

# Antivirusni lijekovi za COVID-19

---

**Petrović, Matko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:860722>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Matko Petrović

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANTIVIRUSNI LIJEKOVI ZA COVID-19**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2022.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. kolovoza 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. SARS-CoV-2.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Struktura i sporedne ciljne molekule.....</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Glavna proteaza.....</i>	<i>5</i>
2.1.3. <i>Replikacijski i transkripcijski kompleks .....</i>	<i>7</i>
2.1.4. <i>Patogeneza i pristupi liječenju.....</i>	<i>10</i>
<b>2.2. Remdesivir .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. <i>Općenito.....</i>	<i>13</i>
2.2.2. <i>Sinteza.....</i>	<i>13</i>
2.2.3. <i>Mehanizam djelovanja .....</i>	<i>13</i>
<b>2.3. Molnupiravir .....</b>	<b>17</b>
2.3.1. <i>Općenito.....</i>	<i>17</i>
2.3.2. <i>Sinteza.....</i>	<i>17</i>
2.3.3. <i>Mehanizam djelovanja .....</i>	<i>17</i>
<b>2.4. Favipiravir .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5. Nirmatrelvir/ritonavir .....</b>	<b>23</b>
2.5.1. <i>Općenito.....</i>	<i>23</i>
2.5.2. <i>Sinteza.....</i>	<i>23</i>
2.5.3. <i>Mehanizam djelovanja .....</i>	<i>25</i>
<b>§ 3. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>27</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXVIII</b>



## § Sažetak

Pandemija COVID-19 jedna je od najvećih zdravstvenih i ekonomskih prijetnji globalnoj zajednici u posljednje vrijeme. Izazvana je virusom SARS-CoV-2, čija je struktura i funkcija u zadnje dvije godine detaljno istražena i opisana od strane mnogih autora. Postoje četiri glavna strukturalna proteina, a to su „spike“ protein (S), protein ovojnice (E), protein nukleokapside (N) i membranski protein (M). Osim njih, postoje i nestrukturalni proteini koji sudjeluju u koracima virusnog ciklusa, poglavito u replikaciji i transkripciji, te ulaze u interakciju s imunološkim sustavom domaćina. Među njima najistraženiji su glavna proteaza ( $M^{pro}$ ) i RNA-ovisna RNA-polimeraza (RdRP). Njihovom inhibicijom postiže se dobar klinički učinak.

Unatoč tome, trenutačne terapijske mogućnosti nisu zadovoljavajuće i ima puno mjesta, ali i ambicije za napredak. U ovome radu opisani su lijekovi koji ciljaju  $M^{pro}$  i RdRP, no ukratko su napomenute i druge moguće terapijske mete, tj. molekule koje sudjeluju u virusnom ciklusu SARS-CoV-2 za koje bi se u budućnosti mogli, ili se već razvijaju ciljani lijekovi ili cjepiva. Tu pripadaju „spike“ protein, protein N, protein E i  $PL^{pro}$  te razni pomoćni proteini.

Patogeneza COVID-19 podijeljena je u tri kliničke faze; pulmonalnu, proupalnu i protrombotsku fazu. Svaka od faza obilježena je svojim uzrocima, mehanizmom i kliničkim manifestacijama. Potrebno je moći presuditi trenutnu fazu pacijenta radi liječenja jer svaka od faza ima svoje skupine lijekova koji bi tijekom nje mogli biti djelotvorni, dok bi u drugim fazama mogli biti i štetni.

Remdesivir je predlijek strukture monofosfatnog analoga adenzina. Djeluje mehanizmom odgođenog prekida sinteze lanca, dakle inhibira funkciju RdRP. Uzrok prekidu sinteze RNA lanca sterički je smetnja supstituenta 1'-CN ugrađenog remdesivir-monofosfata i aminokiseline S861 što onemogućava translakaciju RdRP na sljedeću poziciju nizvodno.

Molnupiravir je oralno dostupan izopropilesterski predlijek ribonukleozidnog analoga  $\beta$ -D- $N^4$ -hidroksicitidina. Mehanizam djelovanja molnupiravira u liječenju COVID-19 objašnjen je mehanizmom letalne mutageneze. Njome dolazi do tranzicija C u U i G u A, a one su pak bazirane na tautomeriji molnupiravira; amino-M tautomer tvori par s gvaninom, a imino-M tautomer tvori par s adeninom. Ključan aspekt ovog mehanizma je da ne prekida sintezu novog RNA lanca, no dovodi do mutacija u novonastalom genomu što onemogućava daljnje funkcioniranje virusa.



Favipiravir strukturno je sličan gvaninu, no sadrži pirazinski prsten. Mehanizam djelovanja nedovoljno mu je objašnjen. Može djelovati prekidom transkripcije, odnosno inhibicijom funkcije RdRP, poput remdesivira, no pokazana je i da može djelovati mehanizmom letalne mutageneze, poput molnupiravira.

Nirmatrelvir novi je oralno dostupan antivirusni lijek. Inhibira djelovanje  $M^{pro}$ , odnosno cijepanje poliproteina pp1a i pp1ab na nestrukturne proteine, koji su pak bitni za cjelokupno funkcioniranje virusa u stanicama domaćina. Primjenjuje se u kombinaciji s ritonavikom te je njihova kombinacija nazvana Paxlovid. Ritonavir nema djelovanja protiv  $M^{pro}$ . On je inhibitor proteaze virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1), ali ključno je da inhibira i CYP3A4, enzim koji najvećim udjelom sudjeluje u razgradnji nirmatrelvira.

## § 1. UVOD

Koronavirusi najveći su među RNA virusima. Karakterizirani su visokim učestalošću genetičkih rekombinacija i mutacija što je uzrok njihove ekološke raznolikosti; uspijevaju inficirati raznovrsne domaćine, najčešće ptice i sisavce. Ljudski koronavirusi godišnje uzrokuju 10–30% infekcija gornjeg respiratornog sustava karakteriziranih blagim simptomima, poput obične prehlade. Nasuprot tome, SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus), MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) i SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) mogu uzrokovati teže bolesti, poput pneumonija, koje rezultiraju većim mortalitetom. U razdoblju 2002.–2003., dokazano je 8096 slučajeva SARS-CoV te je uzrokovao 774 smrti. Do kraja siječnja 2020. godine, dokazano je 2500 slučajeva MERS-CoV i više od 800 asociranih smrti. U prosincu 2019. kao uzročnik slučajeva teških upala pluća izoliran je i identificiran novi koronavirus, kasnije nazvan SARS-CoV-2.<sup>1</sup>

Pandemija COVID-19, izazvana virusom SARS-CoV-2, neviđena je globalna zdravstvena kriza koja traje više od dvije godine. Do trenutka pisanja, u svijetu je dokazano 608,328,548 slučajeva COVID-19 i 6,501,469 asociranih smrti.<sup>2</sup> Ipak, učinkovite terapije za liječenje COVID-19 i dalje su izrazito ograničene. Zbog njegova brza i kontinuirana širenja diljem svijeta, potrebno je što prije identificirati i karakterizirati mete za lijekove i cjepiva. Trenutno su glavne mete razvoja lijekova u terapiji vitalni proteini u virusnom ciklusu SARS-CoV-2, no opisane su i razne terapije usmjerene na samu patogenezu COVID-19.

Cilj ovoga rada je na temelju opisa sastavnica SARS-CoV-2, od cijelog viriona do individualnih proteina virusa, objasniti funkcioniranje samog virusa unutar stanice domaćina i imunološki odgovor domaćina na infekciju te mehanizme djelovanja izabranih antivirusnih lijekova u liječenju COVID-19, kao i ukazati na druge potencijalne terapijske mete.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

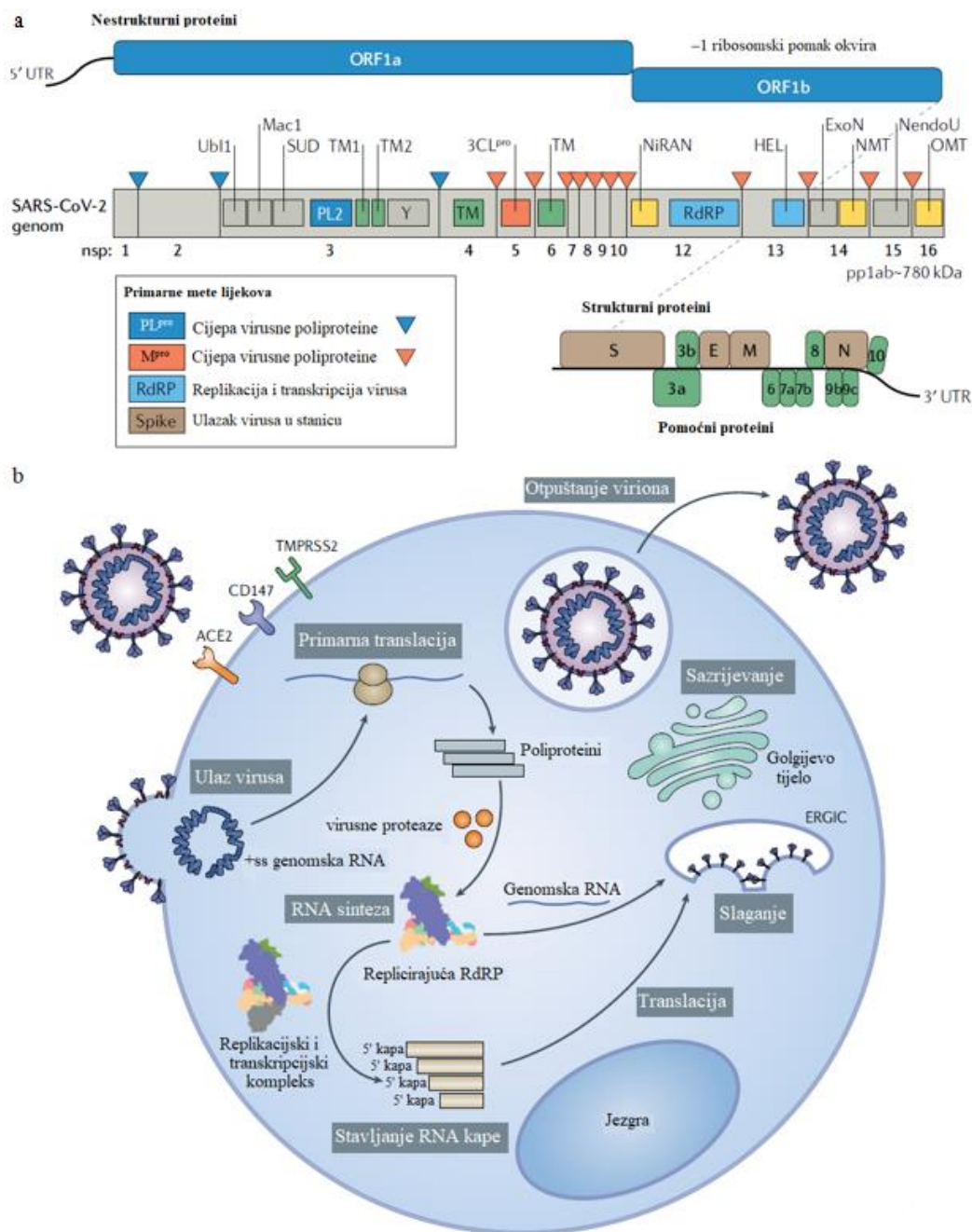
### 2.1. SARS-CoV-2

#### 2.1.1. Struktura i sporedne ciljne molekule

SARS-CoV-2 ovijeni je virus s jedinstvenom strukturom površine sličnoj Sunčevoj koroni (kruni), koja proizlazi iz prisustva tzv. „spike“ (šiljak) proteina na njenoj površini.

Njegov je genom jednolančana (+)-RNA veličine blizu 30 kb s 14 otvorenih okvira čitanja te kodira ukupno 29 proteina. Pozitivne RNA mogu se direktno čitati u svrhu sinteze proteina, dok kod negativnih mora postojati korak sinteze komplementarnog lanca RNA koji zatim služi za sintezu proteina. Ti nestrukturani, strukturni i pomoćni proteini sudjeluju pri ulasku virusa u stanicu domaćina, replikaciji, transkripciji te sklapanju viriona i njihovom otpuštanju iz stanice, ali i pri interakciji s raznim proteinima stanice domaćina. Dvije trećine 5'-kraja genoma SARS-CoV-2, ORF1a i ORF1b, kodiraju dva preklapajuća poliproteina, pp1a i pp1ab. Njihovom razgradnjom proteazama virusa, PL<sup>pro</sup> i M<sup>pro</sup>, nastaje 16 nestrukturanih proteina (nsp), potrebnih za replikaciju virusa i transkripciju. Četiri okvira čitanja na 3'-kraju genoma kodiraju set strukturnih proteina potrebnih za sastavljanje viriona, a to su „spike“ protein (S), protein ovojnice (E), protein nukleokapside (N) i membranski protein (M), koji sudjeluju i u supresiji imunološkog odgovora domaćina. Niz pomoćnih gena (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9b i ORF14) koji kodiraju odgovarajuće pomoćne proteine nalaze se između navedenih strukturnih gena. Pomoćni geni sudjeluju u regulaciji infekcije, ali nisu dio strukture viriona, osim proteina ORF3a i ORF7a. Struktura genoma SARS-CoV-2 prikazana je detaljnije na slici 1. a.

