

Mehanizam djelovanja i primjena molnupiravira i paxlovida u liječenju COVID-19

Marić, Lucija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:168000>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lucija Marić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Mehanizam djelovanja i primjena molnupiravira i paxlovida u liječenju COVID-19

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc.dr.sc.Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2022.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

30. kolovoza 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: doc.dr.sc.Aleksandra Maršavelski

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. COVID-19.....	1
1.2. Imunološki sustav čovjeka.....	3
1.2.1. Osnove imunološkog sustava	3
1.2.2. Obrana tijela od bolesti	4
1.2.3. Djelovanje COVID-19 na imunološki sustav	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	7
2.1. Molnupiravir i paxlovid u liječenju COVID-19	7
2.1.1. Oralni lijekovi	7
2.1.2. Molnupiravir	7
2.1.3. Mehanizam djelovanja molnupiravira	8
2.1.4. Paxlovid	11
2.1.5. Mehanizam djelovanja paxlovida	11
2.2. Primjena molnupiravira i paxlovida u liječenju	15
2.3. Zaključak.....	16
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVIII

§ Sažetak

COVID-19 bolest je uzrokovana virusom SARS-CoV-2 koji je prouzročio pandemiju nezapamćenih razmjera. Najčešći simptomi uključuju kašalj, povišenu tjelesnu temperaturu, bolove u mišićima i zglobovima, slabost i gubitak osjeta mirisa i okusa. Kod pojedinih pacijenata dolazi do komplikacija tijekom zaraze pa tako može doći do upale pluća, srčanog udara, ali i smrti. Uglavnom najteži oblici bolesti i smrti događaju se među starijim osobama i onima s drugim kroničnim bolestima. COVID-19 u oko 80% slučajeva zaraze uzrokuje blagu bolest, 14% ima težu bolest, a 6% ima teški oblik bolesti.¹

Upravo zbog navedenih činjenica stvorila se potreba za izumom lijeka koji bi pomogao u borbi s COVID-19 pacijentima koji imaju teže oblike bolesti. U ovom radu razmatrani su oralni lijekovi molnupiravir i paxlovid koji su dio kliničke primijene u liječenju spomenutoga virusa. Oba lijeka imaju zamjetne postotke uspješnosti u liječenju zaraženih pacijenata s time da paxlovid ima zavidniju uspješnost u primjeni.

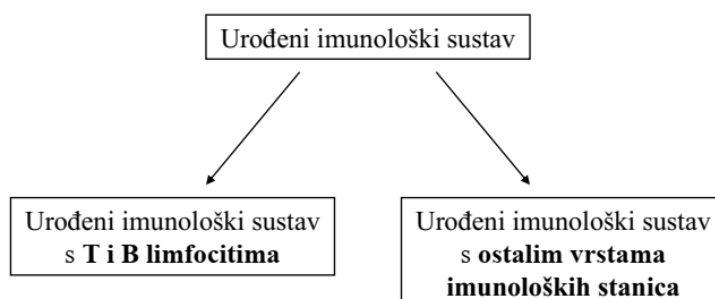
§ 1. UVOD

1.1. COVID-19

Pojava SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) iliti teškog akutnog respiratornog sindroma koronavirusa 2 predstavila je globalan problem u 21. stoljeću. Spomenuti virus uzrokuje bolest COVID-19 (engl. *Coronavirus disease 2019*) koja ima spektar različitih simptoma, dok se ponajviše radi o blagim simptomima s 10-20 % pacijenata sa simptomima koji osjete teži oblik bolesti. Bolest COVID-19 klasificira se kao heterogena bolest (zdravstveno stanje s nekoliko temeljnih uzroka) s time da ima jako malo dokaza koji upućuju da je virus zaslužan za tu heterogenost. Stoga, znanost se okreće pitanju uloge općeg zdravstvenog stanja zaražene osobe i okoline kao glavnih faktora u razvoju i težini bolesti.²

COVID-19 ima nekoliko kategorija bolesti definiranih prema težini simptoma: blaga bolest, umjerena bolest (uglavnom praćena upalom pluća), teška bolest (praćena teškom upalom pluća) te kritična bolest (praćena sindromom akutnog respiracijskog distresa [ARDS] i/ili sepsom i/ili septičkim šokom). Mnoštvo drugih komplikacija i oboljenja je uočeno pogotovo kod teškog i kritičnog oblika bolesti poput akutne plućne embolije (nakupljanje zgusnute krvi u plućnoj arteriji s posljedičnom opstrukcijom dotoka krvi), akutnog koronarnog sindroma (tjelesna stanja koja dovode do naglog smanjenja protoka krvi do srca), srčanog udara i dr.²

Urođeni imunološki sustav ima posebnu ulogu u obrani protiv SARS-CoV-2. Jedan način obrane je s T- i B-stanicama (slika 1).

