décès a été diminué de 87,8%. 12 décès ont été reportés dans le groupe placebo, aucun dans le groupe traité.

Résultat concernant la charge virale :

- La détection et la quantification de la charge virale par RT-qPCR a été fait à partir d'un prélèvement par écouvillonnage nasopharyngé chez 70% des patients de l'essai.

- Entre le 1<sup>er</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, une réduction significative de 0,868 log<sub>10</sub> copies/mL a été observée dans le groupe traité par rapport au placebo (chez les patients traités dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes) et de 0,695 log<sub>10</sub> copies/mL (chez les patients traités dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes).

Résultats de sécurité :

- L'incidence d'effets indésirables pendant la période de traitement s'est avérée similaire dans les deux groupes (traités ou placebo), avec une majorité d'effets indésirables légers ou modérés (grades 1 à 2). Le traitement semble causer plus fréquemment une dysgueusie, des vomissements et de la diarrhée.
- En revanche, le groupe traité a montré moins d'effets indésirables graves ou sévères (grade 3, 4 et 5) par rapport au placebo et moins d'effets indésirables conduisant à l'arrêt de l'essai.
- Au total sur 34 jours, 13 décès ont été comptabilisés dans le groupe placebo, tous liés à la COVID-19. Aucun décès n'a été reporté dans le groupe traité.

### **Conclusion :**

Le traitement d'une forme symptomatique de la COVID-19 avec l'association **nirmatrelvir/ritonavir** a permis une réduction importante du risque de progression vers une forme sévère de la COVID-19 ainsi qu'une diminution rapide de la charge virale. Le traitement s'est avéré efficace et globalement bien toléré.

Tableau 8 – Synthèse de l'essai clinique EPIC-HR de phase 2/3 de l'association **nirmatrelvir/ritonavir** chez les patients atteints de formes légères à modérées de la COVID-19, non-hospitalisés et à risque de développer une forme sévère<sup>109,111</sup>.

### **1.3. Autorisation de mise sur le marché**

Les études cliniques sur le **nirmatrelvir** ont été un succès et ont permis de démontrer son efficacité, sa sécurité et sa tolérance. L'association **nirmatrelvir/ritonavir** (sous le nom de spécialité PAXLOVID™) a reçu une autorisation de mise sur le marché européenne conditionnelle par l'Agence Européenne du Médicament le 28 janvier 2022, grâce à une procédure accélérée<sup>109</sup>. L'autorisation de mise sur le marché conditionnelle permet d'autoriser un médicament qui répond à un besoin médical non satisfait, et ce avant que des données d'efficacité et de sécurité à long terme ne soient disponibles. Elle ne peut être accordée que si les bénéfices sont supérieurs aux risques d'après les résultats cliniques préliminaires disponibles. Cette autorisation conditionnelle a évolué vers une autorisation complète le 24 février 2023. Le **nirmatrelvir** est le seul inhibiteur de 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 à être autorisé en Europe. En France, avant d'être prescrit dans le cadre de son AMM, le PAXLOVID™ a obtenu une AAP (Autorisation d'Accès Précoce) entre le 20 janvier et le 6 mai 2022 par la

HAS (Haute Autorité de Santé)<sup>153</sup>. Le 25 avril 2022, suite à l'avis de l'ANSM, la CT (Commission de la Transparence) a publié un avis favorable au remboursement du PAXLOVID™<sup>154</sup>. Ils ont notamment déterminé que ce médicament représentait un SMR (Service Médical Rendu) important, et une ASMR (Amélioration du Service Médical Rendu) de niveau III ou modérée. Le PAXLOVID™ a également été autorisé dans de nombreux pays comme les Etats-Unis, le Royaume-Uni, le Canada, la Chine ou encore la Corée du Sud.

Dans l'AMM européenne, le PAXLOVID™ est indiqué chez l'adulte présentant un risque élevé d'évoluer vers une forme grave de la COVID-19 et ne nécessitant pas d'oxygénothérapie. Cette spécialité se présente sous la forme de comprimés contenant 300 mg de **nirmatrelvir** (2 comprimés de 150 mg) et d'un comprimé de 100 mg de **ritonavir** à prendre simultanément à chaque prise. La posologie recommandée est d'une prise toutes les 12 heures pendant 5 jours.

## 2. L'ensitrelvir

L'**ensitrelvir**, ou **S-217622**, est une molécule ayant été développée par la société Shionogi en partenariat avec l'université d'Hokkaido au Japon. Cette molécule a fait l'objet d'un travail de chimie médicinale et a été rapidement désignée comme candidat médicament intéressant lors de la crise sanitaire. Ce composé s'est avéré très puissant sur la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 comme illustré figure 14<sup>140</sup>. L'**ensitrelvir** a également montré une bonne efficacité dans des tests antiviraux sur cellules infectées par 5 espèces de coronavirus, indiquant son potentiel en tant que pan-inhibiteur. Cette molécule était donc prometteuse dans la lutte contre le SARS-CoV-2 mais également contre les coronavirus en général.

### 2.1. Données précliniques

Tout comme le **nirmatrelvir**, l'**ensitrelvir** a fait l'objet de nombreuses expériences précliniques *in vivo* et *in vitro* afin d'évaluer son mode d'action, son efficacité et son profil pharmacocinétique. Dans cette partie, le développement préclinique sera illustré par les résultats majeurs de certains tests *in vitro* et *in vivo* relatifs à la pharmacodynamie et la pharmacocinétique du composé. Des données complémentaires sont disponibles dans la littérature<sup>140,141</sup>.

#### 2.1.1. Mode de liaison

Contrairement au **nirmatrelvir**, l'**ensitrelvir** est un inhibiteur non peptidomimétique et se lie de façon non covalente à la protéase 3CL. La structure radiocristallographique



figure 20 illustre les interactions clés de l'**ensitrelvir** au niveau du site catalytique de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2<sup>140</sup>. Le triazole se loge dans la poche S1 et fait une liaison hydrogène avec la chaîne latérale du résidu His163. Dans la poche hydrophobe S2, on retrouve le groupement trifluorobenzène. Le cycle 6-chloro-2méthyl-2H-indazole se situe dans la poche S1' et réalise une liaison hydrogène avec le squelette du résidu Thr26. Les deux atomes d'oxygène des carbonyles du noyau central triazine établissent des liaisons hydrogènes avec le squelette des résidus Glu166 et Gly143.

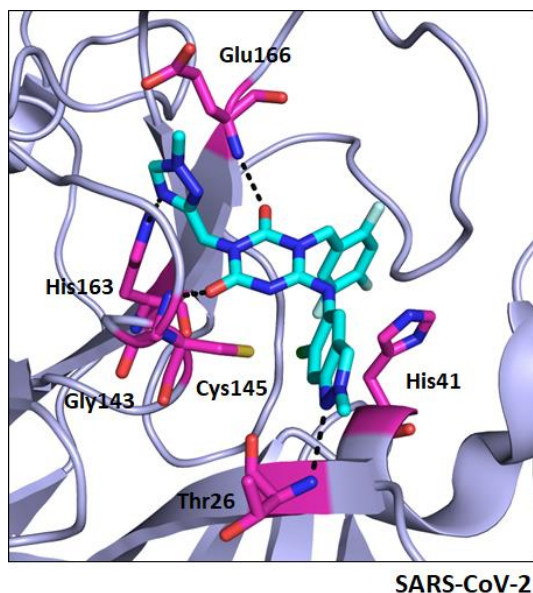


Figure 20 – Structure radiocristallographique de l'**ensitrelvir** dans la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2. Les résidus impliqués dans des interactions clés sont représentés en stick rose et l'**ensitrelvir** en cyan. Les lignes pointillées indiquent les liaisons hydrogènes. Figure générée avec le logiciel PyMol (Schrodinger LLC), PDB : 7VU6<sup>140</sup>.

### 2.1.2. Données pharmacocinétiques

La stabilité métabolique de l'**ensitrelvir** a été évaluée *in vitro*<sup>140</sup>. La molécule a montré une très bonne stabilité métabolique avec 96% et 88% dans les expériences sur microsomes hépatiques humains et de rat respectivement. Ces pourcentages correspondent au composé non métabolisé après 30 minutes.

Le profil ADME de la molécule a été évalué dans des expériences *in vivo* chez le rat, le singe et le chien<sup>140</sup>. Les résultats sont présentés tableau 9. Chez le rat, l'**ensitrelvir** présente une très bonne biodisponibilité par voie orale et une faible clairance. Chez le singe et le chien, le profil pharmacocinétique est également très bon avec une bonne biodisponibilité par voie orale, une faible clairance et une demi-vie d'élimination longue. Ces résultats ont suggéré qu'une administration d'**ensitrelvir** une fois par jour pourrait être suffisante pour conserver une concentration efficace.

Espèce	Dose	Cl <sub>totale</sub> (mL/min/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	F orale (%)
Rat	0,5 µmol/mL/kg (IV)	1,7 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	-
	1 µmol/5 mL/kg (PO)	-	-	96,7 <sup>a</sup>
Singe	0,1 mg/0,2 mL/kg (IV)	0,29 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	-
	3 mg /2 mL/kg (PO)	-	-	106 <sup>b</sup>
Chien	0,1 mg/0,2 mL/kg (IV)	0,17 <sup>a</sup>	29,5 <sup>a</sup>	-
	3 mg /2 mL/kg (PO)	-	-	64,7 <sup>b</sup>

Tableau 9 – Paramètres pharmacocinétiques de l'**ensitrelvir** sur dose unique chez le rat, le singe et le chien<sup>140</sup>.

Expérience réalisée chez le rat (mâle), le chien (mâle) et le singe (femelle), après administration d'une dose unique d'**ensitrelvir** par voie intraveineuse (IV) ou orale (PO). Pour la biodisponibilité par voie orale chez le singe et le chien, la forme **acide fumarique ensitrelvir** a été utilisée. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne (n = 2<sup>a</sup> ou n = 3<sup>b</sup>).

### 2.1.3. Données pharmacodynamiques

Une expérience *in vivo* de preuve de concept a été menée sur un modèle de souris BALB/c infectées par le SARS-CoV-2 (variant gamma)<sup>140</sup>. Les souris infectées ont été traitées immédiatement après infection et à 12 heures post-infection avec 2, 8, 16 ou 32 mg/kg d'**acide fumarique ensitrelvir**, ou avec le véhicule. Les souris ont été sacrifiées 24 heures après l'infection. Les résultats obtenus sont présentés figure 20-1. La charge virale a été dosée dans les poumons (TCID<sub>50</sub> ou « Tissue Culture Infectious Dose 50% »). On peut voir que chez les souris traitées, la charge virale a été diminuée de façon significative et dose dépendante par rapport au groupe véhicule (figure 21-1). Selon le même modèle, une seconde expérience *in vivo* a été réalisée afin de suivre l'exposition plasmatique chez les souris infectées. Une seule administration d'**acide fumarique ensitrelvir** a été faite immédiatement après infection. Les résultats sont illustrés figure 21-2 et indiquent que la concentration plasmatique augmente de façon dose-dépendante. A la dose de 16 mg/kg, la concentration plasmatique a été estimée comme étant supérieure à l'EC<sub>50</sub> (corrigée par rapport à la fraction libre), à savoir 2090 ng/mL chez la souris.

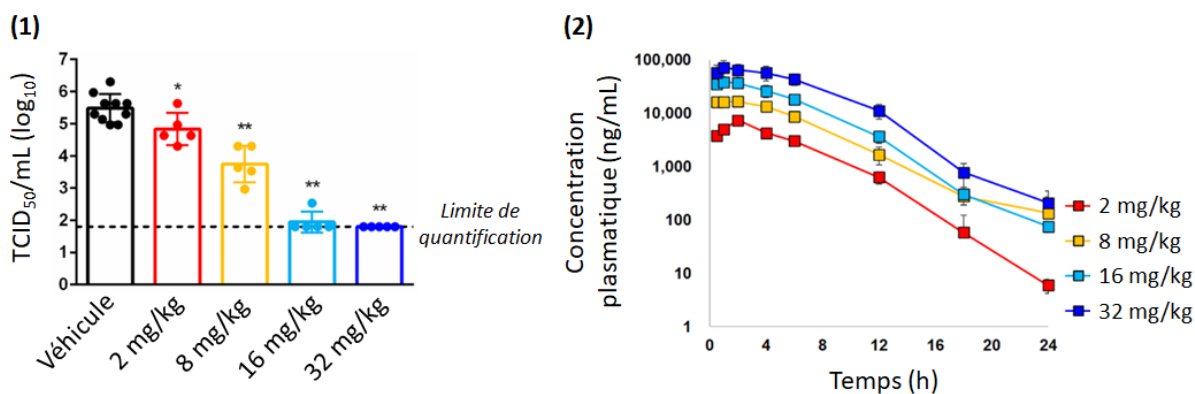


Figure 21 – Efficacité et concentration plasmatique *in vivo* de l'**ensitrelvir** dans un modèle de souris infectées par un variant gamma du SARS-CoV-2.