Protein S izrazito je glikozilirani homotrimer na površini viriona, usidren u ovojnicu virusa. Glavni je posrednik vezanja viriona za staničnu membranu stanica domaćina, točnije za angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2) na staničnoj membrani, preko svoje petlje S1, te za spajanje ovojnice virusa sa staničnom membranom preko svoje petlje S2; virus dakle u stanicu ulazi endocitozom. Zbog ove neophodne uloge proteina S, atraktivna je meta za inhibiciju neutralizirajućim protutijelima, stoga je potrebna njegova karakterizacija na atomskoj razini radi racionalnijeg dizajniranja cjepiva i humanih monoklonskih protutijela. Problem u njihovom razvoju velika je učestalost mutacija u genu za protein S.



Slika 1. **a** Organizacija genoma SARS-CoV-2. Domene s bitnim funkcijama označene su pravokutnicima unutar svakog nestrukturalnog proteina u genomu. Naznačene su primarne mete lijekova u okviru. **b** Virusni ciklus SARS-CoV-2. Sastoji se od ulaska u stanicu domaćina, replikacije, transkripcije te sastavljanja viriona i njihova otpuštanja. Nakon ulaska RNA virusa u citoplazmu, ORF1a i ORF1b translirani su na ribosomima domaćina. Subgenomska virusna mRNA služi kao predložak za translaciju proteina virusa. Virioni nastaju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom tijelu, nakon čega egzocitozom izlaze iz stanice.

Prevedeno i prilagođeno prema izvoru 1.

Nakon ulaska u stanicu domaćina, protein E regulira lizu virusa i otpuštanje genoma u stanicu. Kasnije u virusnom ciklusu, sudjeluje u sastavljanju viriona i njihovoj egzocitozi lokalizirajući se na endoplazmatskom retikulumu i Golgijevu tijelu. Može funkcionirati kao ionski kanal u regulaciji pumpanja  $\text{Ca}^{2+}$  iona iz endoplazmatskog retikuluma u citosol, što može dovesti do aktivacije staničnog inflammosoma, uzrokujući jaču antivirusnu reakciju domaćina. N-terminalni dio proteina E moguća je terapijska meta za vezanje inhibitora.

Protein N služi kao jedini strukturni protein unutar viriona, štiti genom virusa i pohranjuje ga u ribonukleoproteinski kompleks. Također sudjeluju u otporu imunološkom odgovoru domaćina i odbijanju staničnih antivirusnih aktivnosti posredovanih s RNAi. Protein N potencijalna je meta za razvoj cjepiva jer inducira jak imunološki odgovor tijekom infekcije.

nsp1 (nestrukturni protein 1) nastaje cijepanjem polipeptida pp1a i pp1ab. Njegova glavna uloga je supresija translacije domaćina, prvo vezanjem za 40S ribosomsku podjedinicu, a zatim induciranjem razgradnje mRNA domaćina, pri čemu ne inhibira virusnu translaciju i replikaciju. Inhibicijom translacije staničnih antivirusnih faktora sudjeluje i u izbjegavanju imunološke obrane domaćina. Iz svega navedenog se nsp1 smatra kanonskim virulentnim faktorom. Ometanje interakcija nsp1 s ribosomima domaćina stoga je potencijalan pristup otkrivanju novih lijekova u terapijske svrhe.

Papainu-slična proteaza ( $\text{PL}^{\text{pro}}$ ) jedna je od domena multidomenskom proteina nsp3. To je cisteinska proteaza veličine 36 kDa s katalitičkom trijadom. Ona cijepa poliproteinske prekursore virusa, pp1a i pp1ab, na tri mjesta pri čemu nastaju nsp1, nsp2 i nsp3. Također može cijepati i proteine domaćina potrebne za prirodenu (nespecifičnu) imunost. Poglavitno cijepa genski produkt stimuliran interferonom 15 (ISG15) od interferon regulatornog faktora 3 (IRF3) te tako atenuira interferonski imunološki odgovor tipa 1, čime izbjegava aktivaciju imunološkog sustava domaćina. Zbog svoje je uloge privlačna meta za razvoj lijekova te je već tisuće spojeva, uključujući odobrene lijekove i molekule u kliničkim ispitivanjima, pokušano u njenoj inhibiciji, no s malim uspjehom naspram lijekova ciljanih na  $\text{M}^{\text{pro}}$ .

ORF3a protein membranski je protein tipa ionskog kanal sačinjen od 274 aminokiselina. Stvara kanal osjetljiv na kalij te potiče otpuštanje virusa iz stanice. Na N-kraju sadrži domenu za vezanje TRAF-a koja može aktivirati NF- $\kappa$ B i inflammosom NLRP3, stoga vjerojatno ima bitnu ulogu u imunološkom odgovoru domaćina. Budući da je ionski kanal, koji su često bitna terapijska meta i već je odobreno mnogo lijekova koji ih ciljaju, ORF3a također je dobra meta u razvoju antivirusnih lijekova.

ORF7a transmembranski je protein tipa I. Sudjeluje u interakcijama virusa i domaćina te u prometu proteina između endoplazmatskom retikuluma i Golgijeva tjelešca.

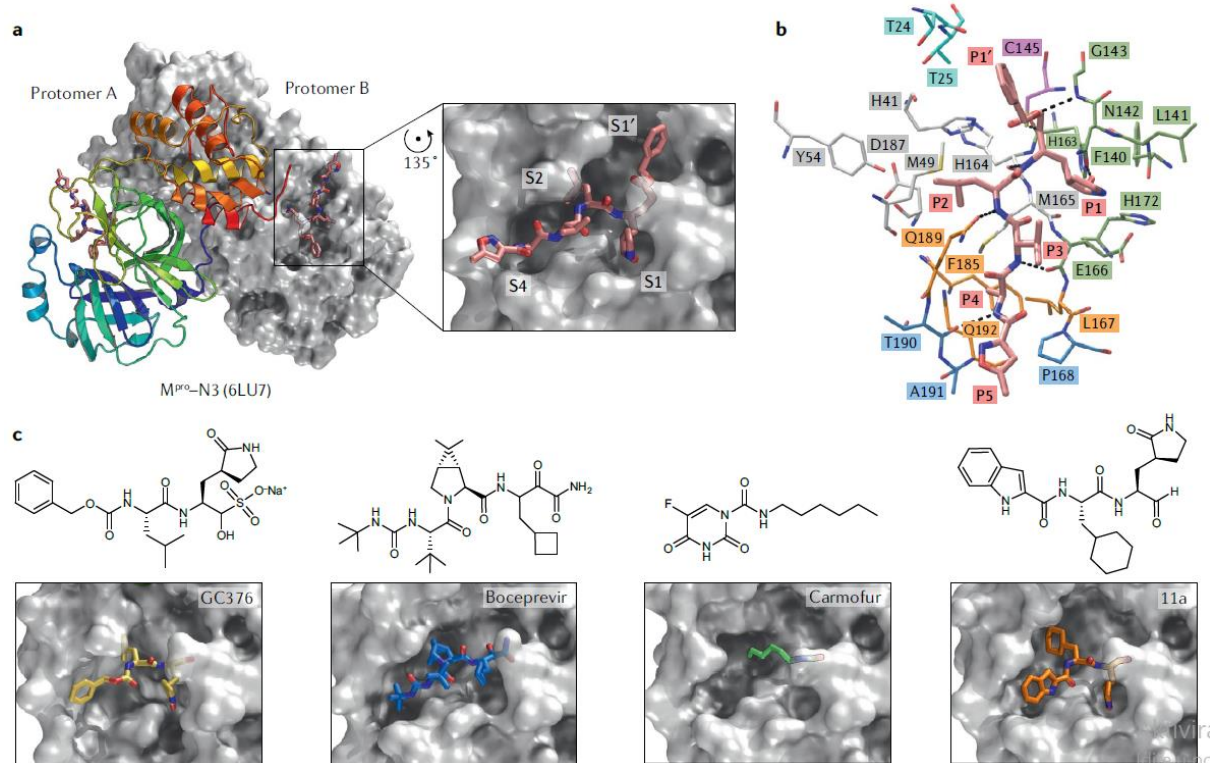
ORF8 pomoćni je protein sačinjen od 121 aminokiselina. Struktura mu je jasno istražena, no o njegovoj ulozi malo se zna.

ORF9b suprimira interferonski imunološki odgovor tipa I interakcijom s podjedinicom TOM70 mitohondrijskog receptora za unos. Inhibicija te interakcije predložena je kao moguća terapijska meta u razvoju lijekova.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Glavna proteaza

Glavna proteaza ( $M^{pro}$ ) SARS-CoV-2 cijepa replikazne poliproteine oslobađajući nestrukturane proteine potrebne za sastavljanje replikacijske i transkripcijske mašinerije virusa. To je kisela proteza sačinjena od 306 aminokiselina u tri domene (I, II i III) te poprima oblik sličan naboru kimotripsina. Zbog slične specifičnosti za supstrat i prisustva cisteina kao katalitički aktivne aminokiseline, klasificira se kao 3C-slična proteaza, stoga se ponekad označava i kao  $3CL^{pro}$ .

Funkcionira kao aktivni homodimer, u kojem su dva protomera skoro okomita jedan na drugi. N-terminalni prst jednog protomera ulazi u prostor između domena II i III susjednog protomera te promiče stvaranje dimera i S1 dijela veznog mjesta u susjednom protomeru. Dimerizacija je dodatno regulirana domenom III interakcijom ionskog mosta između E290 jednog protomera i R4 susjednog protomera. Duboka pukotina u svakom protomeru između domena I i II formira mjesto za vezanje supstrata, s katalitičkom dijadom (H41 i C145) u svojem središtu. Domena III sadrži pet  $\alpha$ -uzvojnica koje se slažu u veliku antiparalelnu globularnu nakupinu te pokazuje jedinstvenu topologiju među koronavirusima. Prepoznaje pozicije P4-P1' supstrata. S1 dio veznog mjesta ima apsolutnu sklonost za glutamin na P1. P2 je veliki bočni ogranak koji može biti smješten uz duboki hidrofoban S2 dio veznog mjesta. P3 je bočni ogranak izložen otapalu, a odgovarajući S3 dio veznog mjesta može tvoriti interakcije s raznim funkcionalnim grupama. Hidrofoban S4 dio manji je od S2 dijela veznog mjesta te se prilagođava aminokiselinama s malim postraničnim lancima. Ovaj vezni džep izrazito je sačuvan među koronavirusima, ukazujući da bi antivirusni inhibitori koji ciljaju na to mjesto trebali općenito biti učinkoviti protiv koronavirusa.



Slika 2. a Struktura M<sup>pro</sup> SARS-CoV-2 u kompleksu s inhibitorom N3. Protomeri A i B drukčije su prikazani radi preglednosti. Površinski prikaz veznog mjesta za supstrat s N3 prikazan je desno. Označeni su S1', S1, S2 i S4 dijelovi veznog mjesta. b Interakcija M<sup>pro</sup> SARS-CoV-2 i N3. P1-P5 mjesta naznačena su na N3. Aminokiseline u interakciji s P1' prikazane su kao štapići svjetlo plave boje, a aminokiseline koje tvore S1, S2 i S4 dijelove veznog mjesta prikazane su zeleno, bijelo, odnosno narančasto. Aminokiseline u interakciji s P5 prikazane su plavo. Međumolekulske vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama. c Površinski prikaz veznog mjesta za supstrat s raznim inhibitorima. GC376, boceprevir, carmofur i 11a obojani su žuto, plavo, zeleno, odnosno narančasto. Njihove strukturne formule prikazane su iznad odgovarajućih površinskih prikaza. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 1.

Identificirano je mnogo inhibitora M<sup>pro</sup> SARS-CoV-2 sa širokim rasponom mehanizama djelovanja. N3 reprezentativan je peptidomimetički inhibitor. Sadrži Michaelov akceptor, kojim stvara kovalentnu vezu s cisteinom u aktivnom mjestu (C145), te supstituente koji se protežu kroz cijelo vezno mjesto za supstrat. Na mjesta P1-P5 ulaze redom laktamski prsten, izobutilna skupina, izopropilna skupina, metilna skupina i izoksazol. GC376, inhibitor virusa mačjeg infektivnog peritonitisa u prekliničkim studijama, učinkovito inhibira glavnu proteazu



SARS-CoV-2 kovalentno se vežući na C145 preko aldehyd-bisulfitne skupine. Pokazano je da je inhibiraju i razni  $\alpha$ -ketoamidi u kojima je P2-P3 amidna veza zamijenjena piridonskim prstenom, što produžuje njihovo vrijeme poluživota u plazmi. Primjeri takvih lijekova su peptidomimetički inhibitori boceprevir, telaprevir i narlaprevir, inače odobreni lijekovi u terapiji hepatitisa C. Prenamjena odobrenih lijekova tako pruža alternativan pristup u razvoju lijekova u terapiji COVID-19, što može dovesti i do ubrzanog odobrenja novih lijekova. Još jedan primjer prenamijenjenog lijeka je antineoplastik karmofur, derivat 5-fluorouracila, koji također pokazuje i antivirusno djelovanje *in vitro*. Njegova karbonilna skupina kovalentno se veže za C145, a rep masne kiseline proteže se u hidrofoban S2 dio veznog mjesta. Takav način inhibicije pruža odličan pristup za racionalan razvoj novih potentnijih lijekova s istim ili sličnim mehanizmom djelovanja. 11a i 11b dva su peptidomimetička aldehida s indolnim dijelom; njihova aldehydna grupa kovalentno se veže s katalitički aktivnim cisteinom u aktivnom mjestu čime je inhibirana aktivnosti M<sup>pro</sup>. Nirmatrelvir, inhibitor M<sup>pro</sup> sličan 3C, opisan je u zasebnom poglavlju zbog svoje relevantnosti.<sup>1</sup>