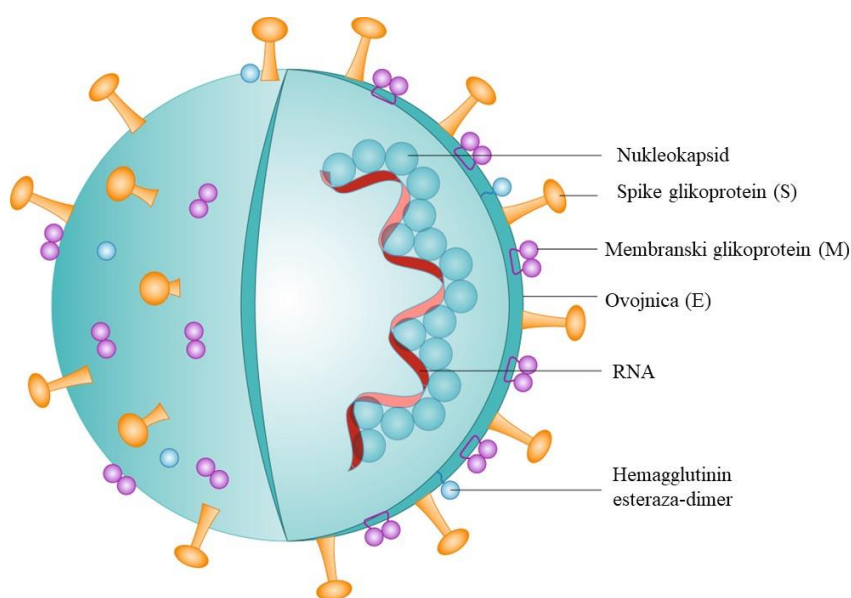


Slika 1. Podjela urođenog imunološkog sustava u dvije grane; pod ostale imunološke stanice spadaju granulociti, mononociti, makrofagi, NK stanice i dr.

T- i B-stanice linija su obrane koja koristi prošle interakcije kako bi naučila prepoznati određene strane prijetnje i napasti ih kada se ponovno pojave; to je ujedno i temeljna pretpostavka djelovanja cjepiva. Koristi se mala, bezopasna količina proteina iz uzročnika bolesti kako bi imunološki sustav mogao prepoznati taj protein ako patogen napadne tijelo. Težina bolesti i postotak smrtnosti značajniji su u starijoj populaciji zbog manjka raširenosti dugoročnog i već postojećeg urođenog imuniteta izgrađenog pomoću T- i B-stanica protiv SARS-CoV-2.²

Način širenja virusa je s osobe na osobu i uglavnom se prenosi kapljичnim putem pri kihanju i kašljanju, kao i indirektno putem kontaminiranih ruku izlučevinama oboljele osobe s obzirom da virus može preživjeti nekoliko sati na površinama. Virus se prenosi kada oboljeli ima simptome poput drhtavice i vrućice te je osoba najzaraznija kad ima izražene simptome bolesti.³

Građa virusa SARS-CoV-2 vrlo je specifična (slika 2). Pozitivna jednolančana RNA (+ssRNA) čini genom, a veličina se kreće od 26 do 32kb što ga čini najvećim poznatim RNA genomom. Kada je molekula RNA pozitivna znači da se može izravno iščitati mRNA. Virusna RNA također kodira za četiri proteina: spike (S) i membranski (M) glikoprotein te ovojnički (E) i nukleokapsidni (N) protein.⁴



Slika 2. Građa virusa SARS-CoV-2. RNA je obavijena ovojnicom s četiri glavna strukturna proteina: spike (S) i membranski (M) glikoproteini te ovojnički (E) i nukleokapsidski (N) proteini.⁴