(1) Suivi de la charge virale dans le poumon. Les souris ont été traitées par voie orale avec 2, 8, 16 ou 32 mg/kg d'**acide fumarique ensitrelvir** (n = 5) ou le véhicule (n = 10) immédiatement après infection et 12 heures post-infection. Les animaux ont été sacrifiés 24 heures après infection.

(2) Exposition plasmatique sur 24 heures. Les souris ont été traitées par voie orale avec 2, 8, 16 ou 32 mg/kg d'**acide fumarique ensitrelvir** (n = 4) immédiatement après infection.

Figure adaptée de *Unoh et al.*<sup>140</sup>.

D'autres expériences *in vivo* ont été réalisées sur un modèle de hamsters infectés par le SARS-CoV-2<sup>155,156</sup>. Dans la première expérience, les hamsters ont été infectés par un variant delta du SARS-CoV-2 et ont reçu immédiatement post-infection une administration de 30 ou 200 mg/kg d'**ensitrelvir**, de **molnupiravir** (molécule de référence) ou le véhicule, par voie orale deux fois par jour pendant 5 jours<sup>141</sup>. Les résultats sont illustrés figure 22. On peut voir tout d'abord que la perte de poids observée dans le groupe véhicule (15% de perte 4 à 7 jours post-infection) n'a pas été observée dans les groupes traités (figure 22-1). Le titre viral (exprimé en pfu/tissu, « Plate Forming Unit ») est également diminué par rapport au groupe véhicule que ce soit au niveau nasal ou pulmonaire avec la dose de 200 mg/kg (figure 22-2). Dans la suite de cette expérience, l'efficacité du traitement sur la transmission virale a été évaluée en mélangeant dans le même environnement des hamsters traités et infectés (selon le schéma présenté précédemment), avec des hamsters non infectés et non traités. Les résultats (figure 22-3) montrent que l'**ensitrelvir** est également efficace pour diminuer la transmission du SARS-CoV-2.

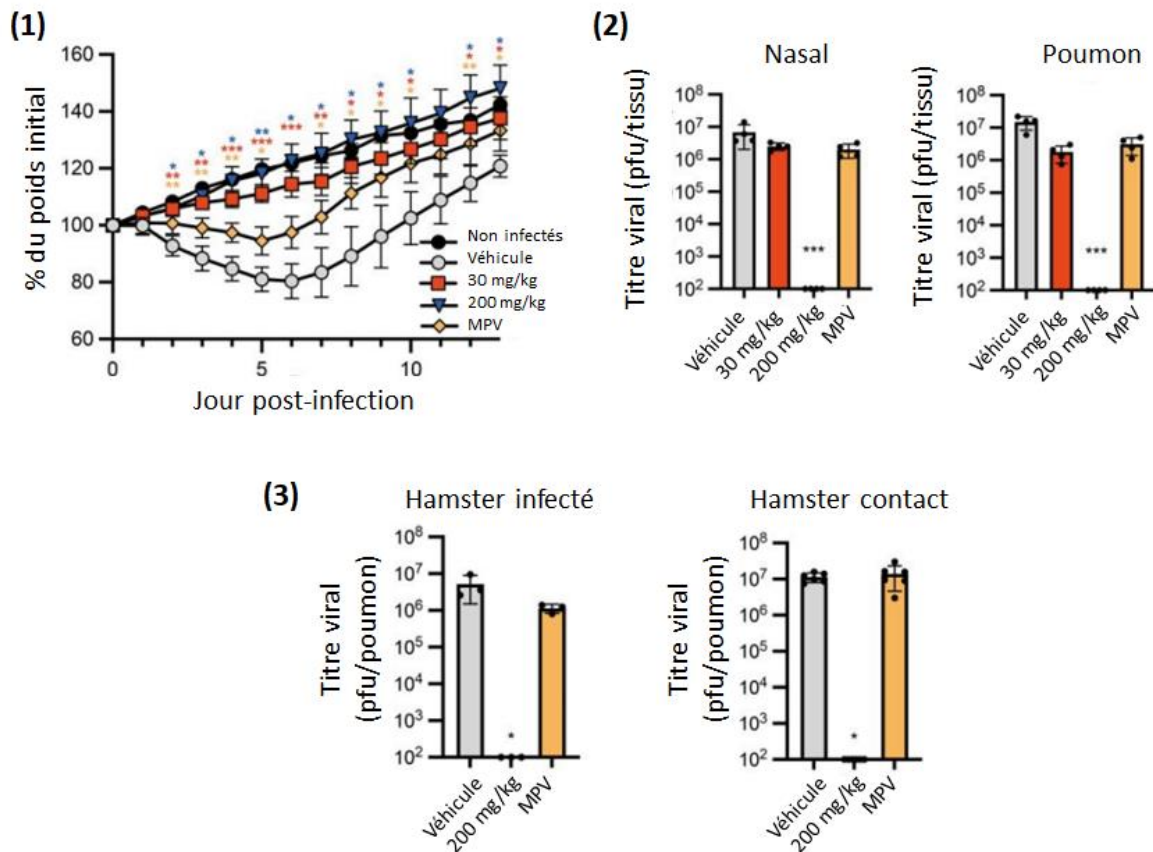


Figure 22 – Efficacité de la prise immédiate d'ensitrelvir dans un modèle de hamsters infectés par un variant delta du SARS-CoV-2.

(1-2) Efficacité du traitement sur la maladie : 4 hamsters infectés par groupe, et traités par voie orale avec 30 ou 200 mg/kg d'ensitrelvir, le véhicule, ou le molnupiravir (MPV). Les hamsters ont été traités deux fois par jours pendant 5 jours, immédiatement après l'infection. Cette expérience a été réalisée deux fois en parallèle avec un sacrifice des animaux 4 jours ou 18 jours post-infection. Le groupe sacrifié 4 jours post-infection n'a pas reçu les deux dernières administrations.

(1) Suivi du poids dans le groupe de hamsters sacrifiés 18 jours après infection. Les hamsters ont été pesés tous les jours pendant 13 jours. Un groupe de 3 hamsters non infectés a également été ajouté à l'expérience.

(2) Titre viral dosé dans un prélèvement nasal ou dans les poumons dans le groupe de hamsters sacrifiés 4 jours post-infection.

(3) Efficacité du traitement sur la transmission : un hamster par cage a été traité par voie orale avec 200 mg/kg d'ensitrelvir, le véhicule ou le molnupiravir avec une administration deux fois par jours pendant 5 jours immédiatement après infection. Dans cette même cage, deux hamsters non infectés et non traités ont été placés immédiatement en contact. Les hamsters infectés ont été sacrifiés 5 jours post-infection et les hamsters contact 6 jours après le partage de la cage. Le titre viral a été dosé dans un prélèvement nasal ou dans les poumons. Cette expérience a été réalisée en n = 3.

Figure adaptée de Sasaki *et al.*<sup>141</sup>.

Une seconde expérience a été réalisée sur le même modèle de hamsters infectés et selon les mêmes conditions, excepté que le traitement a été initié cette fois 24 heures post-infection<sup>141</sup>. Les résultats indiquent que dans les groupes véhicule et molnupiravir, une perte de poids d'environ 10% est observée à 5/6 jours post-infection (figure 22-1). Cette perte de poids est limitée à 7% et 5% dans les groupes traités avec 30 et 200 mg/kg d'ensitrelvir respectivement. On peut également voir que

la reprise de poids est accélérée dans les groupes traités. Concernant le titre viral, le traitement a eu peu d'effet au niveau nasal mais une diminution significative a été observée dans le poumon (figure 22-2).

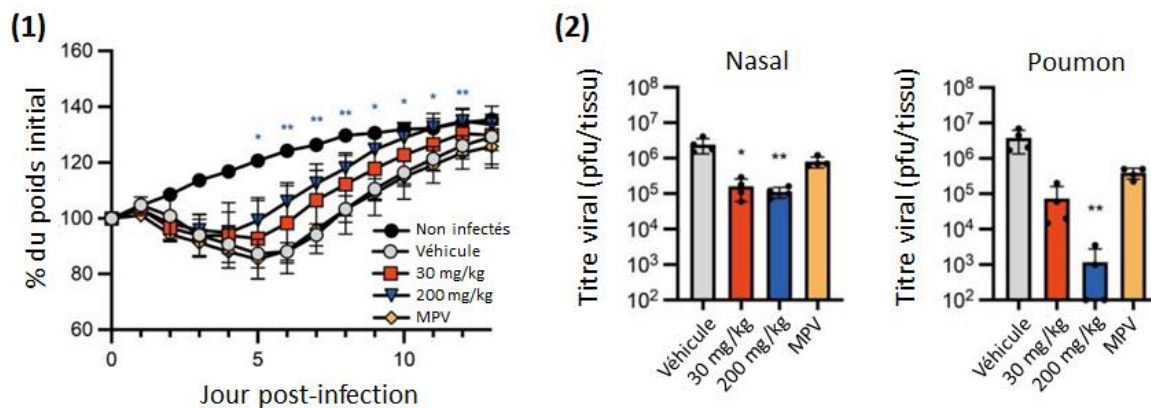


Figure 23 – Efficacité de la prise retardée d'ensitrelvir dans un modèle de hamsters infectés par un variant delta du SARS-CoV-2.

Dans cette expérience, les hamsters infectés ont été traités ou non par voie orale avec 30 ou 200 mg/kg d'ensitrelvir, le véhicule, ou le molnupiravir (MPV) (4 hamsters par groupe). Les hamsters ont été traités deux fois par jours pendant 5 jours, 24 heures après l'infection. Cette expérience a été réalisée deux fois en parallèle avec un sacrifice des animaux 4 jours ou 18 jours post-infection. Le groupe sacrifié 4 jours post-infection n'a pas reçu les 4 dernières administrations.

(1) Suivi du poids dans le groupe de hamsters sacrifiés 18 jours après infection. Les hamsters ont été pesés tous les jours pendant 13 jours. Un groupe de 3 hamsters non infectés a également été ajouté à l'expérience.

(2) Titre viral dosé dans un prélèvement nasal ou dans les poumons dans le groupe de hamsters sacrifiés 4 jours post-infection.

Figure adaptée de Sasaki *et al.*<sup>141</sup>.

*In vitro*, l'ensitrelvir s'est avéré sélectif de la 3CL<sup>pro</sup>. Il n'exerce pas d'activité inhibitrice sur différentes protéases humaines (caspase-2, chymotrypsin, cathepsin B/D/G/L et thrombin)<sup>140</sup>. Également, aucun problème de sécurité n'a été décelé dans différentes expériences, à savoir aucune inhibition de hERG, un test de Ames négatif, un test des micronoyaux négatif et aucune phototoxicité.

Tout comme le nirmatrelvir, l'efficacité de l'ensitrelvir face aux différents variants a été évaluée *in vitro* sur cellules infectées<sup>140,157</sup>. La molécule s'est avérée efficace sur les variants alpha, beta, gamma, delta et omicron comme illustré tableau 10.

L'analyse détaillée des mutants de la 3CL<sup>pro</sup> fréquemment identifiés en clinique a été également réalisée<sup>157</sup>. Ils présentent une activité enzymatique similaire à l'enzyme wild-type comme le montrent les valeurs de Km qui sont du même ordre de grandeur (constante de Michaelis-Menten, tableau 11). Dans un test enzymatique, l'activité inhibitrice de l'ensitrelvir sur ces mutants a donné des IC<sub>50</sub> similaires par rapport à l'enzyme wild-type comme illustré tableau 11.

	<b>Souche «wild-type »</b>	<b>Variant alpha</b>	<b>Variant beta</b>	<b>Variant gamma</b>	<b>Variant delta</b>	<b>Variant omicron</b>
<b>EC<sub>50</sub> (µM)</b>	0,37	0,33	0,40	0,50	0,41	0,29

Tableau 10 – Activités antivirales *in vitro* de l'**ensitrelvir** sur différents variants de SARS-CoV-2<sup>140,157</sup>.

Les données proviennent d'un test sur cellules VeroE6/TMPRSS2 (n=3). Le niveau d'infection a été déterminé luminescence après 3 à 4 jours d'infections. Les souches utilisées sont répertoriées dans le NIID (« National Institute of Infectious Diseases ») du Japon comme suit : hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 (wild-type), hCoV-19/Japan/ QK002/2020 (alpha, B.1.1.7), hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (Gamma, P.1), hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 (beta, B.1.351), hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 (delta, B.1.617.2), et hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 (Omicron, B.1.1.529).

	<b>Km (µM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>
<b>WT</b>	14,92	13,2
<b>G15S</b>	16,75	8,0
<b>T21I</b>	12,81	14,3
<b>T24I</b>	17,28	14,0
<b>K88R</b>	14,05	12,1
<b>L89F</b>	11,77	15,0
<b>K90R</b>	13,52	9,7
<b>P108S</b>	11,11	13,2
<b>P132H</b>	17,06	14,4
<b>A193V</b>	11,53	10,2
<b>H246Y</b>	23,42	12,5
<b>A255V</b>	15,45	10,1

Tableau 11 – Activités enzymatiques de mutants de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 et IC<sub>50</sub> de l'**ensitrelvir**<sup>157</sup>.