### 2.1.3. Replikacijski i transkripcijski kompleks

U infekciji koronavirusom, replikacija i transkripcija regulirane su mehanizmom koji se odvija na više podjedinica replikacijskog i transkripcijskog kompleksa (RTC). Njegov ključni dio je nsp12, odnosno RdRP (RNA-ovisna RNA-polimeraza), koja katalizira sintezu RNA virusa. Dodatno, nsp7 (pomoćni faktor) i nsp8 (primaza) doprinose aktivaciji i nastavljanju proizvodnje RNA virusa, a nsp12 zajedno s njima tvori potpuni RdRP kompleks. On je detaljnije prikazan na slici 3.

nsp12 SARS-CoV-2 sadrži 3 glavne domene, to su NiRAN (nidovirusnu nukleotidiltransferazu asociranu s RdRP) domena, vezna domena i domena RdRP oblika desne šake (sastavljene od poddomena prsti, dlan i palac). Aktivno mjesto nalazi se u poddomeni dlana, koje ima oblik poput aktivnog mjesta u RNA polimerazama virusa hepatitisa C i poliovirusa, te sadrži konzervirane motive A–E. Građa središnje šupljine slična je drugim konzerviranim polimerazama te uključuje ulaze za dupleks primer-predložak i nukleotid-trifosfate (NTP) te izlazni put za nascentni lanac. Aminokiseline D760 i D761 uključene su u koordinaciju dva magnezijeva kationa (Mg<sup>2+</sup>) potrebna za polimeraznu aktivnost. Jedan magnezijev ion koordinira motiv C te se veže na 3'-kraj RNA primera, te podupire kondenzacijsku reakciju u sintezi lanca RNA, dok drugi magnezijev ion pozicionira



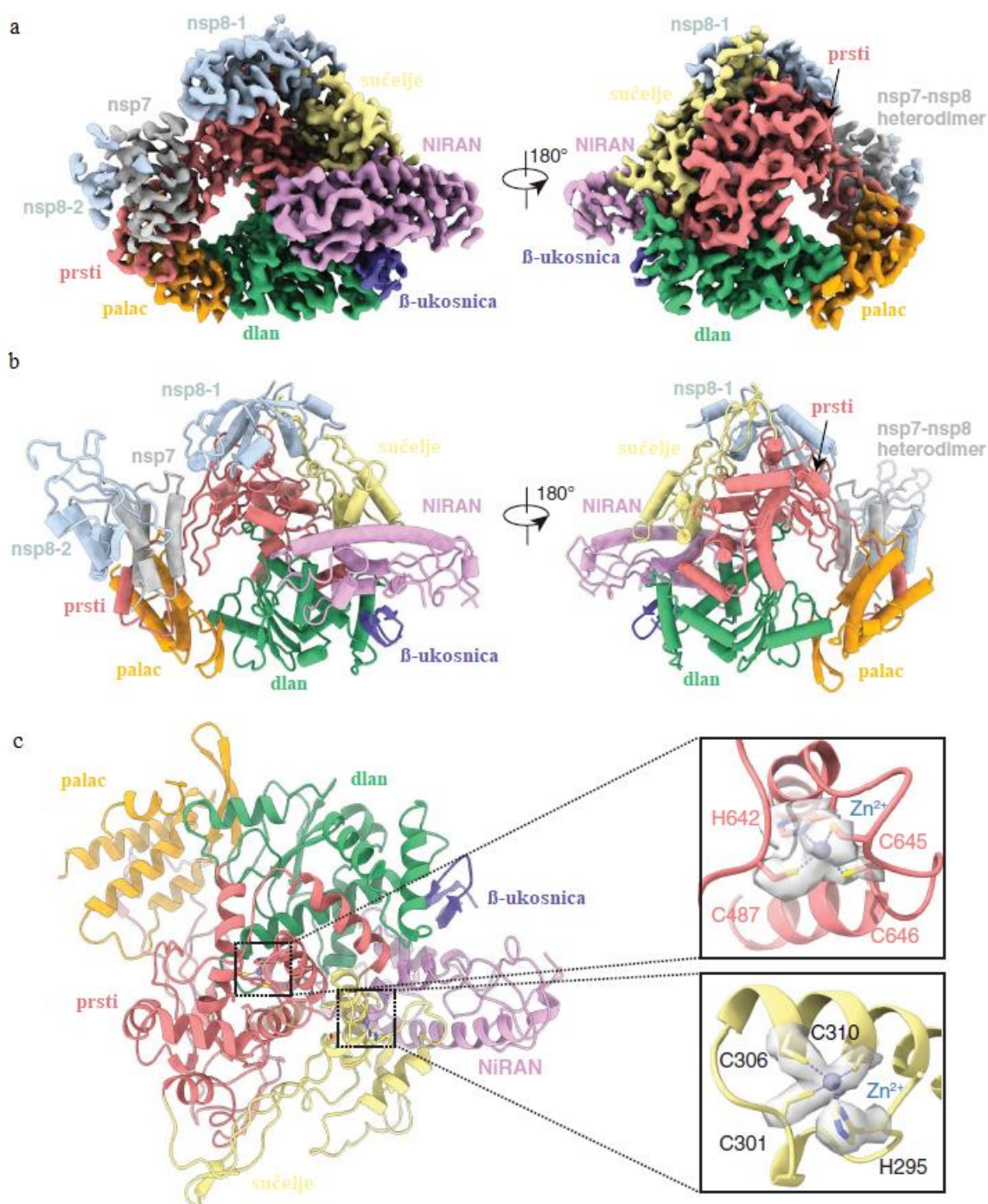
nadolazeći NTP te stabilizira negativno nabijenu okolinu. Motivi F i G unutar poddomene prstiju navode predložak RNA.

Tijekom sinteze RNA dolazi do značajnih konformacijskih promjena radi prilagođavanju vezanja RNA. Predložak i sintetizirani lanac RNA tijekom sinteze međusobno su vezani kao dupleks RNA predložak-produkt, a njihovom disocijacijom usporila bi se replikacija. Kao takvi zajedno izlaze kroz aktivno mjesto bez steričkih smetnji te se protežu do dva pozitivno nabijena „kližuća stupa“ koje tvore N-terminalne zavojnice dvaju nsp8. Oni u ranom stadiju replikacije imaju dvije različite orijentacije; u jednoj su bliski poddomeni prstiju, dok su u drugoj u interakciji s dupleksom RNA, što nalaže regulatornu ulogu nsp8 u inicijaciji replikacije. Kompleks sačinjen od nsp7, nsp8, nsp12 i dupleksa RNA predstavlja replicirajuću fazu RdRP, stoga se tada cijeli kompleks naziva centralni RTC (C-RTC). Radi očuvanja genetičkog integriteta potrebni su točnost replikacije, koju provjera nsp14, te efikasnost replikacije, koju osigurava funkcionalni elongacijski RTC (E-RTC). E-RTC tvori C-RTC s dvije spregnute kopije nsp13 helikaza, nsp13-1 i nsp13-2. nsp13 ključan je u procesima replikacije i stavljanja mRNA 5'-kape, što uključuje odmatanje dupleksa RNA, stvaranje 5' do 3' usmjerenja RNA lanca te RNA 5'-trifosfataznu aktivnost.<sup>1</sup>

Postoji nekoliko strukturnih razlika između apo i kompleksne strukture RdRP, kao što je prikazano na slikama 5. e i f. nsp7 pomaknut je prema srži RdRP 1,5 Å, što promjenama konformacije uzrokuje slabiju asocijaciju drugog nsp8 u kompleksu. Zatim, petlja koja povezuje prvu i drugu zavojnicu poddomene palca pomiče se prema van 2,8 Å radi vezanja dvostruke zavojnice DNA. Konačno, aminokiseline K500 i S501 motiva G pomiču se prema van 2,0 Å radi vezanja lanca predloška RNA. Osim toga, apo nsp12 i kompleks nsp12 s RNA izrazito su slični, što implicira relativnu stabilnost SARS-CoV-2 RdRP pri funkcioniraju kao replikaza, ali i da nije potrebna dodatna energija za konformacijske promjene u aktivnom mjestu tijekom replikacijskog ciklusa. Stoga je virusna RdRP visoko procesivan enzim s brzinom replikacije od 100 nukleotida po sekundi.<sup>3</sup>

Proces stavljanja 5'-kape slijedi nakon sinteze mRNA te osigurava virusnu translaciju i propagaciju, zaštitu mRNA od enzima u stanici te izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina. Odvija se u četiri koraka: (1) uklanjanje  $\gamma$ -fosfata od 5'-pppA s nsp13, (2) prijenos GMP na 5'-ppA s NiRAN domenom nsp12, (3) metilacija N7-gvanina s nsp14 i (4) 2'-O-metilacija riboze s nsp1 u konačan produkt, 7MeGpppA2'Ome. nsp9 može inhibirati gvanilil-transferaznu aktivnost nsp12 umetanjem sebe u njegovu NiRAN domenu čime prekida

tu reakciju. Sadrži pozitivno nabijeni žlijeb koji zajedno s  $\beta$ -ukosnicom na N-kraju nsp12 tvori izlazni put za postkatalitičku GpppA-RNA.



Slika 3. a, b Struktura RdRP kompleksa s nsp7, nsp8 i nsp12, dobivena krio-elektronskom mikroskopijom, prikazana iz dviju nasuprotnih strana i različitim prikazima. c Označen je motiv za vezanje cinka te je prikazana koordinacija cinkova kationa odgovarajućim aminokiselinama. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 3.

Još jedna bitna funkcija RTC ispravljanje je pogrešno sparenih baza (proofreading). SARS-CoV-2 zahvaljujući svojem nsp14, egzonukleazi, ima visok stupanj očuvanosti genetičkog materijala od mutacija tijekom replikacije, što je u kontrastu s drugim RNA virusima. Taj proces uključuje prepoznavanje prethodnih krivo sparenih baza (backtracking), što dovodi do istiskivanja jednostrukog 3'-segmenta sintetizirane RNA prema ulaznom tunelu za NTP. Zatim krivo spareni nukleotid na 3'-kraju ulazi kroz navedeni tunel te se uklanja egzonukleaznom aktivnošću nsp14. nsp13, helikaza, također sudjeluje u ovome mehanizmu.

RdRP primarna je meta lijekova u terapiji COVID-19. Inhibicija njegove aktivnosti sprječava virusnu replikaciju te postiže kliničku učinkovitost. Postoje mnogi nukleotidni i nenukleotidni inhibitori, koji služe i kao osnova za daljnji razvoj antivirusnih lijekova širokog spektra. Predlijevak remdesivir pokazuje dobru aktivnost protiv SARS-CoV-2 RdRP te će biti opisan u zasebnom poglavlju. Favipiravir je nukleozidni analog odobren u liječenju influence u Japanu. On potiče inkorporaciju ATP-a i GTP-a u produkt RNA, ali inhibira proliferaciju virusa povećanjem učestalosti mutacija u genomu virusa tijekom replikacije, slično molnupiraviru, koji će također biti opisan u zasebnom poglavlju.

Nukleotidni inhibitori, pogotovo oni koji prekidaju sintezu RNA, kasnije mogu biti izrezani mehanizmom provjere točnosti. Stoga se kao alternativan pristup razvoju lijekova razmatraju i nenukleotidni inhibitori. Suramin, stari lijek za liječenje afričke bolesti spavanja i riječne sljepoće, može efektivno inhibirati aktivnost polimeraze SARS-CoV-2 vezanjem dviju molekula na aktivno mjesto nsp12, tako da jedna zauzima katalitički aktivno mjesto, a druga vezno mjesto za predložak RNA. No zbog svojeg velikog negativnog naboja, može se vezati i za površine mnogih drugih pozitivnih makromolekula, što umanjuje njegovu specifičnost.<sup>1</sup>

#### *2.1.4. Patogeneza i pristupi liječenju*

Radi razvoja učinkovitih terapija i preventivnih mjera protiv COVID-19 potrebno je poznavati i patogenezu na molekularnoj razini. Načelno, patogeneza COVID-19 može se podijeliti u tri klinički najčešće odvojene, ali ponekad preklapajuće faze. Kronološkim redom pojavljivanja tijekom infekcije to su pulmonalna, proupalna i protrombotska faza.