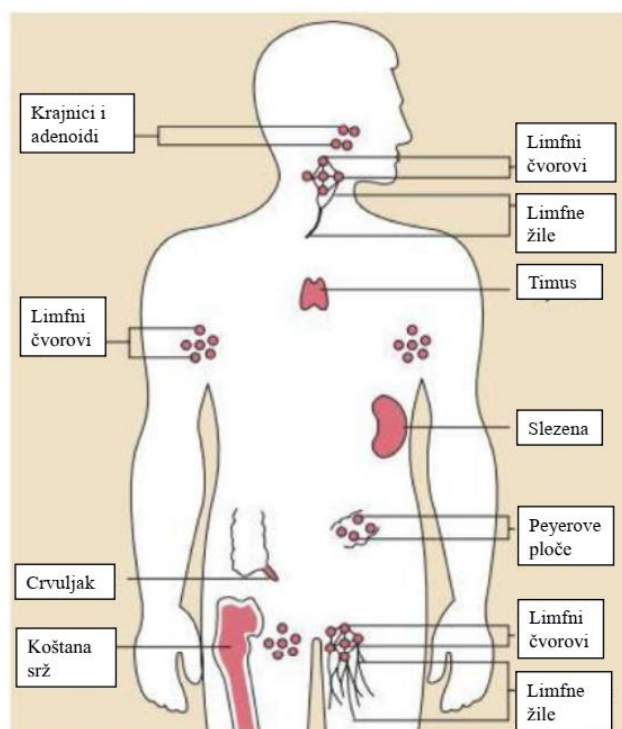
1.2. Imunološki sustav čovjeka

1.2.1. Osnove imunološkog sustava

Ključna uloga imunološkog sustava čovjeka jest zadržavanje zdravlja i patogeneze (mekanizam razvoja patološkoga procesa od djelovanja etiološkoga čimbenika do pojave simptoma). Tijelo je sačinjeno od mnoštva organa koji sudjeluju u obrani od bolesti prikazanih na slici 3.

Najbitniji dio imunološkog sustava čovjeka čine bijele krvne stanice (leukociti) koje putuju krvnim žilama u tijelu. Dok putuju kroz krvotok i tkiva, lociraju mjesto infekcije i potom obavijeste druge bijele krvne stanice o njihovom položaju kako bi pomogli u obrani tijela od napada nepoznatog organizma. Limfociti uništavaju neželjene mikroorganizme te brane organizam od toksina i drugih tvari stranih organizmu, kao štetnih kemijskih spojeva te stranih antigena. Svaki limfni čvor mjesto je događanja specifične imunološke reakcije i ima ulogu borbe s antigenima, a dotok imunoloških i stranih stanica omogućen je limfnim žilama.⁵

Važnu ulogu ima timus (prsna žlijezda) u kojem sazrijevaju limfociti poznati kao T-stanice. Dok su u timusu, limfociti ne reagiraju na patogene već nakon što sazriju ulaze u krv i odlaze u druga limfna tkiva gdje sudjeluju u obrani od bolesti. Timozin je hormon kojeg proizvodi timus, a koji potiče sazrijevanje limfocita u drugim limfnim tkivima.⁶



Slika 3. Organi imunološkog sustava čovjeka ključni za održavanje zdravlja i patogeneze.⁵

1.2.2. Obrana tijela od bolesti

Imunološki sustav je sustav organizma zadužen za obranu od napada raznih stranih mikroorganizama i kao takav pruža otpornost organizma na tri različita načina. Stoga, razlikuju se tri tipa imuniteta koje čovjek može razviti tijekom života: urođeni imunitet koji pruža brzi odgovor na infekciju, prilagodljivi imunitet koji pruža spori odgovor na infekciju te pasivni imunitet. Pasivni se imunitet dijeli na prirodni koji je nasljedan te umjetni koji se može steći primjerice cijepljenjem. U slučaju COVID-19, ukoliko osoba nije cijepljena, tijelo se suočava s virusom po prvi puta, imunološki sustav nema spreman odgovor i dolazi do bolesti.⁵