Les données de cinétique enzymatique proviennent d'un test FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») suivant la fluorescence (n = 2) et les données d'inhibition ont été obtenues par spectrométrie de masse (n = 3).

Dans le modèle de hamsters infectés, une expérience a été également réalisée en infectant les hamsters avec différents variants : alpha, gamma, omicron/BA.1, omicron/BA.2, omicron/BA.5 et omicron/BA.2.75<sup>141</sup>. L'administration par voie orale d'une dose de 200 mg/kg d'**ensitrelvir** a permis de diminuer efficacement le titre viral dans le poumon par rapport au groupe véhicule face à tous les variants comme illustré figure 24.



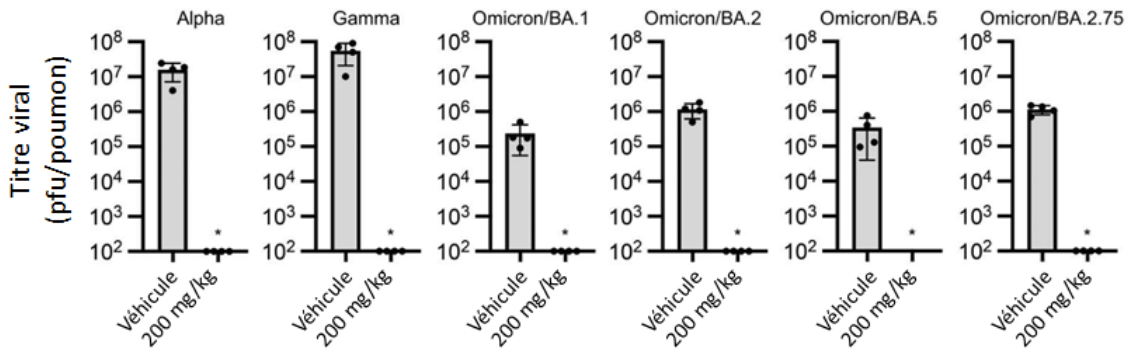


Figure 24 – Efficacité de la prise immédiate d'**ensitrelvir** dans un modèle de hamsters infectés par différents variants du SARS-CoV-2.

Efficacité du traitement sur la maladie : 4 hamsters infectés par groupe, et traités par voie orale avec 200 mg/kg d'**ensitrelvir** ou le véhicule. Les hamsters ont été traités deux fois par jours pendant 4 jours, immédiatement après l'infection. Les animaux ont été sacrifiés 4 jours post-infection. Le titre viral a été dosé dans les poumons.

Figure adaptée de Sasaki *et al.*<sup>141</sup>.

## 2.2. Données cliniques

### 2.2.1. Étude de phase 1

Dans cette phase 1, l'objectif a été d'évaluer la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique de l'**acide fumarique ensitrelvir** chez le sujet sain (jRCT2031210202, numéro de registre japonais). Les résultats de cet essai ont été publiés dans la littérature<sup>142</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de l'essai clinique (tableau 12).

#### **Méthode :**

Dans cet essai multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé contre placebo, 83 sujets sains adultes ont été inclus entre juillet et décembre 2021. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible dans l'article<sup>142</sup>.

Cet essai s'est divisé en 2 parties :

- **Partie 1** : Cet essai a inclus 50 participants hommes japonais randomisés pour une administration par voie orale d'une dose unique d'**acide fumarique ensitrelvir** (20, 70, 250, 500, 1000 ou 2000 mg) ou d'un placebo.
  - **Cohorte A** : **acide fumarique ensitrelvir** 20 mg (n = 6) ou placebo (n = 2), à jeun.
  - **Cohorte B** : **acide fumarique ensitrelvir** 70 mg (n = 6) ou placebo (n = 2), à jeun.
  - **Cohorte C** : **acide fumarique ensitrelvir** 250 mg (n = 8) ou placebo (n = 2). L'effet de la nourriture a également été étudié dans cette cohorte en essai croisé.

- *Cohorte D* : **acide fumarique ensitrelvir** 500 mg (n = 6) ou placebo (n = 2), à jeun.
  - *Cohorte E* : **acide fumarique ensitrelvir** 1000 mg (n = 6) ou placebo (n = 2), à jeun.
  - *Cohorte J* : **acide fumarique ensitrelvir** 2000 mg (n = 6) ou placebo (n = 2), à jeun.
- **Partie 2** : Cet essai a inclus 33 participants hommes japonais ou caucasiens pour l'administration d'**acide fumarique ensitrelvir** (375 mg le premier jour suivi de 125 mg entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, ou 750 mg le premier jour suivi de 250 mg entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour), ou d'un placebo pendant 5 jours.
- *Cohorte F* : **acide fumarique ensitrelvir** 375/125 mg (n = 8) ou placebo (n = 3), population japonaise, à jeun.
  - *Cohorte G* : **acide fumarique ensitrelvir** 750/250 mg (n = 8) ou placebo (n = 3), population japonaise, à jeun. L'effet sur la pharmacocinétique du **midazolam** en sirop a été évalué dans cette cohorte en essai croisé : administration de 2 mg de **midazolam** deux jours avant la première prise d'**acide fumarique ensitrelvir** ou de placebo, et co-administration un 6<sup>ème</sup> jour.
  - *Cohorte H* : **acide fumarique ensitrelvir** 375/125 mg (n = 8) ou placebo (n = 3), population caucasienne, à jeun.

### **Résultats :**

#### Résultats de sécurité :

- La plupart des effets indésirables reportés étaient légers et se sont résolus spontanément. Le traitement a été bien toléré.

#### Résultats de pharmacocinétique :

- L'étude sur dose unique (partie 1) a montré une augmentation de l'exposition plasmatique dose-dépendante ( $C_{max}$  à 1,70 µg/mL à la dose de 20 mg et 96,9 µg/mL à la dose de 2000 mg) comme illustré figure 25-1. La valeur de  $T_{max}$  varie de 1,5 et 4 heures et la demi-vie d'élimination est supérieure à 40 heures à toutes les doses.
- L'étude sur doses répétées (partie 2) a également montré une augmentation dose-dépendante de l'exposition plasmatique entre les cohortes F et G (figure 25-2). Le schéma d'administration avec une dose initiale suivi par une dose de maintien plus faible a permis aux deux dosages d'avoir une exposition constante sur la durée du traitement.
- Chez le sujet caucasien, l'exposition plasmatique est légèrement plus faible avec une  $C_{max}$  et une AUC diminuée par rapport au sujet japonais à la même dose administrée (cohortes F et H, figure 25-3).



- La prise du traitement après un repas a eu peu d'effets sur la pharmacocinétique avec une réduction de la  $C_{max}$  de 15%, un décalage de la  $T_{max}$  de 2,5 à 8 h et aucun impact sur l'AUC (cohorte C).
- Concernant l'étude de l'interaction médicamenteuse avec le **midazolam** (cohorte G), les résultats ont montré une augmentation de la  $C_{max}$  d'un facteur 2,8 et de l'AUC d'un facteur 7 du **midazolam** dans les groupes traités avec l'**acide fumarique ensitrelvir** en comparaison au groupe **midazolam** seul. Ces résultats suggèrent que l'**ensitrelvir** est un inhibiteur des cytochromes P450 3A4.

**Conclusion :**

L'administration d'une dose unique ou de doses multiples par voie orale d'**acide fumarique ensitrelvir** a été bien tolérée et a montré une pharmacocinétique favorable permettant une administration une fois par jour.

Tableau 12 – Synthèse de l'essai clinique de phase 1 de l'**acide fumarique ensitrelvir** en doses uniques ou répétées chez le sujet sain<sup>142</sup>.

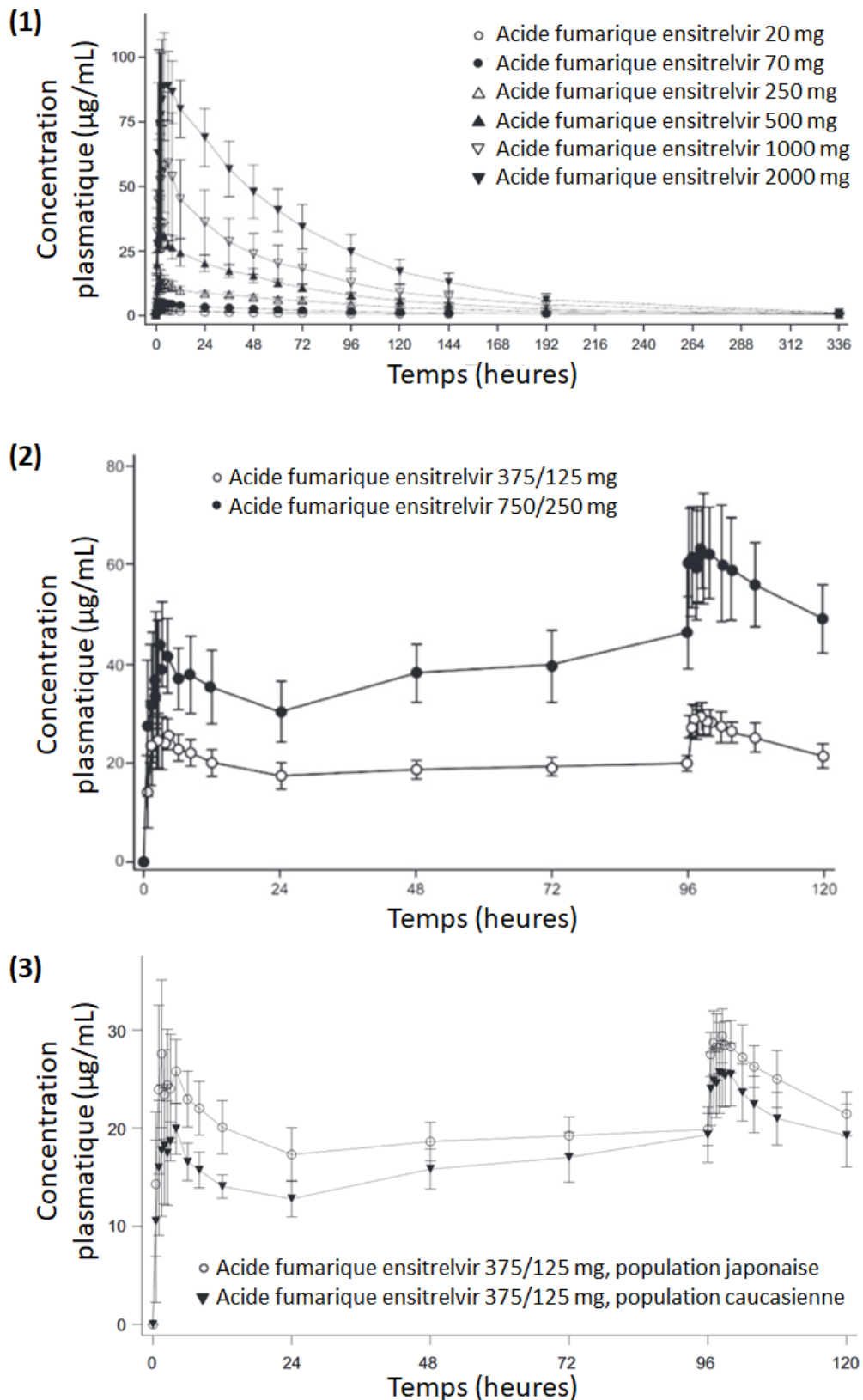


Figure 25 – Exposition plasmatique de l'acide fumarique ensitelvir dans les groupes avec administration de doses uniques (1) et répétées (2 et 3).

(1) Résultats des cohortes A, B, C, D, E et J après un traitement en doses uniques à jeun chez le sujet japonais. (2) Résultats des cohortes F et G après un traitement en doses répétées à jeun chez le sujet japonais. (3) Résultats des cohortes F et H après un traitement en doses répétées à jeun chez le sujet japonais ou caucasien.

Figure adaptée de Shimizu *et al.*<sup>142</sup>.

## 2.2.2. Étude de phase 2

La phase 2 des essais cliniques sur l'**acide fumarique ensitrelvir** a été divisée en deux parties : 2a et 2b (jRCT2031210350, numéro de registre japonais). Le but de la phase 2a a été d'évaluer l'efficacité et la sécurité de la molécule chez les patients présentant une forme légère à modérée de la COVID-19 ou une forme asymptomatique. Concernant la phase 2b, elle visait à évaluer également l'efficacité et la sécurité du traitement mais cette fois chez les patients présentant une forme légère à modérée de la COVID-19 durant l'épidémie avec le variant omicron. Les résultats ont été publiés dans la littérature<sup>143,144</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de la phase 2 (tableaux 13 et 14).

### Phase 2a

#### Méthode :

Dans cet essai multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé contre placebo, 69 patients ont été inclus entre septembre 2021 et janvier 2022. Les patients ont été randomisés pour recevoir les doses 375/125 mg (n = 22) ou 750/250 mg (n = 23) d'**acide fumarique ensitrelvir** (dose au premier jour/dose de maintien), ou le placebo (n = 24) pendant 5 jours. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible dans l'article<sup>143</sup>.