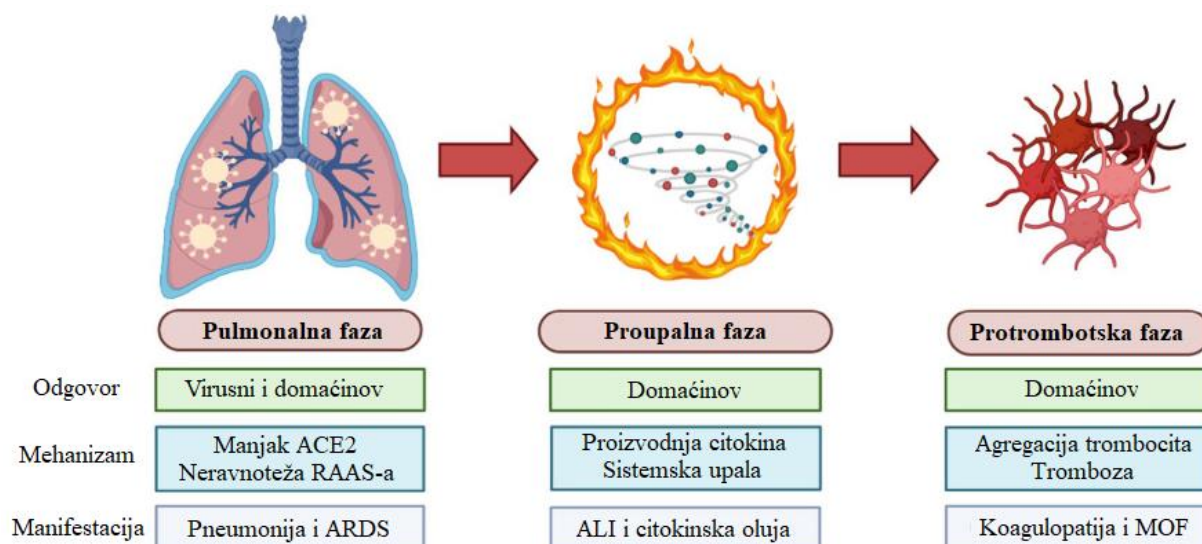
U pulmonalnoj fazi, SARS-CoV-2 inficira epitelne stanice gornjeg i donjeg respiratornog sustava te uzrokuje intersticijsku upalu pluća. Njegova glavna meta su pneumociti tipa 2 zbog njihove izražene ekspresije ACE-2 na staničnoj membrani. Oni proizvode plućni surfaktant čime smanjuju površinsku napetost unutar alveola i time olakšavaju disanje, ali i

služe kao matične stanice koje mogu diferencirati u pneumocite tipa 1, glavne stanice alveola preko kojih se odvija izmjena plinova. Na staničnoj razini infekcijom stanice dolazi do deficijencije ACE-2, potrebnog za pretvorbu angiotenzina II u angiotenzin 1–7, što dovodi do neravnoteže u RAAS (renin-angiotenzin-aldosteron) sustavu. Točnije, suvišak angiotenzina II uzrokuje pretjeranu sistemsku vazokonstrikciju, upalu, fibrozu, trombozu i stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, dok manjak angiotenzina 1–7 umanjuje njegovu protuupalnu aktivnost u krvožilnom sustavu, što zajedno vodi prema akutnoj ozljedi pluća (ALI, acute lung injury), akutnom respiratornom distresnom sindromu (ARDS) i srčanom zatajenju. Pokazano je i da pretjerana aktivnost proteina ADAM-17 i Des-Arg9-BK pridonosi neravnoteži RAAS sustava. Zaključno, pacijenti s postojećim kroničnim upalnim stanjima, kao što su hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, maligne bolesti, pretilost i autoimune bolesti, češće pokazuju ozbiljniju kliničku sliku nego osobe bez navedenih komorbiditeta.

U proupalnoj fazi inficirane stanice i limfociti dalje reagiraju na SARS-CoV-2 pretjeranom proizvodnjom proupalnih citokina, što dovodi citokinske oluje sistemskom upalom. Dolazi do aktivacije prirođenog imunološkog sustava, poglavito aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B receptorima za prepoznavanje obrazaca (PRR, pattern recognition receptors), koji prepoznaju molekulske motive vezane za patogene i štetu (PAMP, pathogen-associated molecular patterns, i DAMP, damage-associated molecular patterns). NF- $\kappa$ B potiče sintezu mnogih proupalnih citokina i kemokina, poglavito u alveolarnim makrofagima, plućnim epitelnim stanicama i dendritičkim stanicama. Citokinska oluja naziv je za prekomjerno otpuštanje citokina u krv što dovodi do vazodilatacije i gubitka plazme ekstravazacijom u međustanični prostor, čime dolazi do smanjenja krvnog tlaka te konačno do potpunog cirkulatornog kolapsa. Može doći i do raznih ekstrapulmonalnih komplikacija, poput akutne ozljede bubrega, jetre i miokarda, poremećenog transporta iona te gastrointestinalnih smetnji, poput povraćanja i proljeva; sve uzrokovano pretjeranom imunološkom i upalnom reakcijom tijela na infekciju SARS-CoV-2. Pacijenti s COVID-19 također pokazuju i limfopeniju, u vidu smanjene količine dendritičkih stanica, T-limfocita i NK stanica, no često dolazi i do povećanih vrijednosti neutrofila, monocita i makrofaga.

U konačnoj protrombotskoj fazi dolazi do opsežne agregacije trombocita i posljedičnih tromboza uzrokujući koagulopatiju i višeorgansko zatajivanje (MOF, multi-organ failure). Infekcijom SARS-CoV-2 dolazi do indukcije inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) koji inhibira aktivator plazminogena tipa urokinaze (uPA,

urokinase-type plasminogen activator) i tkivni aktivator plazminogena (tPA, tissue plasminogen activator), čime pak dolazi do inhibicije fibrinolize. Protrombotske komplikacije pogoršavaju i neravnoteža RAAS sustava te proupalno stanje tijekom infekcije.



Slika 4. Model patogeneze COVID-19. Prikazane su njene tri faze te opisani odgovarajući način odgovora, patogenetski mehanizam i kliničke manifestacije svake faze. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 4.

Temeljeno na gore opisanoj trofaznoj patogenezi, terapijske strategije podijeljene su prema ciljanoj fazi radi sprječavanja progresije COVID-19 te je ključno klinički svrstati pacijenta u odgovarajuću fazu COVID-19. Terapije usmjerene na pulmonalnu fazu uključuju inhibitore RAAS sustava (poput ACE-inhibitora i blokatora receptora za angiotenzin II), inhibitori ulaska u stanicu (poput ljudskog monoklonskog protutijela na CD147, meplazumab), inhibitori replikacije (remdesivir, molnupiravir) i inhibitori proteaza (nirmatrelovir). Na proupalnu fazu djeluju kortikosteroidi (deksametazon) i nesteroidni protuupalni lijekovi (poput ibuprofena), a među specifičniju terapiju pripadaju inhibitori citokina i komplementa (razna monoklonska protutijela), inhibitori signalnog puta JAK-STAT (poput ruxsolutiniba) te razni imunomodulatorni lijekovi (klorokvin, antimalarik, i fingolimod, regulator receptora za sfingozin-1-fosfat). Konačno, u protrombotskoj fazi mogu se primjenjivati antagonisti vitamina K (poput varfarina), antiagregacijski lijekovi (inhibitori receptora za ADP, poput acetylsalicylic kiseline i klopidoigrela) te inhibitori faktora Xa (poput heparina i dabigatrana).<sup>4</sup>

## 2.2. Remdesivir

### 2.2.1. Općenito

Remdesivir (RDV, prije označen GS-5734, tvorničkog imena Veklury) predlijek je strukture monofosfatnog analoga adenzina, prvotno razvijen za liječenje infekcija virusom ebola (u tu svrhu više se ne koristi). Probir baziran na staničnim linijama pokazao je kako RDV ima antivirusnu aktivnost širokog spektra protiv nekih RNA virusa, uključujući obitelji *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* (osim virusa zaušnjaka), *Coronaviridae*, *Picornaviridae* i *Pneumoviridae*, dok nije pokazao aktivnost protiv članova *Flaviviridae* (protiv kojih bi mogao efikasan biti trifosfatni oblik RDV), *Bunyaviridae*, *Arenaviridae* i *Rhabdoviridae* obitelji.

Pokazano je kako je intravenska administracija remdesivira povezana sa skraćenim vremenom ozdravljenja ili kliničkog poboljšanja. Također je dokazana sinergistička aktivnost remdesivira i molekula koje ciljaju nsp12 ili druge proteine proteina, predlažući kako bi kombinacijska terapija mogla inhibirati virusnu replikaciju pri manjim efektivnim koncentracijama lijekova.<sup>5</sup>

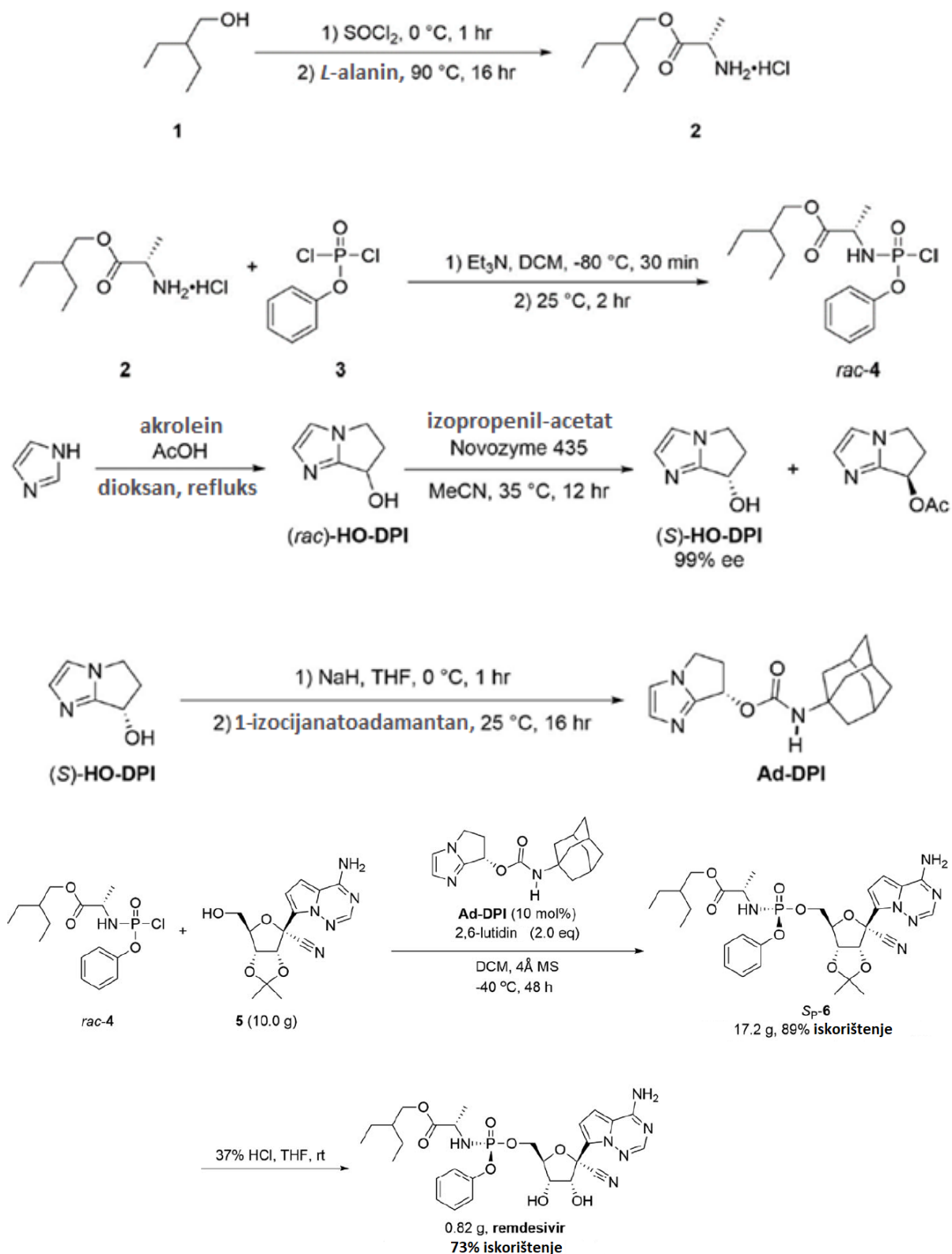
### 2.2.2. Sinteza

Jedna od objavljenih sinteza remdesivira prikazana je na slici 5. Prijašnje metode zahtijevale su kiralnu rezoluciju te dodatne korake u sintezi, što je kao posljedicu imalo manje iskorištenje. U ovoj sintezi ključna je strategija pripremiti S<sub>P</sub>-izomer zaštićenog remdesivira katalitičkom asimetričnom fosforilacijom. Samo jedna konfiguracija na P-stereocentru dobivena je fosforilacijom kataliziranom kiralnim bicikličkim imidazolom Ad-DPI.<sup>6</sup>