1.2.3. Djelovanje COVID-19 na imunološki sustav

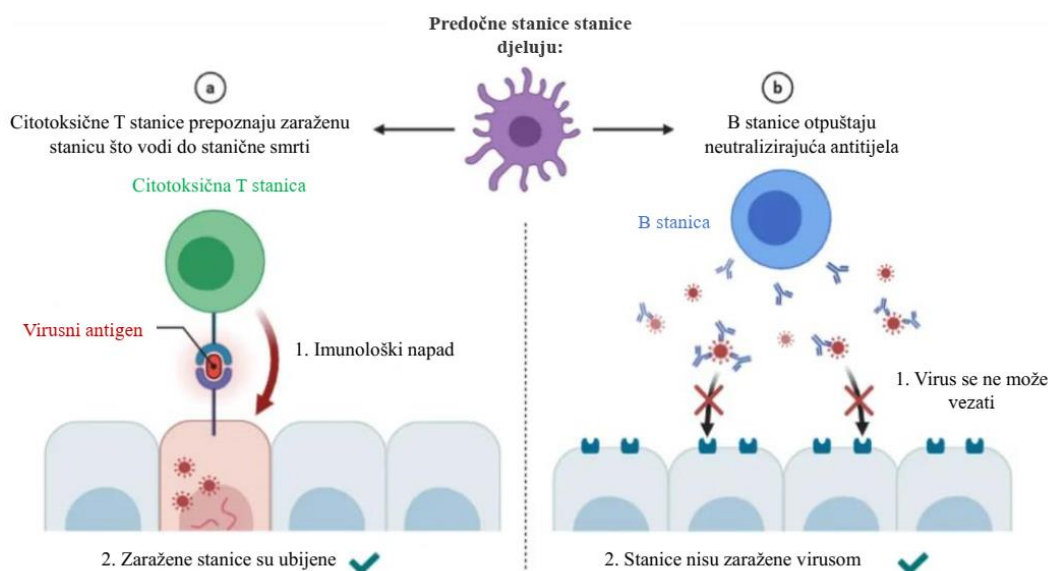
Kako bi se obranio od virusa SARS-CoV-2, organizam se brani urođenim i prilagodljivim imunitetom. Urođeni imunitet je nespecifičan te djeluje u roku od nekoliko minuta kako bi uklonio strani mikroorganizam. Prilagodljivi imunitet traje danima/tjednima, ali je specifičan i dugotrajan te je osnova za cjepiva.

Urođeni imunitet započinje detekcijom stranog mikroorganizma, u ovom slučaju SARS-CoV-2 virusa ukoliko je osoba već bila izložena virusu. Na ovojnici virusa SARS-CoV-2 nalaze se spike glikoproteini (S) koji imaju specifičan oblik. U našem tijelu se nalaze inače takvi glikoproteini, ali ne identičnog oblika zbog čega ovaj virus predstavlja posebnu prijetnju jer se ljudski organizmi nisu dosad susreli s takvim oblikom virusa te iz tog razloga nisu prilagođeni na pravovremenu obranu.⁴

Ključnu ulogu u prilagodljivom imunitetu imaju B- i T-stanice. Kada virus uđe u naš organizam, primjerice kapljičnim putem, spike glikoproteini na površini ovojnice zaslužni su za prolazak virusa u stanice jer tvore interakcije sa staničnom membranom. Primjerice, spike proteini koji se nalaze na SARS-CoV-2 virusu vežu se na ACE2 (engl. Angiotensin-converting enzyme 2) receptore koji se nalaze na nekim vrstama stanica (poput onih u srcu, plućima, bubrezima itd.). ACE2 je zapravo enzim koji stvara male proteine rezanjem većeg proteina angiotensinogena, a koji zatim reguliraju funkcije u stanicama.⁹ Znači, jednom kad se ostvari interakcija po 4.0tivate ključ I brava između spike proteina i ACE2 na staničnoj stijenci, omogućava se protok samog virusa u stanicu. Jednom kada virus dospije u stanicu otpušta +ssRNA koju potom enzim RNA ovisna RNA polimeraza replicira odnosno koristi ga kao lanac kalup i sintetizira novi lanac -ssRNA. Na taj se način virus može replicirati i množiti u stanicama te širiti tijelom. Nakon infekcije virusom, imunološki sustav kreira odgovor i stvara antitijela.^{4,5,8}