Le critère d'évaluation principal de cette étude était l'évolution du titre viral ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) par rapport au titre viral initial (avant traitement). De nombreux critères d'évaluation secondaires ont été choisis, la liste détaillée se trouve dans l'article<sup>143</sup>.

#### Résultats :

Sur les 69 patients randomisés, 22 ont été exclus de l'analyse des résultats du fait d'un test initial négatif par RT-PCR. Au final, 16 patients ont été comptés avec la dose 375/125 mg d'**acide fumarique ensitrelvir**, 14 patients avec la dose 750/250 mg et 17 patients avec le placebo. Parmi ce patients, 42 étaient atteints du variant delta et 5 du variant omicron.

Résultats d'efficacité :

- Un score a été établi sur la base du suivi de 12 symptômes relatifs à la COVID-19 : toux, dyspnée, maux de tête, maux de gorge, rhinorrhée, pyrexie, frissons, douleurs musculaires, nausée, vomissement, diarrhée et fatigue. Pour chaque symptôme, un score a été attribué en fonction de son intensité : 0 absence, 1 léger, 2 modéré et 3 sévère.
- Le score global prenant en compte ces 12 symptômes a montré une diminution dans les trois groupes par rapport au score initial. Cette diminution est néanmoins plus rapide chez les patients traités (figure 26-1).

- L'analyse des scores par symptômes a montré une amélioration significativement plus rapide des symptômes respiratoires (rhinorrhée, maux de gorge et toux) et de la fièvre dans les groupes traités.

Résultats sur la charge virale :

- Les analyses ont été faites à partir d'un prélèvement par écouvillonnage nasopharyngé.
- De manière générale, le titre viral ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) a diminué jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (3 jours après l'initiation du traitement) puis est resté stable entre le 9<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour à la limite de détection dans tous les groupes (figure 26-2). Ce titre viral s'est montré significativement plus faible au 4<sup>ème</sup> jour dans les groupes traités (0,94 et 0,85  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL aux doses 375/125 et 750/250 mg respectivement) par rapport au groupe placebo (1,74  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL).
- La même tendance s'est dessinée avec le suivi de l'ARN viral ( $\log_{10}$  copies/mL) par RT-PCR avec plus d'un log de différence entre les groupes traités et le groupe placebo au 4<sup>ème</sup> jour (figure 26-3).
- Le délai d'obtention d'un titre viral négatif (à la limite de détection) est plus court chez les patients traités. Au 4<sup>ème</sup> jour, la proportion de patients avec un test positif était de 26,7%, 14,3% et 71,4% dans les groupes 375/125 mg, 750/250 mg et placebo respectivement.

Résultats de sécurité :

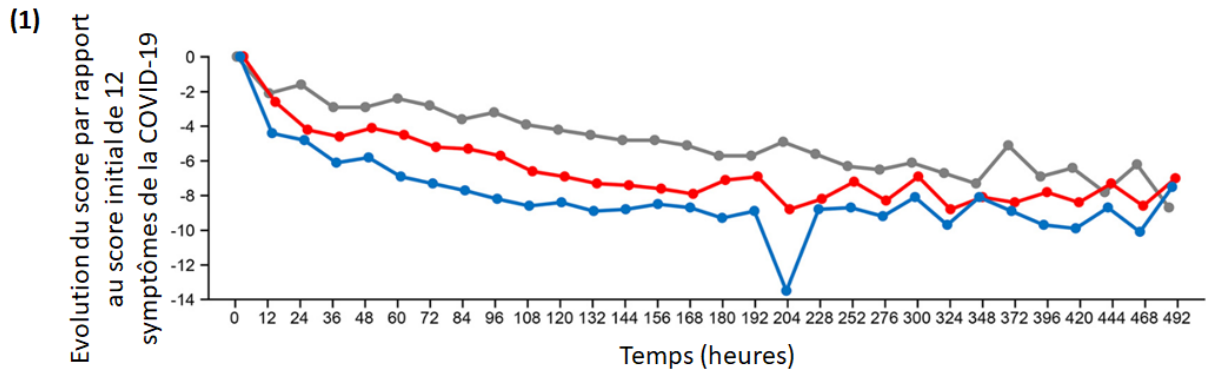
- Les effets indésirables reportés pendant l'essai étaient légers à modérés. Aucun effet indésirable grave ou menant à un arrêt de l'essai et aucun décès n'ont été reportés.

Aucune différence nette n'a cependant été observée entre les deux doses administrées.

### **Conclusion :**

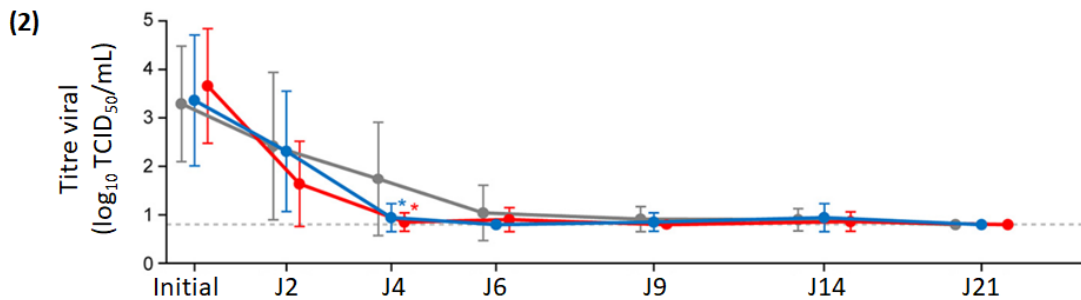
L'administration d'**acide fumarique ensitrelvir** a démontré une clairance rapide du SARS-CoV-2 aux deux doses et a été bien toléré chez les patients présentant une forme asymptomatique, légère ou modérée de la COVID-19.

Tableau 13 – Synthèse de l'essai clinique de phase 2a de l'**acide fumarique ensitrelvir** chez les patients infectés par la COVID-19<sup>143</sup>.



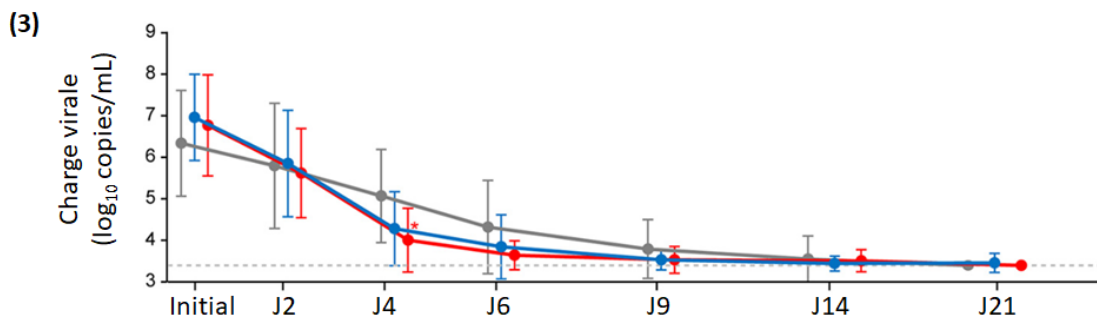
Nombre de patients

	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	204	228	252	276	300	324	348	372	396	420	444	468	492
Placebo	14	14	11	14	13	13	13	14	11	13	13	12	12	13	11	13	8	9	10	11	10	11	10	9	11	10	9	11	6	
250/125 mg	12	12	12	12	12	13	13	12	12	13	12	12	13	12	11	12	2	13	9	13	12	11	11	11	12	10	11	11	4	
750/250 mg	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	6	11	11	11	10	11	11	12	10	12	10	9	5	



Nombre de patients

	Initial	J2	J4	J6	J9	J14	J21
Placebo	14	14	14	13	13	11	10
250/125 mg	15	15	15	15	14	15	15
750/250 mg	14	14	14	14	13	12	11



Nombre de patients

	Initial	J2	J4	J6	J9	J14	J21
Placebo	17	17	17	16	15	13	12
250/125 mg	15	15	15	15	14	15	14
750/250 mg	14	14	14	14	13	12	11

Figure 26 – Résultats d'efficacité de l'étude de phase 2a de l'acide fumarique ensitrelvir.

(1) Evolution du score global des 12 symptômes liés à la COVID-19 par rapport au score initial (avant traitement). (2) Evolution du titre viral à partir d'un écouvillonnage nasopharyngé. (3) Evolution de la charge virale à partir d'un écouvillonnage nasopharyngé.

Figure adaptée de Mukae *et al.*<sup>143</sup>.

## Phase 2b

### **Méthode :**

Dans cet essai multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé contre placebo, 428 patients ont été inclus entre janvier et février 2022. Les patients ont été randomisés pour recevoir les doses 375/125 mg (n = 142) ou 750/250 mg (n = 143) d'**acide fumarique ensitrelvir** (dose au premier jour/dose de maintien), ou le placebo (n = 143) pendant 5 jours. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible dans l'article<sup>144</sup>.

Le critère d'évaluation virologique principal de cette étude était l'évolution du titre viral au 4<sup>ème</sup> jour de traitement par rapport au titre viral initial. Le critère d'évaluation clinique principal a été l'évolution du score global des 12 symptômes présentés phase 2a au 5<sup>ème</sup> jour. De nombreux critères d'évaluation secondaires ont été choisis, la liste détaillée se trouve dans l'article<sup>144</sup>.

### **Résultats :**

Après exclusion des patients avec un titre viral initial négatif (non détecté) et les patients sortis de l'essai, 341 patients ont été inclus dans l'analyse avec 114 patients pour la dose 375/125 mg, 116 patients pour la dose 750/250 mg et 111 patients pour le placebo. Les patients étaient infectés par le variant omicron BA.1 majoritairement (336 sur 341 patients).

Résultats sur l'efficacité :

- Le score global prenant en compte les 12 symptômes liés à la COVID-19 (voir phase 2a) a montré une diminution dans les trois groupes au 5<sup>ème</sup> jour par rapport au score initial (figure 27-1). Cette diminution n'est en revanche pas significative dans les groupes traités par rapport au groupe placebo.
- L'analyse des scores par symptômes a montré une amélioration significative des symptômes respiratoires et de la fièvre aux deux doses. Ces symptômes sont les plus courants avec le variant omicron.

Résultats sur la charge virale :

- Les analyses ont été faites à partir d'un prélèvement par écouvillonnage nasopharyngé.
- De manière générale, le titre viral ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL) a diminué jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour (3 jours après l'initiation du traitement) puis est resté stable jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour à la limite de détection dans tous les groupes (figure 27-2). Ce titre viral s'est montré significativement plus faible au 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jour dans les groupes traités par rapport au groupe placebo (données chiffrées non communiquées).
- Concernant l'ARN viral ( $\log_{10}$  copies/mL), la même tendance a été observée, avec une différence significative aux jours 2, 4, 6 et 9.
- Le délai d'obtention d'un titre viral négatif (à la limite de détection) est plus court chez les patients traités (figure 27-3). Au 4<sup>ème</sup> jour, la proportion de patients avec

un test positif était de 1,9%, 5,4% et 50% dans les groupes 375/125 mg, 750/250 mg et placebo respectivement.

Résultats sur la sécurité :

- Les effets indésirables reportés pendant l'essai étaient légers ou modérés et se sont résolus spontanément. Aucun décès n'a été reporté dans l'étude.
- Deux patients du groupe placebo ont reporté des effets indésirables graves mais n'étant pas lié au traitement (fracture d'une vertèbre et paralysie faciale).
- Les 2 patients dans les groupes traités ayant arrêté le traitement à cause d'effets indésirables n'ont pas eu de séquelles après l'arrêt du traitement (eczéma modéré au 2<sup>ème</sup> jour chez un patient, nausée modérée et légers maux de tête chez un second patient).

Comme pour la phase 2a, cet essai n'a pas permis de conclure sur une réponse dose-dépendante.

**Conclusion :**

L'**acide fumarique ensitrelvir** a montré une bonne efficacité antivirale ainsi qu'un profil de sécurité acceptable chez les patients présentant une forme légère à modérée de la COVID-19.

Tableau 14 – Synthèse de l'essai clinique de phase 2b de l'**acide fumarique ensitrelvir** chez les patients infectés par la COVID-19<sup>144</sup>.