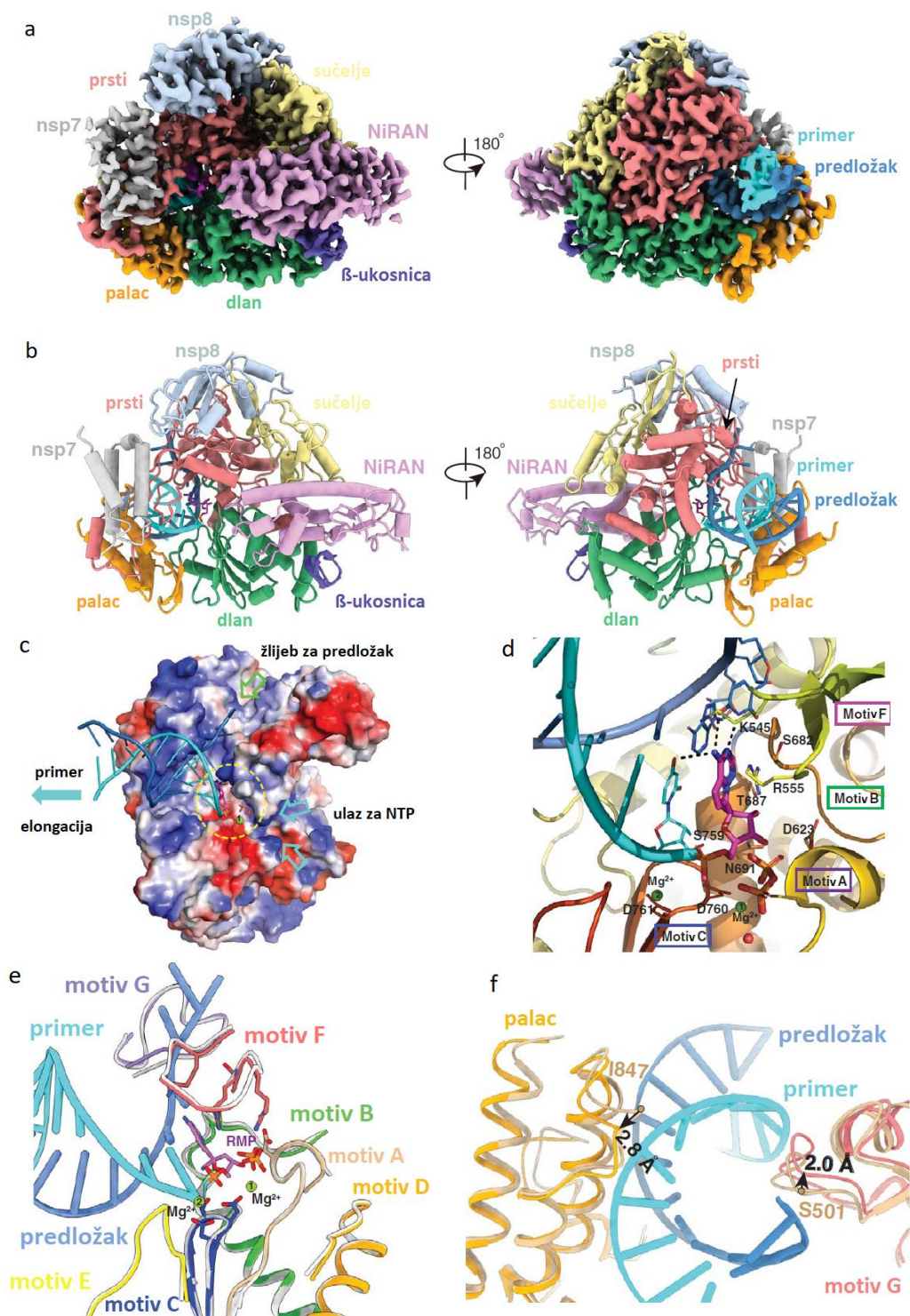
### 2.2.3. Mehanizam djelovanja

Remdesivir je prvo hidroliziran, a zatim fosforiliran metabolizmom u remdesivir-trifosfat (RTP), svoj aktivan oblik. RTP strukturno je sličan adenzin-trifosfatu (ATP). S njime se natječe tijekom sinteze RNA, a kinetičke analize pokazuju kako je preferiraniji supstrat za RdRP od ATP-a. Nakon ugradnje u lanac RNA uspijeva stvoriti fosfodietersku vezu preko svoje 3'-hidroksilne skupine sa sljedećim nukleotidom, ali zaustavlja daljnju sintezu RNA nakon sljedeća tri ugrađena nukleotida (na *i+3* poziciji, gdje je RMP na *i* poziciji). Među glavnim razlozima za prekid sinteze lanca na toj poziciji je sterički sukob 1'-CN supstituenta ugrađenog RMP i aminokiseline S861 (udaljenost oko 2 Å), koji uzrokuje nemogućnost translukacije RdRP na sljedeću poziciju nizvodno.<sup>1,7</sup>





Slika 5. Sinteza remdesivira prema Wang, M. i suradnicima. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 6.



Slika 6. a, b Struktura kompleksa RdRP s remdesivirom i RNA, dobivena krio-elektronskom mikroskopijom, prikazana iz dvije nasuprotne strane. c Površinski prikaz aktivnog mjesta RdRP s prikazom i elektrostatskog potencijala, od negativnog (crveno) do pozitivnog (plavo).

Prikazani su remdesivir-monofosfat i pirofosfat. Aktivno mjesto zaokruženo je žutom isprekidanom crtom, a žlijeb za predložak, ulaz za nukleotid-trifosfat (NTP) i smjer elongacije označeni su različito obojenim strjelicama. d Pogled na aktivno mjesto RdRP, pokazujući



kovalentno vezani RMP, pirofosfat i magnezijeve ione. Prikazane su ključne aminokiseline u interakciji s remdesivirom. e, f Superpozicija konzerviranih motiva RdRP (od A do G) u kompleksu s vezanom RNA i u apo strukturi (obojanom sivo), s pogledom na aktivno mjesto te na izlazno mjesto za predložak i sintetizirani lanac. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 3.

Detaljniji prikaz vezanja remdesivira za RdRP nalazi se na slici 6. Struktura kompleksa RdRP s predloškom RNA i RTP-om slična je strukturi apo-RdRP s nsp12 u zatvorenoj konformaciji. Dvostruku uzvojnici RNA, odnosno dupleks predloška i produkta, ovdje sačinjen od 11 parova baza, drže prst, dlan i palac poddomene. Od nsp12, 41 aminokiselina sudjeluje u vezanju RNA (26 aminokiselina veže lanac predložak, a 15 novosintetizirani lanac), no nsp7 i nsp8 ne ostvaruju interakcije s RNA. RNA u tom vezanju uglavnom sudjeluje preko svoje okosnice, a većina tih interakcija direktno je preko 2'-OH skupine riboze, što pruža osnovicu za razlikovanje RNA od DNA, dok izostanak vezanja RdRP za baze lanca predloška ukazuje da njena enzimaska aktivnost u elongacijskom koraku ne ovisi o nukleotidnom slijedu.

Na 3'-kraju sintetiziranog lanca kovalentno je vezan RMP na +1 poziciji. Dodatni nukleotidi na pozicijama +2 i +3 lanca predloška su u interakciji s aminokiselinama stražnje strane poddomene prstiju. Unatoč suvišku RTP-a prilikom stvaranja kompleksa, samo je jedna molekula RMP ugrađena u novosintetizirani lanac. Produljenje lanca trenutačno je prekinuto kada je koncentracija RTP velika i omjer koncentracija ATP/RTP nizak. Pozicija RMP je u samom središtu katalitičkog aktivnog mjesta RdRP. Kao analog adenzin-monofosfata, stvara interakcije slaganja s bazom iznad sebe u lancu te je dvjema vodikom vezama povezan s uridinom na lancu predlošku. U blizini vezanog RMP nalaze se dva magnezijeva kationa, koji su u interakciji s fosfatnim skupinama okosnice RNA i dio su katalitičkog aktivnog mjesta, te pirofosfat, koji se nalazi na ulazu kanala za NTP do aktivnog mjesta i može blokirati ulazak nukleotid-trifosfata.<sup>3</sup>

Mehanizmom odgođenog prekida sinteze lanca postiže se smanjenje uklanjanja remdesivira ispravljanjem pogrešno sparenih baza virusnom egzonukleazom nsp14. Dvije mutacije u genomu za domenu prstiju RdRP (F480L i V557L) uzrokuju smanjenu podložnost ugradnji remdesivira, ali i smanjen kapacitet replikacije, dok manjak egzonukleazne aktivnosti uzrokuje značajno povećanje podložnosti inhibiciji remdesivirom. Ipak, potpuni mehanizam djelovanja nije još shvaćen te su moguće i druge interakcije koje dovode do inhibicije.<sup>5</sup>

## 2.3. Molnupiravir

### 2.3.1. Općenito

Molnupiravir (prije označen EIDD-2801) izopropilni je ester, oralno dostupan predlijek ribonukleozidnog analoga  $\beta$ -D- $N^4$ -hidroksicitidina (EIDD-1931, ili *N*-hidroksicitidin). Pokazano je da inhibira replikaciju mnogih virusa, uključujući chikungunya virus, virus venezuelanskog konjskog encefalitisa (VEEV), respiratorni sincicijski virus (RSV), HCV, Norovirus, Influenza A i B viruse, EBOV te ljudske koronavirus, s minimalnom citotoksičnošću i visokom genetskom barijerom za rezistenciju.<sup>5</sup>

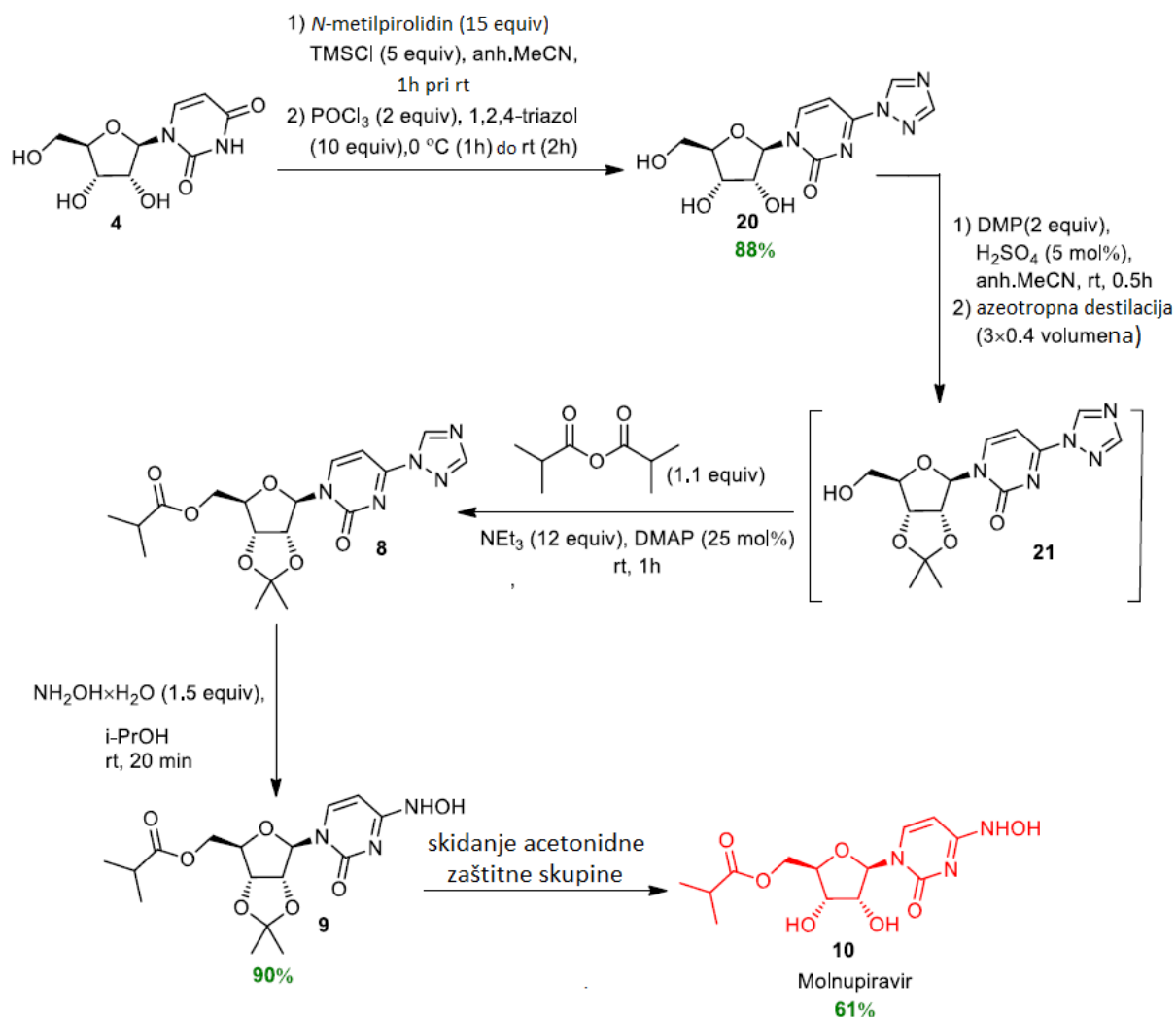
### 2.3.2. Sinteza

Jedna od mnogih objavljenih sinteza molnupiravira prikazana je na slici 6. To je unaprijeđena sinteza naspram njoj prethodnih metoda u vidu povećanog iskorištenja od 61% te manjeg broja koraka izolacije i pročišćavanja. Štoviše, razvijena je i metoda kontinuiranog protoka za njen zadnji korak, što rezultira visokom ponovljivošću i selektivnošću.<sup>9</sup>