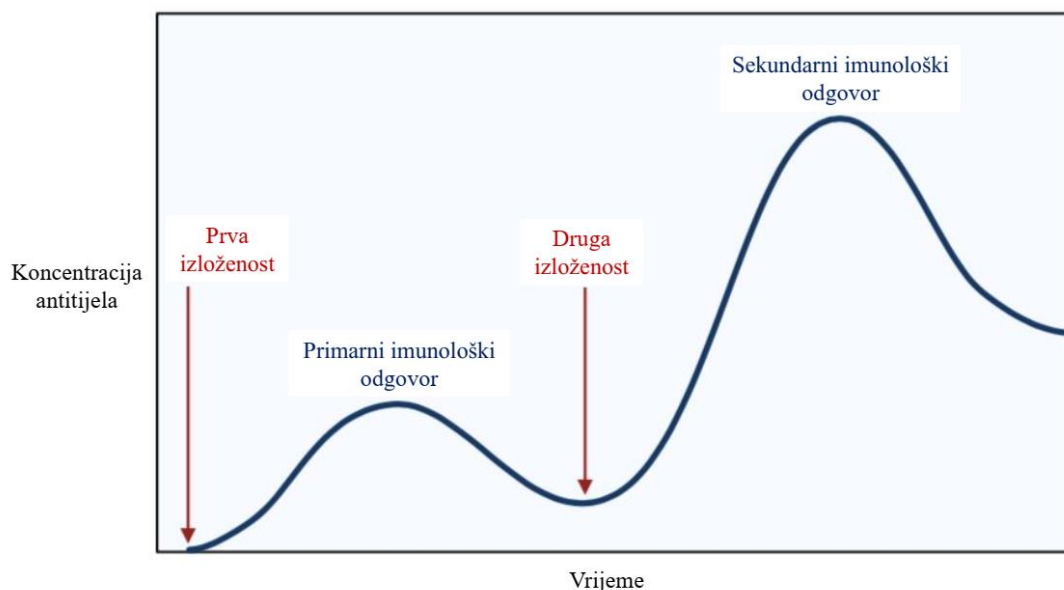
Kako se virus replicira i širi u stanicama epitela u organizmu, ta informacija dolazi do dendritičnih stanica. Dendritične stanice tip su bijelih krvnih stanica koje prepoznaju različite patogene odnosno strane mikroorganizme.^{7,8}

Jednom kada detektiraju patogene izlučuju citokine te migriraju u limfne čvorove gdje se nalaze tzv. *naivne* T- i B-stanice koje interagiraju s njima. Ukoliko se receptori na T- i B-stanicama podudaraju s antigenom na dendritičnim stanicama, one se aktiviraju te postaju tzv. *efektorski* limfociti. Sažeto, naivni limfociti postaju efektorske stanice, napuštaju limfni čvor te migriraju na mjesto infekcije kako bi posredovale ubijanje zaraženih stanica i spriječile širenje virusa izlučivanjem specifičnih antitijela.^{7,8} Slika 4. prikazuje ulogu T- i B-stanica u obrani organizma.



Slika 4. Nakon što dođu do tkiva u kojem je došlo do infekcije, T-stanice otkrivaju specifične fragmente virusa na površini zaraženih stanica i uništavaju ih. Antitijela koja luče B-stanice vežu se na površinu virusa i blokiraju ulazak u stanicu (neutralizirajuća antitijela).⁸

T- i B-stanice imaju jako bitnu ulogu i nakon obrane organizma jer postaju memorijske stanice i pružaju imunološku obranu organizmu godinama. Kao što je prikazano na slici 5., T- i B-stanice pružaju čak bolju zaštitu nakon druge izloženosti u usporedbi s time kad su se prvi put susrele s tim virusom. Koliko će dugo antitijela trajati ovisi o vrsti patogena, a za SARS-CoV-2 traju od jedne do dvije godine. Prilikom druge izloženosti virusu iz tog razloga simptomi će biti puno manji ili ih neće biti jer će T-stanice odmah potaknuti izlučivanje antitijela iz plazma stanica.⁸