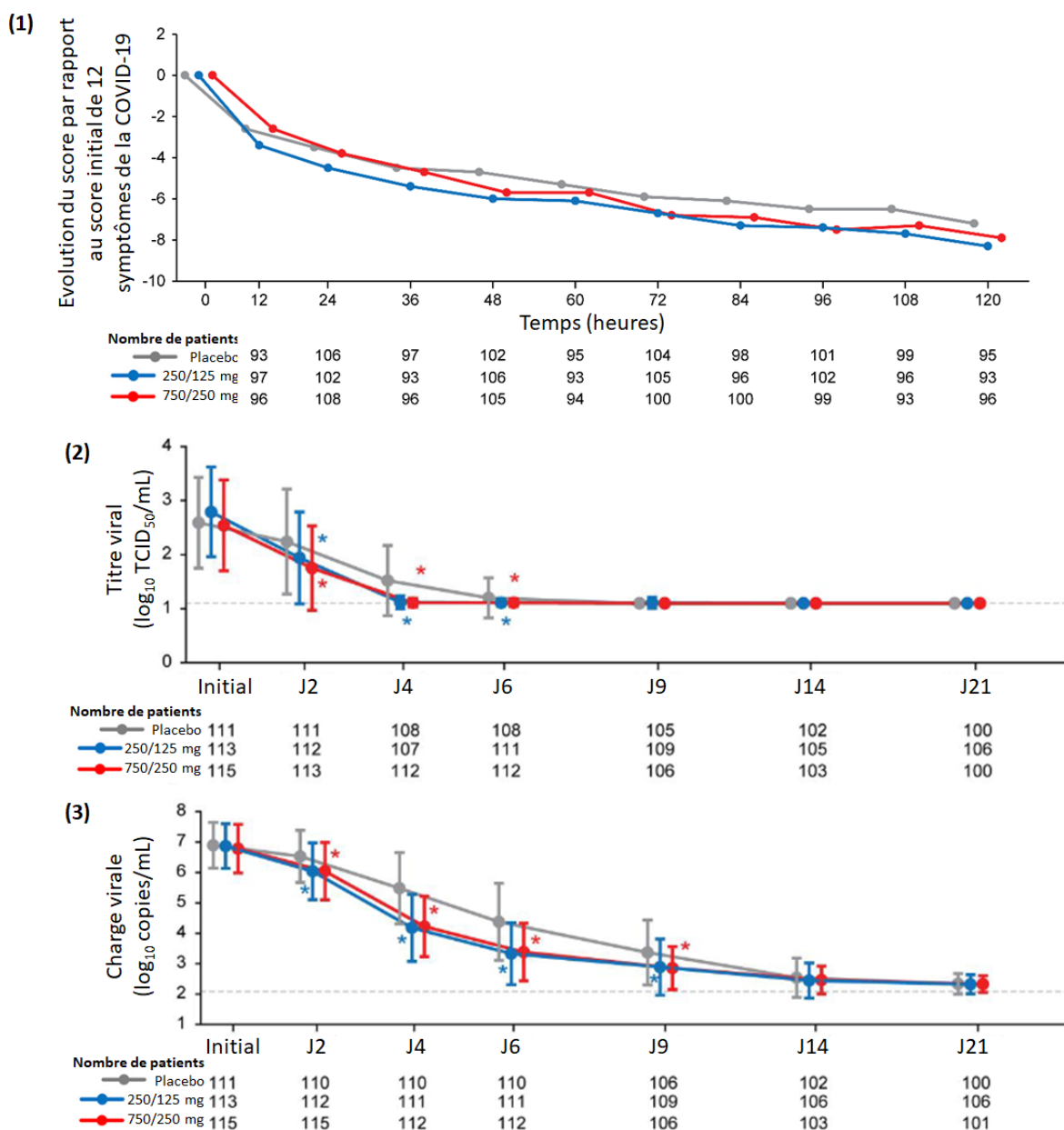


Figure 27 – Résultats d'efficacité de l'étude de phase 2b de l'acide fumarique ensitrelvir.

(1) Evolution du score global des 12 symptômes liés à la COVID-19 par rapport au score initial (avant traitement). (2) Evolution du titre viral à partir d'un écouvillonnage nasopharyngé. (3) Evolution de la charge virale à partir d'un écouvillonnage nasopharyngé.

Figure adaptée de Mukae *et al.*<sup>144</sup>.

### 2.2.3. Étude de phase 3

L'objectif de cette étude de phase 3, également appelé essai SCORPIO-SR, était d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'acide fumarique ensitrelvir chez les patients présentant une forme légère à modérée de la COVID-19 (jRCT2031210350, numéro de registre japonais). Les résultats de cet essai ont été publiés dans la littérature<sup>145,146</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de la phase 3 (tableau 15).



### **Méthode :**

Dans cet essai multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé contre placebo, 1821 patients ont été inclus entre février à juillet 2022. Les patients ont été randomisés pour recevoir les doses 375/125 mg (n = 607) ou 750/250 mg (n = 606) d'**acide fumarique ensitrelvir** (dose au premier jour/dose de maintien), ou le placebo (n = 608) pendant 5 jours. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible dans les articles<sup>145,146</sup>. Dans cet essai, la population était majoritairement asiatique.

Le critère d'évaluation principal de cette étude était le délai de résolution de 5 symptômes clés de la COVID-19 (rhinorrhée, maux de gorge, toux, pyrexie et fatigue). De nombreux critères d'évaluation secondaires ont été choisis, la liste détaillée se trouve dans les articles<sup>145,146</sup>.

Seul le groupe traité par la dose 375/125 mg a été utilisé pour évaluer l'efficacité du traitement par rapport au placebo. La dose 750/250 mg a été prise en compte pour évaluer la sécurité du traitement.

### **Résultats :**

Après exclusion des patients avec un titre viral initial négatif (non détecté) et les patients sortis de l'essai, 1769 patients ont complété l'essai. Parmi eux, 1030 patients ont été randomisés dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes avec 347 patients pour la dose 375/125 mg, 340 patients pour la dose 750/250 mg et 343 patients pour le placebo.

Résultats sur l'efficacité :

- Une différence significative du délai de résolution des 5 symptômes entre le groupe traité et le groupe placebo a été observée chez les patients randomisés dans les trois jours après l'apparition des symptômes (différence médiane de 24,3 heures). Cette différence n'est en revanche pas significative dans l'analyse chez les patients randomisés dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes.
- Concernant la liste des 12 symptômes liés à la COVID-19 (voir phase 2a), aucune différence n'a été rapportée avec le score global, que les patients aient débuté le traitement dans les 3 ou 5 jours suivant l'apparition des symptômes.

Résultats sur la charge virale :

- Les analyses ont été faites à partir d'un prélèvement par écouvillonnage nasopharyngé.
- La charge virale ( $\log_{10}$  copies/mL) a été significativement réduite au 4<sup>ème</sup> jour dans le groupe traité par rapport au groupe placebo chez les patients randomisés dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes, avec plus d'un log de différence.
- Le délai d'obtention d'un titre viral négatif est plus court chez les patients traités. Chez les patients randomisés dans les 3 jours suivants l'apparition des

symptômes, le délai médian pour l'obtention d'un test négatif est de 36,2 heures contre 65,3 heures dans le groupe placebo. La même tendance est observée chez les patients randomisés dans les 5 jours suivant l'apparition des symptômes.

Résultats sur la sécurité :

- Les effets indésirables reportés pendant l'essai étaient légers à modérés et n'ont induit aucune séquelle.
- Des effets indésirables graves sont apparus chez 2 patients (saignements menstruels importants au 14<sup>ème</sup> jour dans un groupe traité et cholécystite aigue dans un groupe placebo au 9<sup>ème</sup> jour) et n'ont pas été attribués au traitement.
- 12 patients ont arrêté l'essai pour cause d'effets indésirables. Ces effets indésirables se sont résolus après arrêt du traitement.
- Aucun décès n'a été reporté.

### **Conclusion :**

L'**acide fumarique ensitrelvir** a montré une bonne efficacité antivirale et a permis de réduire la durée de symptômes clés de la COVID-19 à la dose de 375/125 mg (dose au premier jour/dose de maintien) pendant 5 jours. Une bonne tolérance et sécurité du traitement a été observée. La généralisation de ces résultats à la population non-asiatique reste à confirmer.

Tableau 15 – Synthèse de l'essai clinique de phase 3 de l'**acide fumarique ensitrelvir** chez les patients présentant une forme légère à modérée de la COVID-19<sup>145,146</sup>.

Une autre étude de phase 3, appelée SCORPIO-HR, est en cours afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'**acide fumarique ensitrelvir** chez les patients présentant des formes légères à modérées de la COVID-19 (NCT05305547). Il s'agit d'un essai multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé contre placebo avec administration d'une dose de 375/125 mg d'**acide fumarique ensitrelvir** ou d'un placebo.

### **2.3. Autorisation de mise sur le marché**

L'**acide fumarique ensitrelvir** (sous le nom de spécialité XOCOVA™) a été autorisé sur le marché japonais par le MHLW (« Ministry of Health, Labour and Welfare ») le 22 novembre 2022<sup>147</sup>. Cette autorisation a été accordée dans le cadre d'une procédure d'urgence au vue des données relatives à l'efficacité et la sécurité obtenues dans les essais cliniques<sup>142-146</sup>. Cette spécialité a également reçu une autorisation d'utilisation d'urgence à Taiwan par la TFDA (« Taiwan Food and Drug Administration ») le 11 avril 2023<sup>148</sup>.

Le XOCOVA™ est indiqué dans le cadre d'infections légères à modérées à la COVID-19 chez l'adulte ou l'enfant de plus de 12 ans. Il se présente sous la forme de comprimés de 125 mg d'**acide fumarique ensitrelvir**. La posologie recommandée par les essais cliniques est d'une prise de 3 comprimés en une prise le premier jour, puis d'un comprimé par jour pendant 5 jours.

### 3. Le simnotrelvir

#### 3.1. Données précliniques

Le **simnotrelvir** est une molécule qui a été développée par la société Simcere Pharmaceutical en association avec le SIMM (« Shanghai Institute of Materia Medica ») et le WIV (« Wuhan Institute of Virology ») de l'académie chinoise des sciences. Très peu de données précliniques ont été publiées sur cette molécule. Le site de la compagnie Simcere Pharmaceutical indique dans un article ne pas avoir identifié de génotoxicité avec le **simnotrelvir** lors des essais précliniques<sup>114</sup>. Ils ont également rapporté que lors d'expériences sur un modèle animal, l'association **simnotrelvir/ritonavir** a démontré une bonne efficacité et à large spectre contre les coronavirus. *In vitro*, il a été décrit que le **simnotrelvir** maintient une inhibition sur les variants delta et omicron avec une  $IC_{50} < 100 \text{ nM}$ <sup>113</sup>.

#### 3.2. Données cliniques

##### 3.2.1. Étude de phase 1

L'objectif de la phase 1 était d'apprécier la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique de **simnotrelvir** chez le sujet sain (NCT05339646). A ce jour, aucun résultat n'a été publié dans la littérature ou sur le site clinicaltrials.gov. Quelques informations relatives à cette étude ont été communiquées dans un article sur la phase 1b des essais cliniques, ils indiquent qu'un article est en cours de préparation<sup>113</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de l'essai clinique avec les informations disponibles (tableau 16).

#### **Méthode :**

Dans cet essai randomisé et contrôlé contre placebo, 108 sujets sains adultes chinois ont été inclus entre avril et décembre 2022. La liste des critères d'inclusions et d'exclusions est disponible sur le site clinicaltrials.gov.

Cet essai s'est divisé en 4 parties :

- **A** : administration par voie orale d'une dose unique de **simnotrelvir** ou de **simnotrelvir/ritonavir** ou placebo.

- **B** : administration par voie orale de doses répétées de **simnotrelvir** ou placebo.
- **C** : administration par voie orale de doses répétées de **simnotrelvir/ritonavir** ou placebo.
- **D** : administration par voie orale de doses répétées de **simnotrelvir/ritonavir** à jeun ou en postprandial.

Les critères d'évaluation principaux étaient la sécurité avec l'apparition d'effets indésirables ainsi que l'évaluation des paramètres de pharmacocinétique.

### **Résultats :**

L'administration de doses répétées de **simnotrelvir**, co-administrées ou non avec le **ritonavir**, a montré un profil de pharmacocinétique dose-dépendant.

En comparaison à la monothérapie, l'exposition du **simnotrelvir** associé au **ritonavir** a été augmenté d'un facteur 5 à 8.

Aucunes données et informations complémentaires ne sont disponibles à ce jour.

### **Conclusion :**

L'administration d'une dose unique ou de doses multiples par voie orale de **simnotrelvir** ou **simnotrelvir/ritonavir** a été bien tolérée. L'analyse du profil pharmacocinétique a montré la nécessité d'une prise toutes les 12 heures en association avec le **ritonavir**.

Tableau 16 – Synthèse de l'essai clinique de phase 1 du **simnotrelvir** et du **simnotrelvir/ritonavir** en doses uniques ou répétées chez le sujet sain<sup>113</sup>.

### **3.2.2. Étude de phase 1b**

Cet essai clinique avait pour but d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'association **simnotrelvir/ritonavir** par voie orale dans une population de patients adultes atteints de la COVID-19 (NCT05369676). Les résultats ont récemment été publiés dans la revue The Lancet<sup>113</sup>. Ci-après se trouve la synthèse de l'essai clinique (tableau 17).