### 2.3.3. Mehanizam djelovanja

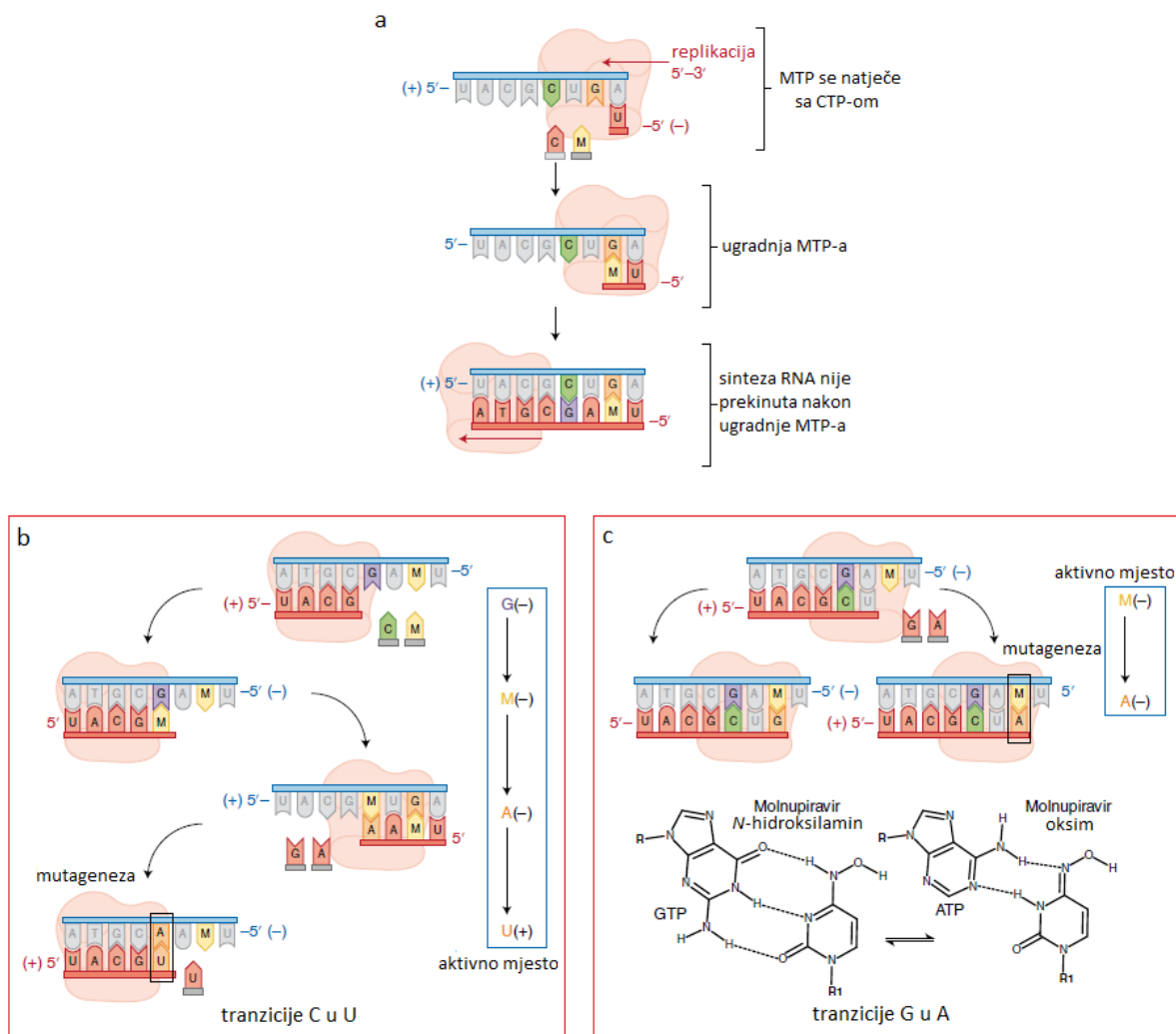
Uspješnost djelovanja molnupiravira u liječenju COVID-19 opisana je mehanizmom letalne mutageneze, koja se odvija u dva koraka. U stanici molnupiravir metabolizmom prelazi u  $\beta$ -D- $N^4$ -hidroksicitidin-trifosfat (MTP), svoj aktivan oblik. RdRP može iskoristi MTP kao supstrat umjesto CTP ili UTP. Pokazano je kako se MTP ipak efektivnije natječe sa CTP-om nego s UTP-om za aktivno mjesto RdRP.

Prvi je korak dakle česta ugradnja MTP umjesto CTP ili UTP tijekom sinteze negativne genomske RNA (–gRNA) ili subgenomske RNA (–sgRNA), uz pozitivnu genomsku RNA (+gRNA) kao predložak. U drugome koraku, RNA koja sadrži M-nukleotid koristi se kao predložak za sintezu +gRNA ili pozitivne subgenomske mRNA (+sgRNA), pri čemu prisustvo zamijenjenih nukleotida prema kasnije objašnjenom mehanizmu u nastalim pozitivnim RNA lancima ne podržava sintezu novih virusa zbog nastanka mutacija, predviđeno modelom katastrofalne pogreške.<sup>9</sup>



Slika 7. Sinteza molnupiravira prema Steiner, A. i suradnicima. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 8.

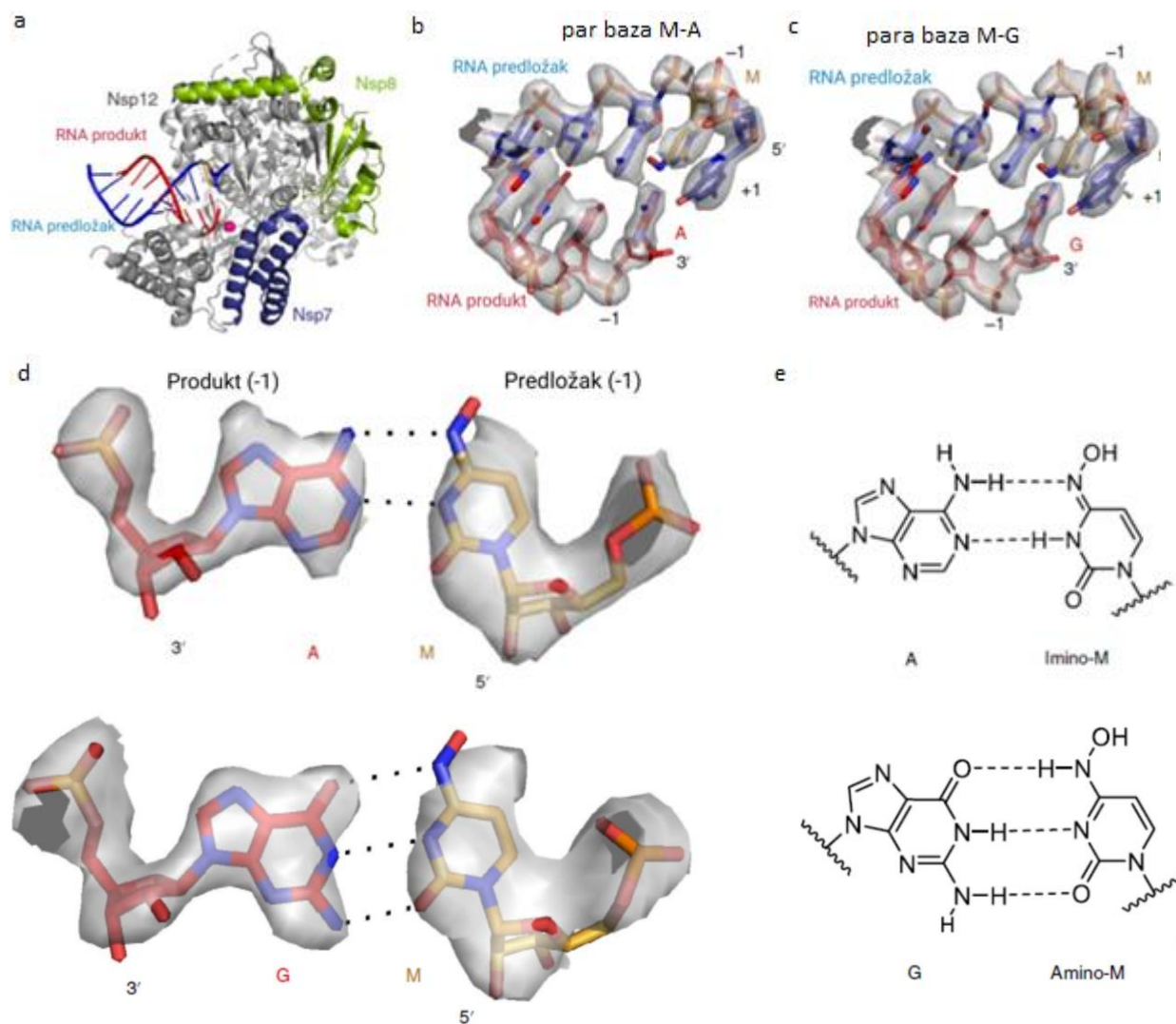
Ključan aspekt ovog modela je formiranje M-G i M-A parova baza u aktivnom centru RdRP. U svakom od ta dva para dominira jedan tautomer; tautomer amino-M tvori par s G, a tautomer imino-M tvori par s A. Ugradnja ovakvih parova ne onemogućava progresiju RdRP, za razliku od remdesivira, stoga molnupiravir izbjegava mehanizam ispravljanja pogrešno sparenih baza te se ne izrezuje egzozonukleaznom aktivnošću tijekom sinteze RNA lanca. Također, zbog stabilnosti M-G i M-A parova baza, virusna egzozonukleaza ne prepoznaje krivo ugrađeni M-nukleotid. U sljedećem koraku, MNP u predlošku RNA može tvoriti par s nadolazećim ili ATP-om ili GTP-om, ovisno o tautomernom obliku u određenom trenutku.<sup>9</sup>



Slika 8. Shema puta mutageneze molnupiravirom. a MTP se natječe uglavnom s CTP-om za ugradnju nasuprot G. b Shematski prikaz tranzicije C u U. c Shematski prikaz tranzicije G u A. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 10.

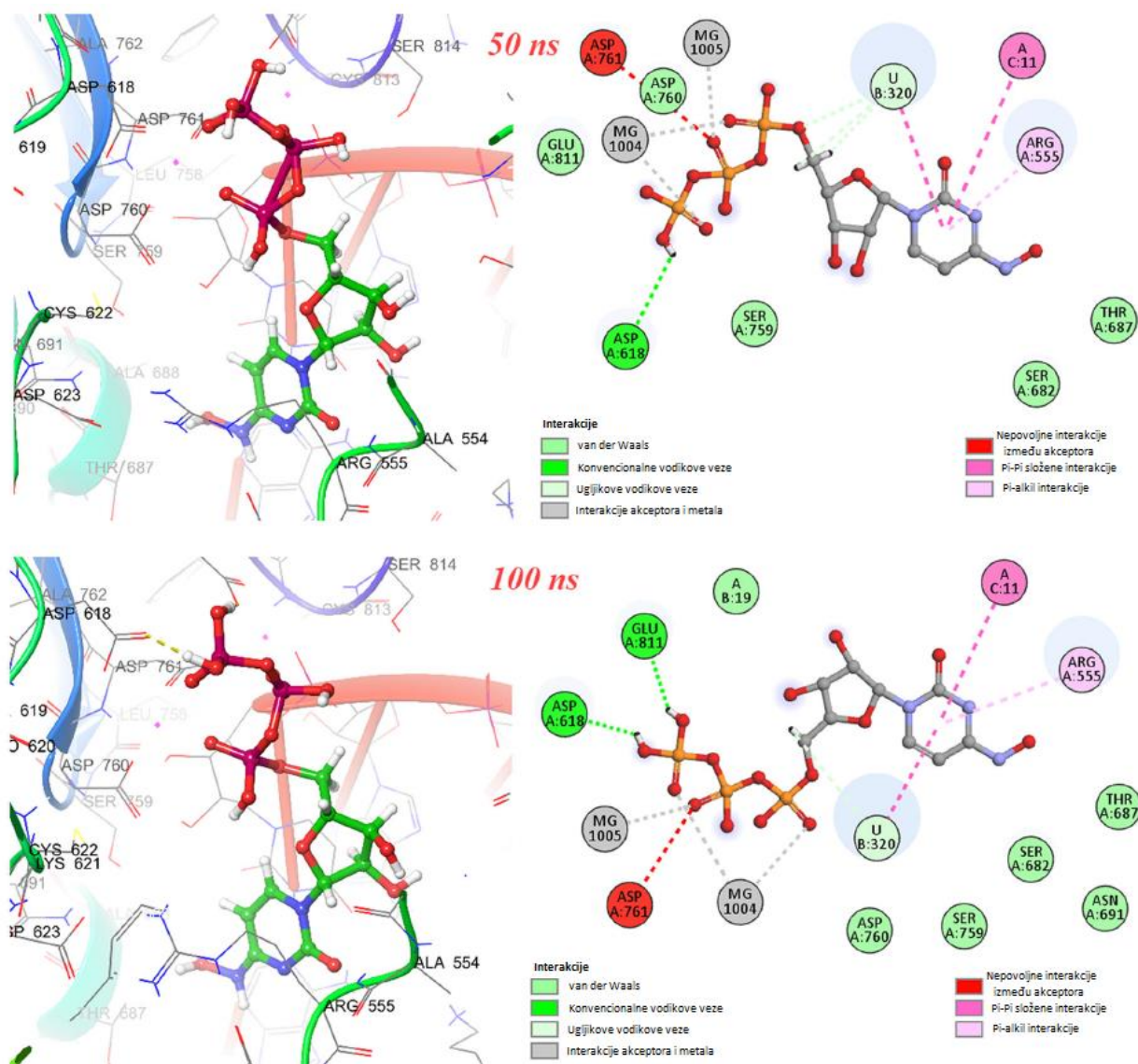
Time je objašnjen nastanak tranzicija G u A. Istim mehanizmom, no ugradnjom MNP tijekom sinteze pozitivnog genomskeg RNA lanca, mogu nastati tranzicije C u U. Oba mehanizma shematski su prikazana potpuno na slici 8. Navedene dvije tranzicije nastaju značajno češće nego njima suprotne tranzicije (U u C i A u G).<sup>9,10</sup>

Kompjutorskom analizom RdRP SARS-CoV-2 divljeg tipa dobiveno je da kompleks RdRP s RNA, koji sadrži molnupiravir, sličan onome s remdesivirom, no s određenim razlikama. Molnupiravir također je u interakciji s Arg555, no preko vodikove veze, dok je remdesivir povezan nabojem. Također se molnupiravir vodikom vezom veže sa Cys622, što remdesivir ne ostvaruje.<sup>11</sup>



Slika 9. a Struktura kompleksa RdRP s RNA nakon mutageneze inducirane molnupiravirom.