Slika 5. T- i B-stanice postaju memorijske stanice te kad drugi put dođu u doticaj s istim virusom, memorijske B-stanice proizvesti će mnogo brže i više antitijela. Memorijske T stanice pružaju brzu i robusnu zaštitu.⁸

Za razliku od prilagodljivog imuniteta, urođeni imunitet počinje s reakcijom kada receptori na stanicama dođu u interakciju sa stijenkom virusa (najčešće se radi o specifičnim proteinima), prepoznaju ga kao opasnost i pokreću trenutno izlučivanje citokina i interferona.⁷ Citokini su glikoproteini koji djeluju lokalno i posrednici su u međudjelovanju stanica. Jedan od glavnih učinka im je upravo diferencijacija limfocita T i B što je dio prilagodljivog imuniteta, drugog koraka obrane organizma. Interferoni su skupina peptida s antivirusnim i imunoregulacijskim djelovanjem. Nakon što se izluče, citokini i interferoni vežu se na receptore lokalnih stanica kako bi im signalizirali potrebnu obranu. Također, mogu inducirati i smrt zaraženih stanica kako bi se spriječilo daljnje širenje te okupiti bijele krvne stanice i usmjeriti ih na borbu protiv stranih mikroorganizama. No, virusi zaustavljaju izlučivanje i funkcioniranje citokina i interferona te tu nastaje problem u obrani organizma. U tom slučaju organizam započinje drugi korak obrane, a to je prilagodljiv imunitet.⁸

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

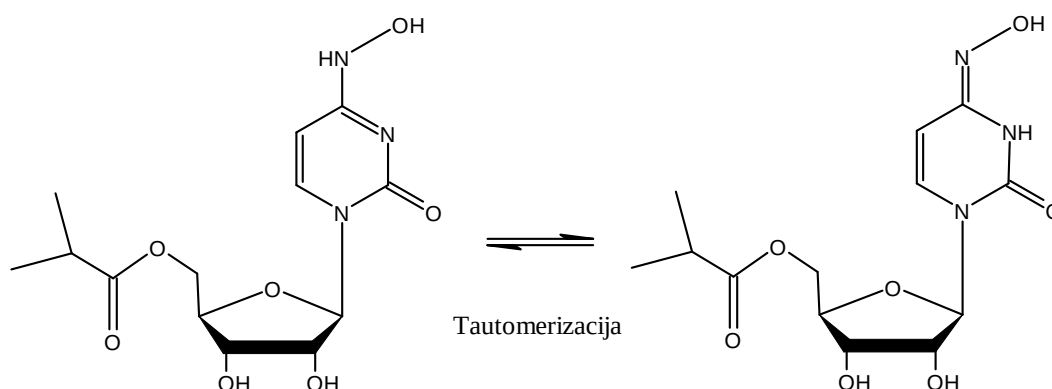
2.1. Molnupiravir i paxlovid u liječenju COVID-19

2.1.1. Oralni lijekovi

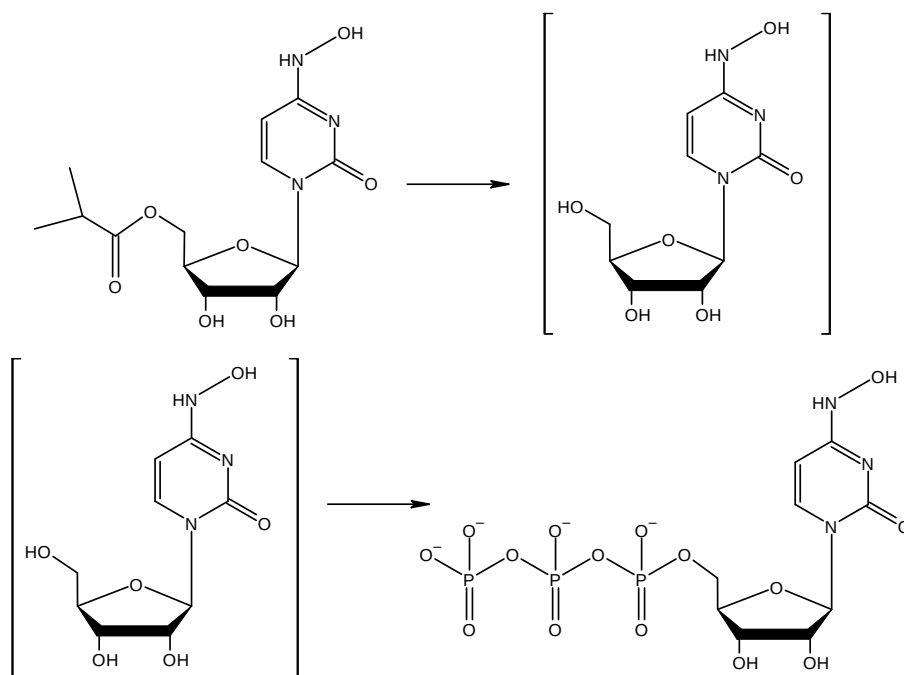
Oralni lijekovi su vrsta lijekova koji se uzimaju oralno (kroz usta). Postoje u čvrstom obliku poput tableta, kapsula, tableta za žvakanje i pastila, ili u tekućem obliku poput kapi, sirupa ili otopina. U većini slučajeva, sastojci oralnih lijekova ne ulaze u krvotok sve dok ne dospiju u želudac ili crijeva. Stoga, pri uzimanju lijekova iznimno je bitno konzultirati se s doktorom i uzimati lijekove na ispravan način.¹⁰ Neki lijekovi mogu iritirati želudac stoga je bitno uzimanje lijeka s hranom jer će smanjiti taj učinak.