### **Méthode :**

Il s'agit d'une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo réalisée en Chine de mai à août 2022. Les patients inclus pouvaient présenter des formes asymptomatiques, légères ou modérées de la COVID-19. La liste des critères d'inclusion et d'exclusion à cette étude est disponible sur le site clinicaltrials.gov. Au total, 32 participants ont été inclus et randomisés en 3 groupes pour recevoir par voie orale toutes les 12 heures pendant 5 jours 750 mg de **simnotrelvir** + 100 mg de **ritonavir** (n = 12) ou 300 mg de **simnotrelvir** + 100 mg de **ritonavir** (n = 12) ou un placebo (n = 8).

Le critère d'évaluation principal était la sécurité avec la survenue d'effets indésirables. Les critères d'évaluation secondaires ont été les suivants : l'évolution

de la charge virale ( $\log_{10}$  copies/mL), le délai d'amélioration des symptômes, la proportion de participants dont l'état s'aggrave et l'étude des paramètres pharmacocinétiques.

### **Résultats :**

Sur les 32 patients, 30 ont terminé l'essai. Deux patients ont quitté l'essai (retrait du consentement).

Résultats d'efficacité :

- 9 symptômes ont été évalués : toux, maux de gorge, rhinorrhée, dyspnée, fatigue, maux de tête, pyrexie, douleurs musculaires et frissons.
- Le délai médian d'amélioration de ces symptômes était de 2 jours, 3 jours et 6 jours dans les groupes traités à la forte dose, la faible dose et le placebo respectivement. Cette amélioration a été définie comme le fait d'avoir un score de 0 ou 1 pour la totalité des 9 symptômes.

Résultats sur la charge virale :

- Les analyses ont été faites à partir d'un prélèvement par écouvillonnage nasopharyngé.
- La charge virale a été réduite de façon significative par rapport au placebo avec les deux doses administrées. La charge virale initiale était en moyenne  $> 7 \log_{10}$  copies/mL. Au troisième jour, une diminution d'environ  $3 \log_{10}$  copies/mL a été observée dans les groupes traités contre une diminution d' $1 \log_{10}$  copies/mL dans le groupe placebo.
- La proportion de patients avec un test positif (seuil de cycle  $\leq 25$ ) a été significativement réduite dans les groupes traités avec 100%, 16,7% et 37,5% de tests positifs dans le groupe à forte dose, à faible dose et dans le groupe placebo respectivement au 4<sup>ème</sup> jour.

Résultats de sécurité :

- Seuls des effets indésirables de grade 1 ont été reportés, sans différence significative entre les différentes doses administrées.
- Aucun effet indésirable sévère ou conduisant à l'arrêt de l'essai n'a été reporté.

### **Conclusion :**

De manière générale l'association **simnotrelvir/ritonavir** s'est avérée efficace et bien tolérée. La dose recommandée est de 750 mg de **simnotrelvir** pour la suite des essais cliniques.

Tableau 17 – Synthèse de l'essai clinique de phase 1b de l'association **simnotrelvir/ritonavir** chez les patients avec une forme asymptomatique, légère ou modérée de la COVID-19<sup>13</sup>.

### 3.2.3. Étude de phase 2/3

L'objectif de cette étude de phase 2/3 était d'évaluer l'efficacité, la sécurité et la tolérance de l'association **simnotrelvir/ritonavir** par voie orale dans une population de patients adultes atteints de la COVID-19 (NCT05506176). Aucun résultat relatif à cet essai n'est paru dans la littérature ou sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). Quelques informations ont néanmoins été communiquées dans un article sur la phase 1b et sur le site de la compagnie<sup>113,114</sup>. La société a indiqué que les résultats de cette étude devraient paraître dans un article scientifique ou lors de séminaires dans un futur proche. Ci-après se trouve la synthèse de l'essai clinique (tableau 18).

#### **Méthode :**

Il s'agit d'une étude multicentrique, randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo réalisée en Chine d'avril 2022 à mars 2023. Les patients inclus devaient présenter des formes légères ou modérées de la COVID-19. La liste des critères d'inclusion et d'exclusion à cette étude est disponible sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Les 1208 patients inclus ont été randomisés en 2 groupes pour recevoir par voie orale toutes les 12 heures pendant 5 jours l'association 750 mg de **simnotrelvir** + 100 mg de **ritonavir** ou un placebo.

Le critère d'évaluation principal a été la durée nécessaire à une guérison complète et durable selon une liste de 11 symptômes : toux, dyspnée, maux de tête, maux de gorge, rhinorrhée, pyrexie, frissons, douleurs musculaires, nausée, vomissement et diarrhée. De nombreux critères d'évaluation secondaires ont été sélectionnés et sont listés sur le site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

#### **Résultats :**

L'association **simnotrelvir/ritonavir** a permis de raccourcir significativement le délai de guérison par rapport aux 11 symptômes d'environ 1,5 jour pour les patients atteints d'une infection légère à modérée par COVID-19 et de 2,4 jours pour le sous-groupe des patients à risque d'évoluer vers une forme sévère.

Parallèlement, les données cliniques ont indiqué qu'une utilisation précoce du **simnotrelvir/ritonavir** permet d'obtenir une efficacité accrue.

Une diminution rapide et significative de la charge virale a également été observée dans le groupe traité.

Aucune information complémentaire n'est disponible à ce jour.

#### **Conclusion :**

Sur un échantillon plus large de patients atteints de la COVID-19, l'association **simnotrelvir/ritonavir** s'est avérée efficace et bien tolérée.

Tableau 18 – Synthèse de l'essai clinique de phase 2/3 de l'association **simnotrelvir/ritonavir** chez les patients avec une forme légère ou modérée de la COVID-19<sup>113,114</sup>.

### 3.3. Autorisation de mise sur le marché

Grâce aux résultats obtenus dans l'étude de phase 2/3, l'association **simnotrelvir/ritonavir** (sous le nom de spécialité XIANNUOXIN™) a reçu une autorisation de mise sur le marché en Chine délivrée par la NMPA (National Medical Products Administration) le 28 janvier 2023, par une procédure spéciale d'urgence<sup>112-114</sup>.

Le XIANNUOXIN™ est indiqué chez l'adulte souffrant de formes légères à modérées de la COVID-19. Cette spécialité se présente sous la forme de comprimés contenant 750 mg de **simnotrelvir** (2 comprimés de 375 mg) et d'un comprimé de 100 mg de **ritonavir** à prendre simultanément à chaque prise. La posologie recommandée par les essais cliniques est d'une prise toutes les 12 heures pendant 5 jours.

## 4. Limites des traitements

### 4.1. Apparition de résistances

Les virus à ARN sont connus pour générer des variants. Des mutations de la protéine de spicule du SARS-CoV-2 ont déjà conduit à une augmentation des résistantes aux thérapies par anticorps monoclonaux<sup>158</sup>. Bien que d'une manière générale les acides aminés du site catalytique sont bien conservés chez la 3CL<sup>pro</sup> des coronavirus, il est tout à fait imaginable qu'un variant résistant à un inhibiteur autorisé sur le marché puisse émerger. Ce phénomène est donc une préoccupation importante dans le cadre de la COVID-19 et a déjà fait l'objet de plusieurs travaux publiés.

Concernant le **nirmatrelvir**, des substitutions d'acides aminés conduisant à une diminution de la sensibilité au traitement ont été trouvées dans des virus isolés de patients ou dans des expériences de laboratoire<sup>159-165</sup>. Des résistances à l'**ensitrelvir** ont également été rapportées<sup>164</sup>. Pour le moment, la prévalence des mutations résistantes au PAXLOVID™ reste faible un an après son autorisation.

De manière générale, si un virus résistant se propage à grande échelle, cela veut dire que la pression sélective a été très forte en raison d'une utilisation généralisée d'un traitement, ou alors le virus résistant acquiert un avantage à sa réplication. Pour limiter ce risque, combiner les thérapies antivirales est considéré comme une bonne stratégie, bien qu'il soit possible qu'un variant soit résistant aux deux antiviraux. Par exemple, dans le cas d'infections au VIH et au VHC, la monothérapie utilisée initialement a conduit à une résistance rapide des virus et aujourd'hui ces maladies sont traitées grâce à des combinaisons d'antiviraux. Afin de pallier ces résistances, il

est également possible de prendre en compte les résidus identifiés comme étant importants et impliqués dans l'apparition de mutants résistants afin de concevoir de futurs antiviraux. Dans tous les cas, il est nécessaire de surveiller de très près l'apparition de ces mutations.

#### **4.2. Précautions d'utilisation**

Le **ritonavir** contenu dans le PAXLOVID™ est un inhibiteur des cytochromes P450 3A4, impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments, ce qui peut ainsi conduire à de nombreuses interactions médicamenteuses. Une vigilance et une surveillance accrue doit donc être de rigueur lors de la prescription et de la délivrance du traitement. Ces interactions doivent être gérées par une réduction de la dose du médicament concomitant, l'utilisation d'un autre médicament concomitant, une surveillance accrue des effets indésirables ou l'arrêt temporaire des médicaments concomitants. Le PAXLOVID™ est contre-indiqué avec de nombreux médicaments ainsi que les produits de phytothérapie contenant du millepertuis. Le traitement ne peut pas être donné aux patients avec une insuffisance hépatique grave, une insuffisance rénale grave. La même conclusion peut être faite avec le XIANNUOXIN™ qui contient également du **ritonavir** au même dosage.

Enfin, dans l'essai clinique de phase 1 de l'**acide fumarique ensitrelvir**, un potentiel effet inhibiteur des cytochromes 3A4 a été décelé et nécessite une vigilance importante pour les mêmes raisons que celles citées précédemment avec le **ritonavir**.



## Conclusion et perspectives

En seulement deux décennies, le monde a fait face à l'émergence de trois nouveaux coronavirus responsables de pandémies. Parmi elles, la pandémie liée au coronavirus SARS-CoV-2 a été d'une ampleur sans précédent, et n'est toujours pas entièrement résolue à l'heure actuelle. Sa prise en charge s'est néanmoins nettement améliorée au fil du temps, notamment grâce à la généralisation de la vaccination et l'amélioration de la prise en charge. Cette amélioration a également été permise par le développement de thérapies spécifiques ou non du SARS-CoV-2 avec par exemple des anticorps monoclonaux ciblant la protéine de spicule ou des antiviraux de type petite molécules ciblant l'ARN polymérase ARN dépendante.

Parmi les cibles possibles pour lutter contre la réplication virale chez les coronavirus, la 3CL<sup>pro</sup> se présente comme une cible très prometteuse. Outre son rôle crucial dans la réplication du virus, elle possède une très bonne conservation de son site catalytique entre les différentes espèces de coronavirus, et n'a pas d'homologue chez l'Homme. Des recherches récentes ont également montré son implication probable dans la pathogénicité de la COVID-19. La 3CL<sup>pro</sup> s'avère donc être une cible intéressante pour la conception de thérapies antivirales dans le cadre de la lutte contre la COVID-19 mais également des coronavirus en général. Depuis la première pandémie de SARS-CoV, la protéase 3CL a été étudiée et elle a suscité un très fort intérêt depuis l'apparition du SARS-CoV-2.

Avec les efforts de recherche déployés, 3 inhibiteurs de la 3CL<sup>pro</sup> du SARS-CoV-2 ont pu être développés jusqu'à obtenir leur autorisation sur différents marchés grâce à l'efficacité et la sécurité qu'ils ont démontré au travers différents essais précliniques et cliniques. Il s'agit du PAXLOVID™ (**nirmatrelvir/ritonavir**), du XOCOVA™ (**acide fumarique ensitrelvir**) et du XIANNUOXIN™ (**simnotrelvir/ritonavir**).

Néanmoins, ces traitements présentent quelques limites. Tout d'abord, le **nirmatrelvir** et le **simnotrelvir** doivent être administrés avec le ritonavir afin d'améliorer leur profil pharmacocinétique. Il s'agit d'un inhibiteur des cytochromes P450 3A4 qui amène un risque non négligeable d'interactions médicamenteuses. L'**acide fumarique ensitrelvir** n'a pas besoin d'être co-administré avec le **ritonavir**, néanmoins, des premiers résultats ont montré qu'il s'agirait potentiellement d'un inhibiteur des cytochromes P450 3A4. Également, l'apparition de mutants résistants a déjà été observée pour le **nirmatrelvir** et l'**ensitrelvir**, rendant impératif d'exercer une vigilance accrue de leur apparition. De plus, il est probable que dans le futur nous devions faire

face à l'émergence de nouveaux coronavirus, potentiellement responsables d'autres pandémies. Il est donc nécessaire de continuer la recherche sur l'élaboration d'antiviraux à large spectre, y compris sur la protéase 3CL qui est une cible clé dans la réplication virale des coronavirus.