M-nukleotid (prikazan narančasto) nalazi se na poziciji  $-1$  u predlošku RNA, u paru s A-nukleotidom. nsp7, nsp8 i nsp12 prikazano su tamno plavo, zeleno, odnosno sivo, a predložak RNA i novosintetizirani lanac prikazani su plavo, odnosno crveno. Aktivno mjesto označeno je ružičastom sferom. b Struktura dupleksa RNA s parom M-A u aktivnom mjestu RdRP. Označene su pozicije  $+1$  (na predlošku RNA) i  $-1$  (na oba lanca). c Struktura dupleksa RNA s parom M-G u aktivnom mjestu RdRP. d Struktura parova M-A (gore) i M-G (dolje) u poziciji  $-1$ , dobivena krio-elektronskom mikroskopijom, gledano uzduž osi dupleksa RNA u smjeru translokacije RNA. d, e Strukturne formule parova M-A (gore) i M-G (dolje) prikazane modelom sa štapićima (d) i valentnim crticama (e). Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 9.



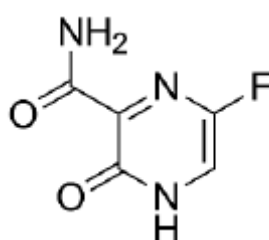
Slika 10. Struktura i ostvarene veze kompleksa MTP sa SARS-CoV-2 RdRP divljeg tipa pri simulacijama od 50, odnosno 100 ns. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 11.

Osim visoke antivirusne učinkovitosti, postoje i mogući rizici pri primjeni molnupiravira. Mitohondrijska DNA-ovisna RNA-polimeraza također može ugrađivati MTP u mitohondrijsku RNA, što bi također dovelo do mutacija u njoj gore opisanim mehanizmima. Moguće je da i ometa replikaciju DNA, što može dovesti do mutacija u DNA genomu domaćina. Osim toga, pokazuje i citotoksičan učinak.<sup>9,10</sup>

## 2.4. Favipiravir

Favipiravir (FPV, prije označavan T-705) analog je gvanina, no sadrži pirazinski prsten. Bio je odobren u nekim državama za liječenje gripe, djelotvoran je protiv svih podtipova virusa influence. Također je djelotvoran protiv Ebola i Lassa virusa. Nisu prijavljene značajne nuspojave, no postoji vjerojatnost da je teratogen i embriotoksičan.

Fosforibozilacijom i fosforilacijom u stanicama prelazi u svoj aktivan oblik, F-RTP (FPV-ribofuranozil-5'-trifosfat) te ga kao takvog RdRP prepoznaje kao purinski nukleotid, što dovodi do zaustavljanja sinteze virusne RNA.<sup>5</sup>



Slika 11. Strukturna formula favipiravira, preuzeto iz izvora 5.

Struktura vezanja favipiravira za RdRP riješena je krio-elektronskom mikroskopijom. F-RTP tvori pet vodikovih veza i sedam hidrofobnih interakcija s aminokiselinama SARS-CoV-2 RdRP, uključujući Arg553, bitnog za vezanje nadolazećih rNTP, te Asp760 i Asp761, koji se nalaze blizu katalitičkog centra na motivu C.<sup>5</sup>

RdRP može greškom ugraditi F-RTP u novosintetizirani RNA lanac, što kao posljedicu može imati prekid sinteze lanca, kao kod remdesivira, ali i mutagenezu virusnog genoma, slično molnupiraviru, no točan mehanizam djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen. Ipak, pokazano je kako favipiravir-RTP ne uspijeva usvojiti katalitički produktivnu konformaciju u aktivnom mjestu RdRP, što rezultira smanjenjem sklonosti njegove ugradnje u novosintetizirani RNA lanac. Razlog tome je što β-fosfat favipiravir-RTP-a nije povoljno smješten za nukleofilni napad 3'-OH skupine P-1 nukleotida. Uzrok takvom nepovoljnom smještaju vjerojatno je vodikova veza atoma fluora preko molekule vode s β-fosfatnom skupinom, što je predloženo na temelju podatka da se favipiraviru slična molekula bez fluora, T-1105-RTP, bolje veže od njega za RdRP.<sup>12,13</sup>



## 2.5. Nirmatrelvir/ritonavir

### 2.5.1. Općenito

Nirmatrelvir (oznake PF-07321332) novi je oralno dostupan antivirusni lijek, razvijen u svrhu terapije COVID-19. Primjenjuje se u kombinaciji s ritonavikom (zajedno nazvani Paxlovid). Ritonavir, inhibitor proteaze virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1), inhibira i CYP3A4, enzim koji najvećim udjelom sudjeluje u razgradnji nirmatrelvira. Tako povećava njegovu sistemsku koncentraciju i produljuje mu vrijeme poluživota (na otprilike 6 sati), što omogućava primjenu manje količine nirmatrelvira u jednoj dozi, čime su pak smanjeni njegovi potencijalni štetni učinci. Sam ritonavir ne pokazuje aktivnost protiv glavne proteaze SARS-CoV-2.

Kliničke studije pokazuju visoke postotke u smanjenju hospitalizacija pri njihovoj primjeni unutar 3 dana od pojave simptoma. Kombinacija nirmatrelvir/ritonavir također pokazuje sinergističko djelovanje pri primjeni s molnupiravirom.<sup>14,15</sup>

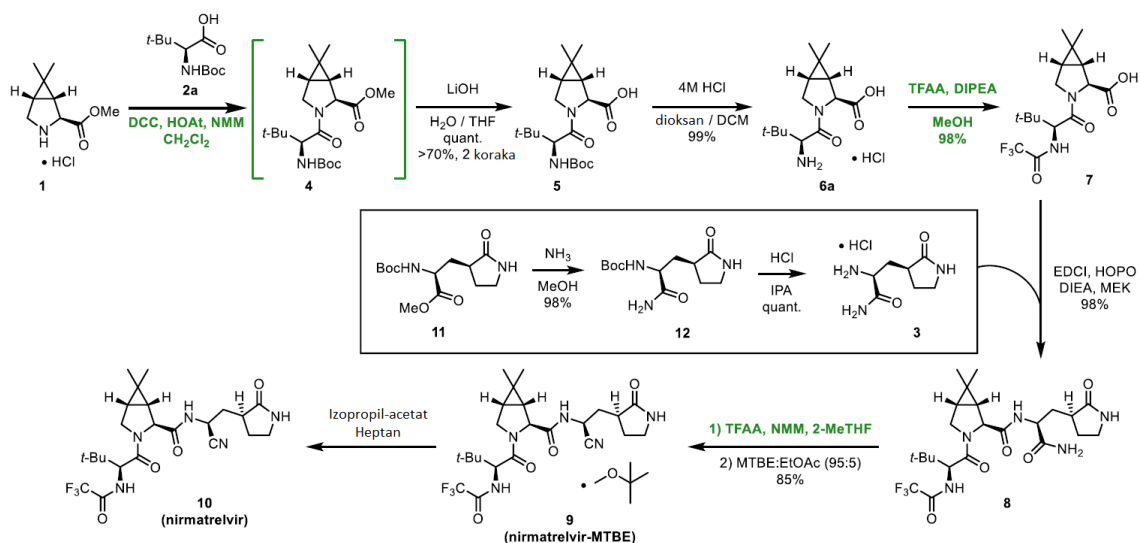
### 2.5.2. Sinteza

Na slici 12. prikazana je sinteza nirmatrelvira koju koristi Pfizer. Njeno ukupno iskorištenje je oko 48%, no njena prednost je što omogućuje proizvodnju velikih količina.<sup>16</sup>

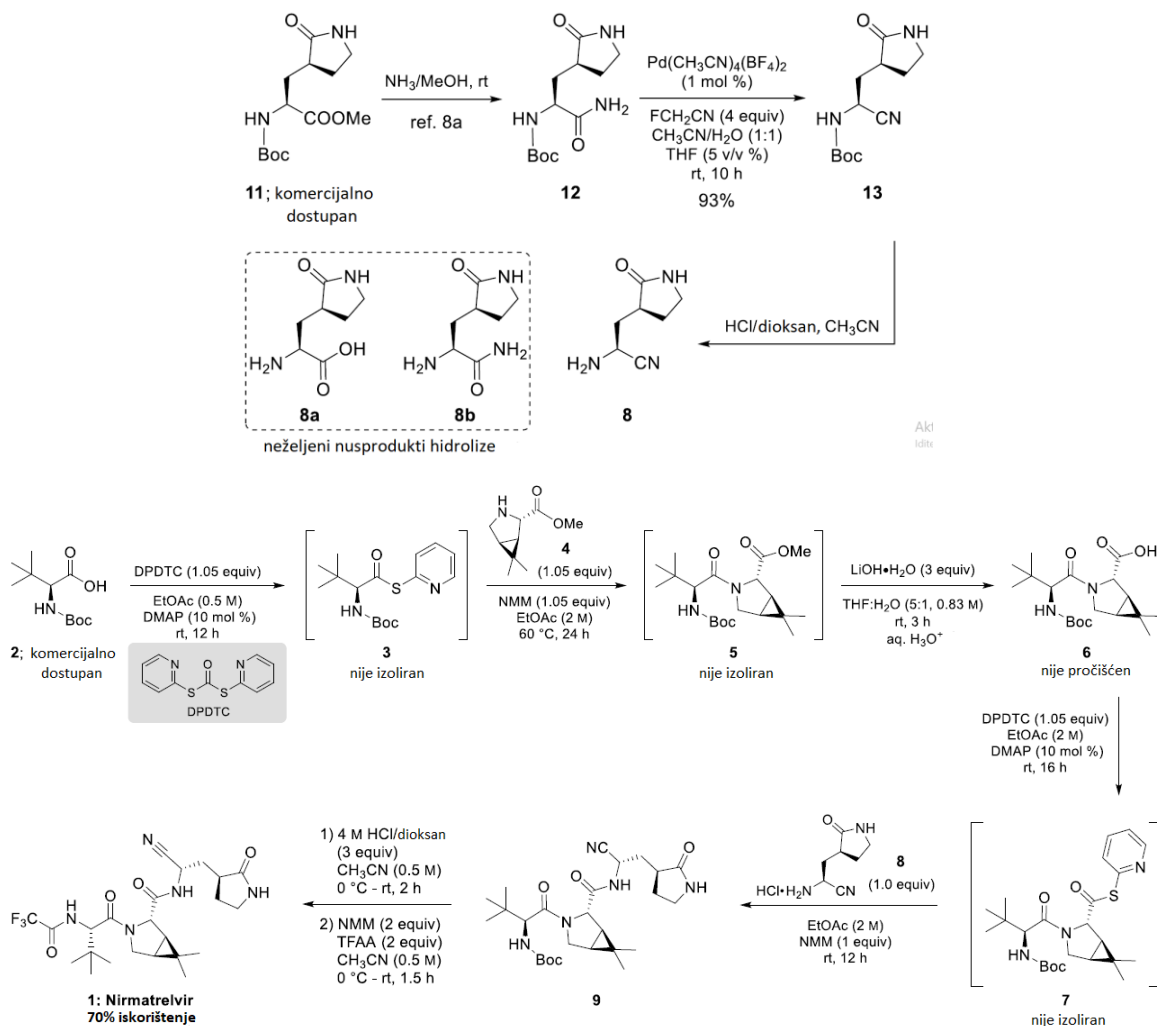
Na slici 13. prikazana je objavljena sinteza nirmatrelvira prema J. R. A. Kincaidu i suradnicima. To je primjer konvergentne sinteze te je prema rezultatima visoko efikasna s iskorištenjem od 70%, povoljna te ekološki prihvatljiva. Stvaranjem peptidne veze u koncentriranom etil-acetatu izbjegnuto je korištenje tradicionalnih reagensa za njenu sintezu, koji su uglavnom skupi, opasni te čijim korištenjem nastaje značajna količina otpada. Tim koji je objavio sintezu koristio je novo razvijenu zelenu tehnologiju za dehidraciju amida, čime se izbjegava korištenje Burgesovog reagensa. Sam sintetski slijed izbjegava uvjete u kojima bi moglo doći do epimerizacije produkta, stoga je i prednost ove sinteze da nema razdvajanja epimera. Konačno, otpad dobiven ovom sintezom, organski i vodeni, značajno je manji naspram drugih relevantnih sinteza nirmatrelvira.<sup>17</sup>

Sinteza prema J. R. A. Kincaidu i suradnicima osmišljena je nadogradnjom Pfizerove metode. Obje su konvergentne sinteze sa sličnim međuproduktima i korištenim vrstama reakcija, no s uglavnom drukčijim reaktantima i reakcijskim uvjetima. Najbitnije razlike u korištenim tvarima su u reakcijama stvaranja amidne veze i dehidraciji amidne skupine u nitrilnu te skidanju zaštitne skupine Boc s amino skupine.<sup>16,17</sup>





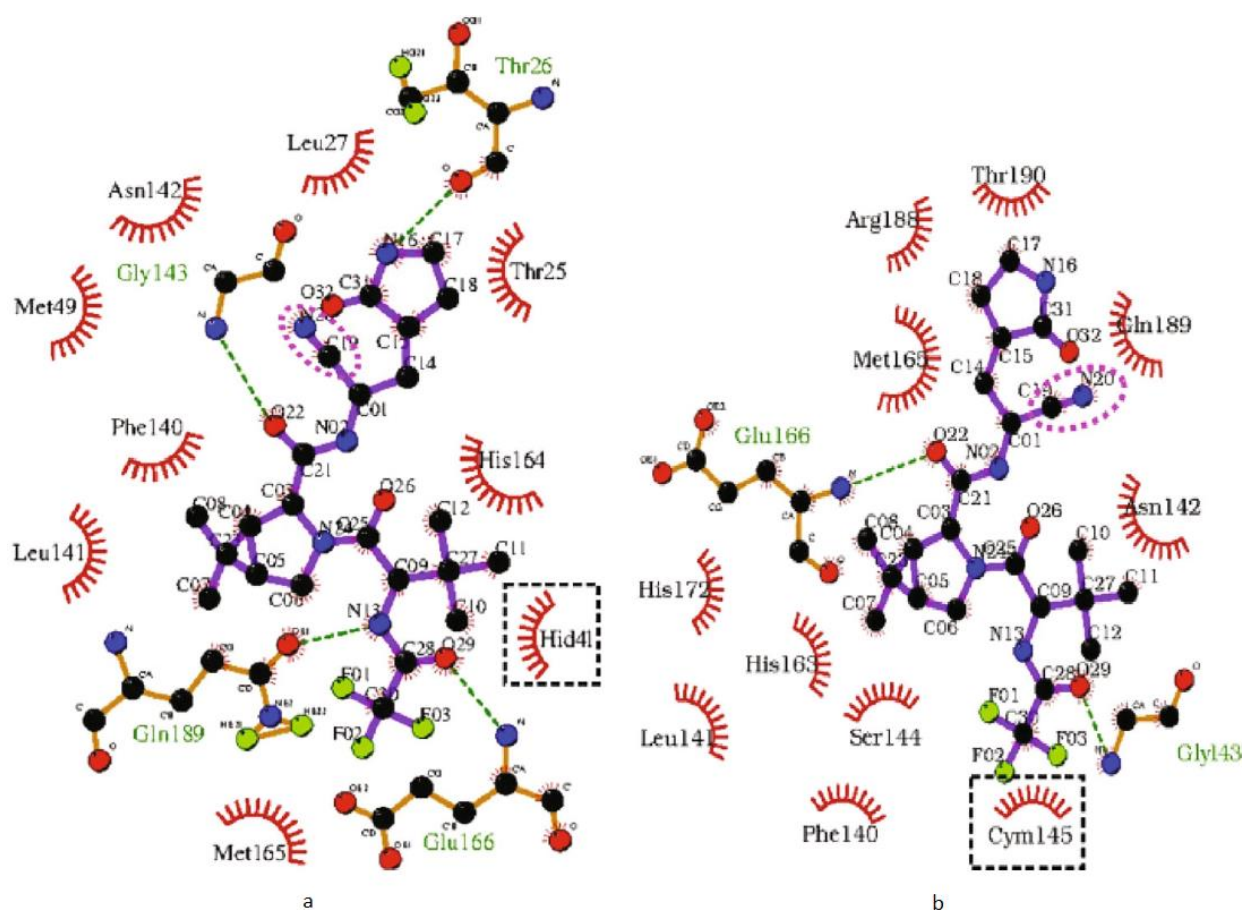
Slika 12. Sinteza nirmatrelvira prema Pfizeru. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 16.



Slika 13. Sinteza nirmatrelvira prema J. R. A Kincaidu i suradnicima. Prilagođeno prema izvoru 17.

## 2.5.3. Mehanizam djelovanja

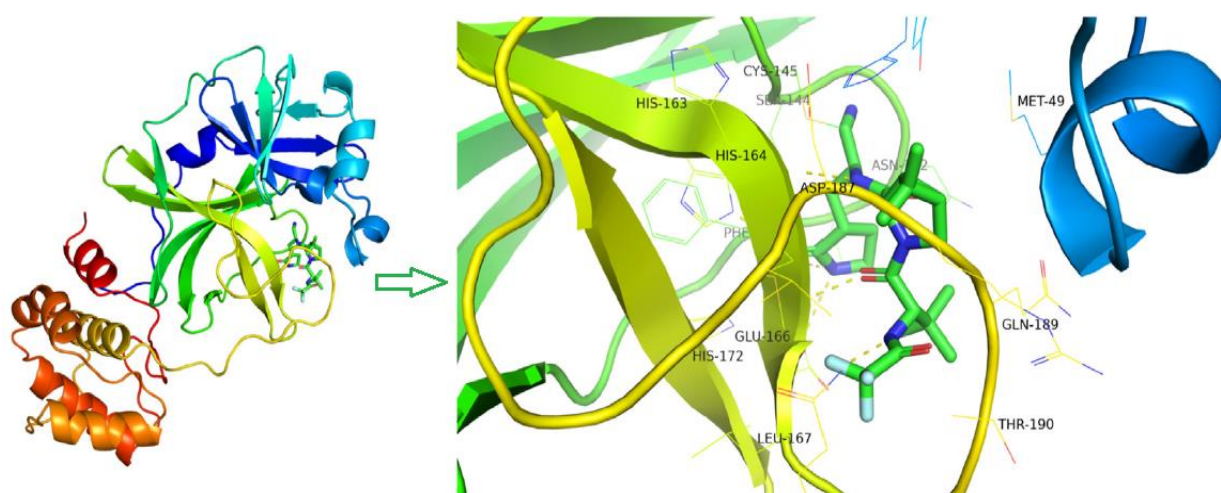
Nirmatrelvir blokira glavnu proteazu SARS-CoV-2 ( $M^{pro}$ ) potrebnu za cijepanju poliproteina, prekursora nestrukturanih proteina. Ponaša se kao kovalentni inhibitor tako da se direktno, selektivno i reverzibilno veže na katalitičku aminokiselinu Cys145  $M^{pro}$ . Pri tome mu inhibicijska konstanta ( $K_i$ ) iznosi 3,1 nM, a polumaksimalna inhibitorna koncentracija ( $IC_{50}$ ) iznosi 19,2 nM. Tom inhibicijom onemogućeno je stvaranje nestrukturanih proteina potrebnih za replikaciju i transkripciju.  $M^{pro}$  visoko je strukturno očuvana među dosadašnjim SARS-CoV-2 varijantama, što omogućuje daljnju primjenu nirmatrelvir/ritonavir kombinacije.<sup>15</sup>



Slika 14. Dvodimenzionalni prikaz najboljeg položaja nirmatrelvira u interakciji s  $M^{pro}$ , dobiven programom LIGPLOT. Nitrilna grupa zaokružena je ružičastom isprekidanom linijom. Vodikove veze prikazane su zelenim isprekidanim linijama. a Dijada u neutralnom stanju. b Dijada u zwitterionskom stanju. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 14.

Molekularnim modeliranjem pretpostavljena je struktura i interakcije vezanja nirmatrelvira za aktivno mjesto M<sup>pro</sup>, točnije molekularnom dinamičkom (MD) simulacijom pri 100 ns te računanje molekularnom mehanikom Poisson-Boltzmannove površine (MMPBSA). Nirmatrelvir je tijekom analize pokazao jake interakcije s M<sup>pro</sup>, poput Cys145–H9 i Cys145–O2. One su ostale očuvane tijekom same simulacije zato što je minimalna udaljenost funkcionalnih skupina u interakciji ostala otprilike ista, što je znak čvrstog vezanja nirmatrelvira za M<sup>pro</sup>. Gly143 trenutno je najpoželjnija aminokiselina za stvaranje vodikovih veza s ligandima, a slijede je Cys145, His163 i Glu166.  $\gamma$ -laktamski prsten nirmatrelvira bitan je za vezanje s glutaminom u odgovarajućoj pukotini u strukturi M<sup>pro</sup>.

Učinkovitost nirmatrelvira ovisi o elektrofilnom napadu nitrilne skupine na katalitički cistein aktivnog mjesta glavne proteaze. MD simulacijom dobiveno je kako se inhibitorski mehanizam odvija u dva koraka. Prvi je nekovalentno sparivanje molnupiravira s M<sup>pro</sup> u neutralnoj stanju. Drugi je stvaranje tiolat-imidazolijuma te pomak liganda kako bi se dovršio elektrofilni napad. Nirmatrelvir tako reagira s katalitičkim cisteinom stvarajući sulfidnu vezu, što neposredno dovodi do supresije replikacije.<sup>14,15</sup>



Slika 15. Trodimenzionalni prikaz kompleksa M<sup>pro</sup> s nirmatrelvirom. Aminokiseline prikazane kao žuti štapići uspostavljaju vodikove veze, označene kao žute isprekidane linije, s nirmatrelvirom. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru 18.

### § 3. ZAKLJUČAK

Kao što je prikazano, postignut je značajan napredak u liječenju COVID-19 tijekom ove dvije i pol godine pandemije. Primjenom opisanih lijekova moguće je postići klinički napredak u pacijentima u životno ugroženom stanju, najbitnije u vidu smanjenja mortaliteta i mogućih komplikacija poslije preboljene bolesti.

Velik problem opisanih lijekova njihova je nedostupnost. Njihove dosadašnje sinteze nisu dovoljno efikasne u vidu iskorištenja i ekološke prihvatljivosti, ali i zbog cijene potrebnih reaktanata, što zajedno uzrokuje njihovu trenutno visoku cijenu. Kao rješenja toga bilo bi osmišljavanje novih i boljih sinteza opisanih lijekova, ili pronalazak nekih novih sa sličnom ili čak boljom kliničkom učinkovitošću, ali i potencijalno jeftinijom proizvodnjom.

Potrebno je još mnogo daljnjih istraživanja o samim proteinima SARS-CoV-2, njegovom djelovanju na ljudski organizam te i o reakciji ljudskog imunološkog sustava na infekciju. Također postoji puno mjesta za napredak u razvoju terapijskih molekula polazeći od već postojećih lijekova, ali i u razvoju potpuno novih molekula usmjerene na još nepotpuno istražene proteine i patogenezu virusa. Daljnja istraživanja omogućila bi pomoć liječnicima pri liječenju COVID-19, ali i pri drugim životno opasnim virusnim infekcijama.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. Yang, H., Rao, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* **19** 685–700. (2021)
2. <https://covid19.who.int> (vrijeme pristupa 17. rujna 2022. u 18:05)
3. Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D. D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y. C., Tian, G., Jiang, H.W., Tao, S. C., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Xu, H. E. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir, *Science* **368**, 1499–1504 (2020)
4. Lee, C., Choi, W. J. Overview of COVID-19 inflammatory pathogenesis from the therapeutic perspective, *Arch. Pharm. Res.* **44**, 99–116 (2021).
5. Vicenti, I., Zazzi, M. & Saladini, F. SARS-CoV-2 RNAdependent RNA polymerase as a therapeutic target for COVID-19, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **31:4**, 325-337 (2021)
6. Wang, M., Zhang, L., Huo, X., Zhang, Z., & Zhang, W. Chemical synthesis of the anti-COVID-19 drug remdesivir, *Current Protocols*, **1**, e303 (2021)
7. Arba, M., Paradis, N., Wahyudi, S. T., Brunt, D. J., Hausman, K. R., Lakernick, P. M., Singh, M., Wu, C. Unraveling the binding mechanism of the active form of Remdesivir to RdRp of SARS-CoV-2 and designing new potential analogues: Insights from molecular dynamics simulations, *Chemical Physics Letters* **799**, 139638 (2022)
8. Zarenezhad, E., Marzi, M. Review on molnupiravir as a promising oral drug for the treatment of COVID-19. *Med Chem Res* **31**, 232–243 (2022)
9. Kabinger, F., Stiller, C., Schmitzová, J., Dienemann, C., Kokic, G., Hillen, H. S., Höbartner, C., Cramer, P. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis, *Nature Structural & Molecular Biology* **28**, 740–746 (2021)
10. Malone, B. and Campbell, E. A. Molnupiravir: coding for catastrophe, *Nature Structural & Molecular Biology* **28**, 706–711 (2021)
11. Celik, I.; Tallei, T. E., A computational comparative analysis of the binding mechanism of molnupiravir's active metabolite to RNA-dependent RNA polymerase of wild-type and

- Delta subvariant AY.4 of SARS-CoV-2, *Journal of Cellular Biochemistry* **123**, 807-818 (2022)
12. Joshi, S., Parkar, J., Ansari, A., Vora, A., Talwar, D., Tiwaskar, M., Patil, S., Barkate, H. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19, *International Journal of Infectious Diseases*, **102**, 501-508 (2021)
  13. Naydenova, K., Muir, K. W., Wu, L. F., Zhang, Z., Coscia, F., Peet, M. J., Castro-Hartmann, P., Qian, P., Sader, K., Dent, K., Kimanius, D., Sutherland, J. D., Löwe, J., Barford, D. and Russo, C. J. Structure of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in the presence of favipiravir-RTP, *PNAS* **118**, e2021946118 (2021)
  14. Marzi, M., Vakil, M. K., Bahmanyar, M., Zarenezhad, E. "Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and In Silico Study", *BioMed Research International* **2022**, 7341493 (2022)
  15. Lamb, Y. N. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: First Approval. *Drugs* **82**, 585–591 (2022)
  16. Shanahan, C. S., Kadam, A. L., Chiranjeevi, B., Nunes, A. A., Jayaraman, A., Ahmad, S., et al. Efforts to Develop a Cost-Effective and Scalable Synthetic Process for Nirmatrelvir. *ChemRxiv*. Cambridge: Cambridge Open Engage (2022), doi: 10.26434/chemrxiv-2022-hmdd4-v2
  17. Kincaid, J. R. A., Caravez, J. C., Iyer, K. S., Kavthe, R. D., Fleck, N., Aue, D. H., et al. A Sustainable Synthesis of the SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor Nirmatrelvir, the Active Ingredient in Paxlovid. *ChemRxiv*. Cambridge: Cambridge Open Engage (2022), doi: 10.26434/chemrxiv-2022-cn0k1
  18. Padhi, A. K., Tripathi, T. Hotspot residues and resistance mutations in the nirmatrelvir-binding site of SARS-CoV-2 main protease: Design, identification, and correlation with globally circulating viral genomes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **629**, 54–60 (2022)