## **Bibliographie**

1. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1282**, 1–23 (2015).
2. Bailey, O. T., Pappenheimer, A. M., Cheever, F. S. & Daniels, J. B. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J. Exp. Med.* **90**, 195–212 (1949).
3. Hamre, D. & Procknow, J. J. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**, 190–193 (1966).
4. McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **57**, 933–940 (1967).
5. Lee, N. *et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1986–1994 (2003).
6. Stadler, K. *et al.* SARS--beginning to understand a new virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 209–218 (2003).
7. van der Hoek, L. *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368–373 (2004).
8. Woo, P. C. Y. *et al.* Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J. Virol.* **79**, 884–895 (2005).
9. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012).
10. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
11. NIAID-RML. Novel Coronavirus SARS-CoV-2. <https://www.niaid.nih.gov/news-events/novel-coronavirus-sarscov2-images>.
12. Bartlam, M., Yang, H. & Rao, Z. Structural insights into SARS coronavirus proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 664–672 (2005).
13. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**, 418–423 (2020).
14. Beniac, D. R., Andonov, A., Grudeski, E. & Booth, T. F. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 751–752 (2006).
15. Hatmal, M. M. *et al.* Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. *Cells* **9**, 2638 (2020).
16. Neuman, B. W. *et al.* A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.* **174**, 11–22 (2011).
17. Schoeman, D. & Fielding, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* **16**, 69 (2019).
18. Chang, C. *et al.* Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J. Biomed. Sci.* **13**, 59–72 (2006).
19. Juckel, D., Dubuisson, J. & Belouzard, S. Les coronavirus, ennemis incertains. *médecine/sciences* **36**, 633–641 (2020).
20. Wit, E. de, Doremalen, N. van, Falzarano, D. & Munster, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 523–534 (2016).
21. Bonny, V., Maillard, A., Mousseaux, C., Plaçais, L. & Richier, Q. COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages. *Rev. Med. Interne* **41**, 375–389 (2020).

22. Kaul, D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus – Molecular biology, epidemiology and clinical implications. *Curr. Med. Res. Pract.* **10**, 54–64 (2020).
23. Chen, B. *et al.* Overview of lethal human coronaviruses. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 1–16 (2020).
24. Liu, J. *et al.* A comparative overview of COVID-19, MERS and SARS: Review article. *Int. J. Surg.* **81**, 1–8 (2020).
25. Guan, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020).
26. Abdelrahman, Z., Li, M. & Wang, X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
27. Krishnamoorthy, S., Swain, B., Verma, R. S. & Gunthe, S. S. SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV viruses: an overview of origin, evolution, and genetic variations. *VirusDisease* **31**, 1–13 (2020).
28. *Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003.* <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>.
29. *MERS situation update.* <https://www.emro.who.int/fr/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>.
30. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.* <https://covid19.who.int/>.
31. Zhong, N. S. *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People’s Republic of China, in February, 2003. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1353–1358 (2003).
32. Peiris, J. S. M., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. M. E. & Stöhr, K. The severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2431–2441 (2003).
33. Song, Z. *et al.* From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses* **11**, 59 (2019).
34. Zumla, A., Hui, D. S. & Perlman, S. Middle East respiratory syndrome. *The Lancet* **386**, 995–1007 (2015).
35. Haagmans, B. L. *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 140–145 (2014).
36. Azhar, E. I. *et al.* Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2499–2505 (2014).
37. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
38. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
39. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. & Shi, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 141–154 (2021).
40. The Lancet. Emerging understandings of 2019-nCoV. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 311 (2020).
41. Hu, B., Huang, S. & Yin, L. The cytokine storm and COVID-19. *J. Med. Virol.* **93**, 250–256 (2021).
42. Rosenberg, R. Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**, 1115–1125 (2015).
43. Su, S. *et al.* Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* **24**, 490–502 (2016).
44. Duffy, S. Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biol.* **16**, e3000003 (2018).
45. Markov, P. V. *et al.* The evolution of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 361–379 (2023).
46. Vale, F. F. *et al.* Origin, phylogeny, variability and epitope conservation of SARS-CoV-2 worldwide. *Virus Res.* **304**, 198526 (2021).

47. Fang, M., Hu, W. & Liu, B. Characterization of bat coronaviruses: a latent global threat. *J. Vet. Sci.* **22**, e72 (2021).
48. Zhu, Y., Sharma, L. & Chang, D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front. Immunol.* **14**, 1116131 (2023).
49. Ssentongo, P. *et al.* SARS-CoV-2 vaccine effectiveness against infection, symptomatic and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **22**, 439 (2022).
50. Lotfi, H., Mazar, M. G., Ei, N. M. H., Fahim, M. & Yazdi, N. S. Vaccination is the most effective and best way to avoid the disease of COVID-19. *Immun. Inflamm. Dis.* **11**, e946 (2023).
51. Voto, C., Berkner, P. & Brenner, C. Overview of the Pathogenesis and Treatment of SARS-CoV-2 for Clinicians: A Comprehensive Literature Review. *Cureus* **12**, e10357 (2020).
52. Gavriatopoulou, M. *et al.* Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clin. Exp. Med.* **21**, 167–179 (2020).
53. RECOVERY Collaborative Group *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 693–704 (2021).
54. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet Lond. Engl.* **397**, 1637–1645 (2021).
55. Kyriazopoulou, E. *et al.* Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Rheumatol.* **3**, e690–e697 (2021).
56. Beigel, J. H. *et al.* Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1813–1826 (2020).
57. Jayk Bernal, A. *et al.* Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N. Engl. J. Med.* **386**, 509–520 (2022).
58. Gupta, A. *et al.* Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1941–1950 (2021).
59. Lee, J. Y. *et al.* Effectiveness of Regdanvimab Treatment in High-Risk COVID-19 Patients to Prevent Progression to Severe Disease. *Front. Immunol.* **12**, 772320 (2021).
60. Montgomery, H. *et al.* Efficacy and safety of intramuscular administration of tixagevimab–cilgavimab for early outpatient treatment of COVID-19 (TACKLE): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **10**, 985–996 (2022).
61. Weinreich, D. M. *et al.* REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **385**, e81 (2021).
62. Shahid, M. & Shahzad-ul-Hussan, S. Structural insights of key enzymes into therapeutic intervention against SARS-CoV-2. *J. Struct. Biol.* **213**, 107690 (2021).
63. Lee, J. *et al.* X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation. *Nat. Commun.* **13**, 5196 (2022).
64. López-Otín, C. & Overall, C. M. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 509–519 (2002).
65. Pablos, I. *et al.* Mechanistic insights into COVID-19 by global analysis of the SARS-CoV-2 3CLpro substrate degradome. *Cell Rep.* **37**, 109892 (2021).
66. Moustaqil, M. *et al.* SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 178–195 (2021).
67. Lichimo, K. 3CLpro: The discovery of host cell substrates and its relevance as a drug target for SARS-CoV-2 variants of concern. *Undergrad. J. Exp. Microbiol. Immunol.* **6**, 1–8 (2022).
68. Wang, W.-H. *et al.* The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* **53**, 925–935 (2020).

69. Moustaqil, M. *et al.* SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 178–195 (2021).
70. Tuncer, S., Fiorillo, M. T. & Sorrentino, R. The multifaceted nature of NLRP12. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 991–1000 (2014).
71. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
72. Hsu, W.-C. *et al.* Critical assessment of important regions in the subunit association and catalytic action of the severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease. *J. Biol. Chem.* **280**, 22741–22748 (2005).
73. Chen, S. *et al.* Residues on the dimer interface of SARS coronavirus 3C-like protease: dimer stability characterization and enzyme catalytic activity analysis. *J. Biochem. (Tokyo)* **143**, 525–536 (2008).
74. Xia, B. & Kang, X. Activation and maturation of SARS-CoV main protease. *Protein Cell* **2**, 282–290 (2011).
75. Ferreira, J. C. & Rabeh, W. M. Biochemical and biophysical characterization of the main protease, 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) from the novel coronavirus SARS-CoV 2. *Sci. Rep.* **10**, 22200 (2020).
76. Xiong, M. *et al.* What coronavirus 3C-like protease tells us: From structure, substrate selectivity, to inhibitor design. *Med. Res. Rev.* **41**, 1965–1998 (2021).
77. Hu, Q. *et al.* The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm* **3**, e151 (2022).
78. Zhong, N. *et al.* C-terminal domain of SARS-CoV main protease can form a 3D domain-swapped dimer. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **18**, 839–844 (2009).
79. Zhong, N. *et al.* Without Its N-Finger, the Main Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Can Form a Novel Dimer through Its C-Terminal Domain. *J. Virol.* **82**, 4227–4234 (2008).
80. Zhang, L. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science* (2020) doi:10.1126/science.abb3405.
81. Cannalire, R., Cerchia, C., Beccari, A. R., Di Leva, F. S. & Summa, V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J. Med. Chem.* **65**, 2716–2746 (2022).
82. Kneller, D. W. *et al.* Structural, Electronic, and Electrostatic Determinants for Inhibitor Binding to Subsites S1 and S2 in SARS-CoV-2 Main Protease. *J. Med. Chem.* **64**, 17366–17383 (2021).
83. Kneller, D. W. *et al.* Unusual zwitterionic catalytic site of SARS-CoV-2 main protease revealed by neutron crystallography. *J. Biol. Chem.* **295**, 17365–17373 (2020).
84. Zhu, J. *et al.* Progress on SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors: Inspiration from SARS-CoV 3CLpro Peptidomimetics and Small-Molecule Anti-Inflammatory Compounds. *Drug Des. Devel. Ther.* **16**, 1067–1082 (2022).
85. Capasso, C., Nocentini, A. & Supuran, C. T. Protease inhibitors targeting the main protease and papain-like protease of coronaviruses. *Expert Opin. Ther. Pat.* **31**, 309–324 (2021).
86. Zhao, Q. *et al.* Structure of the Main Protease from a Global Infectious Human Coronavirus, HCoV-HKU1. *J. Virol.* **82**, 8647–8655 (2008).
87. Lee, C.-C. *et al.* Structural basis of inhibition specificities of 3C and 3C-like proteases by zinc-coordinating and peptidomimetic compounds. *J. Biol. Chem.* **284**, 7646–7655 (2009).
88. Tomar, S. *et al.* Ligand-induced Dimerization of Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus nsp5 Protease (3CLpro): IMPLICATIONS FOR nsp5 REGULATION AND THE DEVELOPMENT OF ANTIVIRALS\*. *J. Biol. Chem.* **290**, 19403–19422 (2015).

89. Lu, I.-L. *et al.* Structure-Based Drug Design and Structural Biology Study of Novel Nonpeptide Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Main Protease. *J. Med. Chem.* **49**, 5154–5161 (2006).
90. Berry, M., Fielding, B. & Gamielien, J. Human coronavirus OC43 3CL protease and the potential of ML188 as a broad-spectrum lead compound: Homology modelling and molecular dynamic studies. *BMC Struct. Biol.* **15**, 8 (2015).
91. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162 (1967).
92. Anirudhan, V., Lee, H., Cheng, H., Cooper, L. & Rong, L. Targeting SARS-CoV-2 viral proteases as a therapeutic strategy to treat COVID-19. *J. Med. Virol.* **93**, 2722–2734 (2021).
93. Chuck, C.-P., Chow, H.-F., Wan, D. C.-C. & Wong, K.-B. Profiling of Substrate Specificities of 3C-Like Proteases from Group 1, 2a, 2b, and 3 Coronaviruses. *PLOS ONE* **6**, e27228 (2011).
94. Liu, Y. *et al.* The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020. *Eur. J. Med. Chem.* **206**, 112711 (2020).
95. Chen, R. *et al.* Advances in research on 3C-like protease (3CL<sup>pro</sup>) inhibitors against SARS-CoV-2 since 2020. *RSC Med. Chem.* **14**, 9–21 (2023).
96. Agost-Beltrán, L. *et al.* Advances in the Development of SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors. *Molecules* **27**, 2523 (2022).
97. Fu, L. *et al.* Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
98. Zhang, L. *et al.*  $\alpha$ -Ketoamides as Broad-Spectrum Inhibitors of Coronavirus and Enterovirus Replication: Structure-Based Design, Synthesis, and Activity Assessment. *J. Med. Chem.* **63**, 4562–4578 (2020).
99. Huang, C. *et al.* Discovery and structure-activity relationship studies of novel  $\alpha$ -ketoamide derivatives targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Eur. J. Med. Chem.* **259**, 115657 (2023).
100. Ma, C. *et al.* Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Res.* **30**, 678–692 (2020).
101. Cáceres, C. J. *et al.* Efficacy of GC-376 against SARS-CoV-2 virus infection in the K18 hACE2 transgenic mouse model. *Sci. Rep.* **11**, 9609 (2021).
102. Dai, W. *et al.* Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science* **368**, 1331–1335 (2020).
103. Hoffman, R. L. *et al.* Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. *J. Med. Chem.* **63**, 12725–12747 (2020).
104. Boras, B. *et al.* Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19. *Nat. Commun.* **12**, 6055 (2021).
105. Chen, W. *et al.* Review of preclinical data of PF-07304814 and its active metabolite derivatives against SARS-CoV-2 infection. *Front. Pharmacol.* **13**, 1035969 (2022).
106. Zhu, T. *et al.* Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Intravenous Doses of PF-07304814, a Phosphate Prodrug Protease Inhibitor for the Treatment of SARS-CoV-2, in Healthy Adult Participants. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **11**, 1382–1393 (2022).
107. Hirose, Y. *et al.* Discovery of Chlorofluoroacetamide-Based Covalent Inhibitors for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 3CL Protease. *J. Med. Chem.* **65**, 13852–13865 (2022).
108. Owen, D. R. *et al.* An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science* **374**, 1586–1593 (2021).
109. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/paxlovid>.

110. Singh, R. S. P. *et al.* Innovative Randomized Phase I Study and Dosing Regimen Selection to Accelerate and Inform Pivotal COVID-19 Trial of Nirmatrelvir. *Clin. Pharmacol. Ther.* **112**, 101–111 (2022).
111. Hammond, J. *et al.* Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **386**, 1397–1408 (2022).
112. Zhu, K.-W. Deuremidevir and Simnotrelvir–Ritonavir for the Treatment of COVID-19. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **6**, 1306–1309 (2023).
113. Wang, F. *et al.* Efficacy and safety of SIM0417 (SSD8432) plus ritonavir for COVID-19 treatment: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1b trial. *Lancet Reg. Health - West. Pac.* **38**, 100835 (2023).
114. Simcere Pharmaceutical. XIANNUOXIN® - The First Chinese 3CL Anti-COVID-19 Drug - Receives Approval from the NMPA. <https://www.simcere.com/en/news/detail.aspx?mtt=315>. (2023).
115. Su, H. *et al.* Anti-SARS-CoV-2 activities in vitro of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 1167–1177 (2020).
116. Liu, H. *et al.* Scutellaria baicalensis extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease in vitro. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **36**, 497–503 (2021).
117. Chen, Z. *et al.* Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of SARS-CoV-2 cysteine proteases. *Cell Biosci.* **11**, 45 (2021).
118. Cui, J. & Jia, J. Discovery of juglone and its derivatives as potent SARS-CoV-2 main proteinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **225**, 113789 (2021).
119. Zhang, Y.-N. *et al.* Discovery and characterization of the covalent SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors from Ginkgo biloba extract via integrating chemoproteomic and biochemical approaches. *Phytomedicine* **114**, 154796 (2023).
120. Alhadrami, H. A. *et al.* Neoechinulin A as a Promising SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor: In Vitro and In Silico Study Showing the Ability of Simulations in Discerning Active from Inactive Enzyme Inhibitors. *Mar. Drugs* **20**, 163 (2022).
121. Chiou, W.-C. *et al.* The inhibitory effects of PGG and EGCG against the SARS-CoV-2 3C-like protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **591**, 130–136 (2022).
122. Kronenberger, T., Laufer, S. A. & Pillaiyar, T. COVID-19 therapeutics: Small-molecule drug development targeting SARS-CoV-2 main protease. *Drug Discov. Today* **28**, 103579 (2023).
123. Schewe, T. Molecular actions of Ebselen—an antiinflammatory antioxidant. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **26**, 1153–1169 (1995).
124. Ma, C. *et al.* Ebselen, Disulfiram, Carmofur, PX-12, Tideglusib, and Shikonin Are Nonspecific Promiscuous SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **3**, 1265–1277 (2020).
125. Jin, Z. *et al.* Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**, 289–293 (2020).
126. Ampornnanai, K. *et al.* Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives. *Nat. Commun.* **12**, 3061 (2021).
127. Weglarz-Tomczak, E. *et al.* Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* **11**, 3640 (2021).
128. Zmudzinski, M. *et al.* Ebselen derivatives inhibit SARS-CoV-2 replication by inhibition of its essential proteins: PLpro and Mpro proteases, and nsp14 guanine N7-methyltransferase. *Sci. Rep.* **13**, 9161 (2023).
129. Lutten, A. *et al.* Ultralarge Virtual Screening Identifies SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors with Broad-Spectrum Activity against Coronaviruses. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 2905–2920 (2022).



130. Pillaiyar, T. *et al.* Small-Molecule Thioesters as SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors: Enzyme Inhibition, Structure-Activity Relationships, Antiviral Activity, and X-ray Structure Determination. *J. Med. Chem.* **65**, 9376–9395 (2022).
131. Turlington, M. *et al.* Discovery of N-(benzo[1,2,3]triazol-1-yl)-N-(benzyl)acetamido)phenyl) carboxamides as severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CLpro inhibitors: identification of ML300 and noncovalent nanomolar inhibitors with an induced-fit binding. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 6172–6177 (2013).
132. Wu, C.-Y. *et al.* Stable Benzotriazole Esters as Mechanism-Based Inactivators of the Severe Acute Respiratory Syndrome 3CL Protease. *Chem. Biol.* **13**, 261–268 (2006).
133. Han, S. H. *et al.* Structure-Based Optimization of ML300-Derived, Noncovalent Inhibitors Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3CL Protease (SARS-CoV-2 3CLpro). *J. Med. Chem.* **65**, 2880–2904 (2021).
134. Ghahremanpour, M. M. *et al.* Identification of 14 Known Drugs as Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV-2. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 2526–2533 (2020).
135. Zhang, C.-H. *et al.* Optimization of Triarylpyridinone Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV-2 to Low-Nanomolar Antiviral Potency. *ACS Med. Chem. Lett.* **12**, 1325–1332 (2021).
136. Quan, B.-X. *et al.* An orally available Mpro inhibitor is effective against wild-type SARS-CoV-2 and variants including Omicron. *Nat. Microbiol.* **7**, 716–725 (2022).
137. Brier, L. *et al.* Novel dithiocarbamates selectively inhibit 3CL protease of SARS-CoV-2 and other coronaviruses. *Eur. J. Med. Chem.* **250**, 115186 (2023).
138. Hou, N. *et al.* Development of Highly Potent Noncovalent Inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. *ACS Cent. Sci.* **9**, 217–227 (2023).
139. Moon, P. *et al.* Discovery of Potent Pyrazoline-Based Covalent SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors\*\*. *ChemBioChem* **24**, e202300116 (2023).
140. Unoh, Y. *et al.* Discovery of S-217622, a Noncovalent Oral SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor Clinical Candidate for Treating COVID-19. *J. Med. Chem.* **65**, 6499–6512 (2022).
141. Sasaki, M. *et al.* S-217622, a SARS-CoV-2 main protease inhibitor, decreases viral load and ameliorates COVID-19 severity in hamsters. *Sci. Transl. Med.* **15**, eabq4064 (2023).
142. Shimizu, R. *et al.* Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the Novel Antiviral Agent Ensitrelvir Fumaric Acid, a SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor, in Healthy Adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **66**, e00632-22 (2022).
143. Mukae, H. *et al.* A Randomized Phase 2/3 Study of Ensitrelvir, a Novel Oral SARS-CoV-2 3C-Like Protease Inhibitor, in Japanese Patients with Mild-to-Moderate COVID-19 or Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: Results of the Phase 2a Part. *Antimicrob. Agents Chemother.* **66**, e00697-22 (2022).
144. Mukae, H. *et al.* Efficacy and Safety of Ensitrelvir in Patients With Mild-to-Moderate Coronavirus Disease 2019: The Phase 2b Part of a Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2/3 Study. *Clin. Infect. Dis.* **76**, 1403–1411 (2023).
145. Yotsuyanagi, H. *et al.* Efficacy and Safety of 5-Day Oral Ensitrelvir for Patients With Mild-to-Moderate COVID-19: The SCORPIO-SR Randomized Clinical Trial. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.07.11.23292264> (2023) doi:10.1101/2023.07.11.23292264.
146. Yotsuyanagi, H. *et al.* A phase 2/3 study of S-217622 in participants with SARS-CoV-2 infection (Phase 3 part). *Medicine (Baltimore)* **102**, e33024 (2023).
147. Xocova® (Ensitrelvir Fumaric Acid) Tablets 125mg Approved in Japan for the Treatment of SARS-CoV-2 Infection, under the Emergency Regulatory Approval System.

148. Shionogi filed for Emergency Use Authorization of Ensitrelvir Fumaric Acid in Taiwan, for the Treatment of COVID-19. <https://www.shionogi.com/global/en/news/2023/04/20230411.html>.
149. Li, J. *et al.* Structural Basis of the Main Proteases of Coronavirus Bound to Drug Candidate PF-07321332. *J. Virol.* **96**, e0201321 (2022).
150. Leist, S. R. *et al.* A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. *Cell* **183**, 1070-1085.e12 (2020).
151. Vangeel, L. *et al.* Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Res.* **198**, 105252 (2022).
152. Rai, D. K. *et al.* Nirmatrelvir, an orally active Mpro inhibitor, is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 Variants of Concern. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.01.17.476644> (2022) doi:10.1101/2022.01.17.476644.
153. Covid-19 : accès précoce accordé au Paxlovid® en traitement curatif. [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3311074/fr/covid-19-acces-precoce-accorde-au-paxlovid-en-traitement-curatif](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3311074/fr/covid-19-acces-precoce-accorde-au-paxlovid-en-traitement-curatif).
154. Covid-19 : la HAS se prononce en faveur du remboursement du Paxlovid®. [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3334214/fr/covid-19-la-has-se-prononce-en-faveur-du-remboursement-du-paxlovid](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3334214/fr/covid-19-la-has-se-prononce-en-faveur-du-remboursement-du-paxlovid).
155. Imai, M. *et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 16587–16595 (2020).
156. Sia, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* **583**, 834–838 (2020).
157. Kawashima, S. *et al.* Ensitrelvir is effective against SARS-CoV-2 3CL protease mutants circulating globally. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **645**, 132–136 (2023).
158. Focosi, D. *et al.* Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2. *Lancet Infect. Dis.* **22**, e311–e326 (2022).
159. Sasi, V. M. *et al.* Predicting Antiviral Resistance Mutations in SARS-CoV-2 Main Protease with Computational and Experimental Screening. *Biochemistry* **61**, 2495–2505 (2022).
160. Heilmann, E. *et al.* SARS-CoV-2 3CL<sup>pro</sup> mutations selected in a VSV-based system confer resistance to nirmatrelvir, ensitrelvir, and GC376. *Sci. Transl. Med.* **15**, eabq7360 (2023).
161. Iketani, S. *et al.* Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature* **613**, 558–564 (2023).
162. Hu, Y. *et al.* Naturally Occurring Mutations of SARS-CoV-2 Main Protease Confer Drug Resistance to Nirmatrelvir. *ACS Cent. Sci.* (2023).
163. Lee, J. T. *et al.* Genetic Surveillance of SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> Reveals High Sequence and Structural Conservation Prior to the Introduction of Protease Inhibitor Paxlovid. *mBio* **13**, e00869-22 (2022).
164. Ip, J. D. *et al.* Global prevalence of SARS-CoV-2 3CL protease mutations associated with nirmatrelvir or ensitrelvir resistance. *eBioMedicine* **91**, 104559 (2023).
165. Kiso, M. *et al.* In vitro and in vivo characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir. *Nat. Commun.* **14**, 4231 (2023).



Université de Lille

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2022/2023

**Nom** : BRIER

**Prénom** : Lucile

**Titre de la thèse** : La protéase 3CL du SARS-CoV-2, une cible clé dans le développement de thérapies contre la COVID-19.

**Mots-clés** : protéase 3CL, COVID-19, SARS-CoV-2, traitement, antiviral, inhibiteur de protéase.

---

**Résumé** : En 20 ans, le monde a fait face à l'apparition de trois coronavirus responsables de pandémies. Depuis 2019, la pandémie de COVID-19 a conduit à une crise sanitaire mondiale et elle n'est à ce jour pas terminée. Le déploiement de la vaccination et l'amélioration de la prise en charge des patients a permis de réduire considérablement les risques d'hospitalisations et de décès. La recherche de traitements antiviraux spécifiques du SARS-CoV-2 s'est grandement intéressée à cibler un constituant essentiel à la réplication virale des coronavirus : la protéase 3CL. En plus de son rôle crucial dans la réplication, cette protéase est bien conservée entre les coronavirus, ne présente pas d'homologue chez l'Homme et jouerait également un rôle dans la pathogénicité. La 3CL<sup>pro</sup> est donc une cible très intéressante pour lutter contre la COVID-19 et contre les futurs coronavirus émergents. Aujourd'hui, 3 inhibiteurs de cette protéase ont été autorisés sur différents marchés. Il s'agit du nirmatrelvir (en association au ritonavir, spécialité PAXLOVID™), de l'ensitrelvir (sous forme d'acide fumarique ensitrelvir, spécialité XOCOVA™) et du simnotrelvir (en association au ritonavir, spécialité XIANNUOXIN™).

---

**Membres du jury** :

**Directeur de thèse / Président** : Docteur Julie CHARTON, Maître de conférences, Laboratoire de chimie organique, Université de Lille.

**Assesseur** : Docteur Annie STANDAERT, Docteur en Pharmacie, Maître de conférences, Laboratoire de parasitologie et biologie animale, Université de Lille.

**Membre extérieur** : Docteur Alexis Pruvost, Docteur en Pharmacie, Pharmacie Catteau de Saint-Martin-Lez-Tatinghem.