2.1.2. Molnupiravir

Molnupiravir je antivirusni lijek na tržištu poznat kao *Lagevrio* (slika 6). Zapravo, to je predlijevak N4-hidroksicitidina što znači da se primjenjuje u nedjelotvornome obliku, a metaboličkim procesima u tijelu pretvara se u kemijski spoj koji ostvaruje terapijski učinak. Taj se proces događa u dva koraka. Prvo se hidrolizira esterska skupina molnupiravira i ostaje primarna alkoholna skupina. Potom se međuprodukt unutarstanično fosforilira i nastaje aktivni oblik NHC-TP iliti NHC trifosfat što je prikazano na slici 7. Na tržištu se molnupiravir prodaje u obliku krutih kapsula koje se unose oralno i apsorbiraju se u crijevima.^{11–13}



Slika 6.¹¹ Molnupiravir u obliku N-hidroksilamina (lijevo) i oksima (desno). Postoji u oba oblika zbog tautomerizacije (ravnotežni proces pretvorbe jednog oblika molekule u drugi).



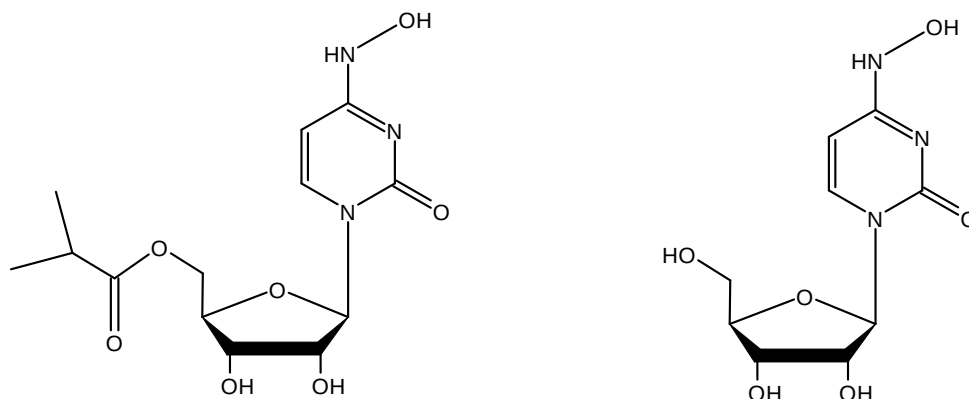
Slika 7. Pretvorba molnupiravira u N4-hidroksicitidin trifosfat (NHC trifosfat).

Bitno je naglasiti da antivirusne lijekove za akutne respiratorne infekcije je potrebno uzimati u samim počecima infekcije, znači što ranije. Uglavnom se rade o periodu tri dana nakon infekcije, ali u nekim slučajevima lijek može biti uspješan i ako se uzme pet dana od pojave simptoma.^{11,12}

2.1.3. Mehanizam djelovanja molnupiravira

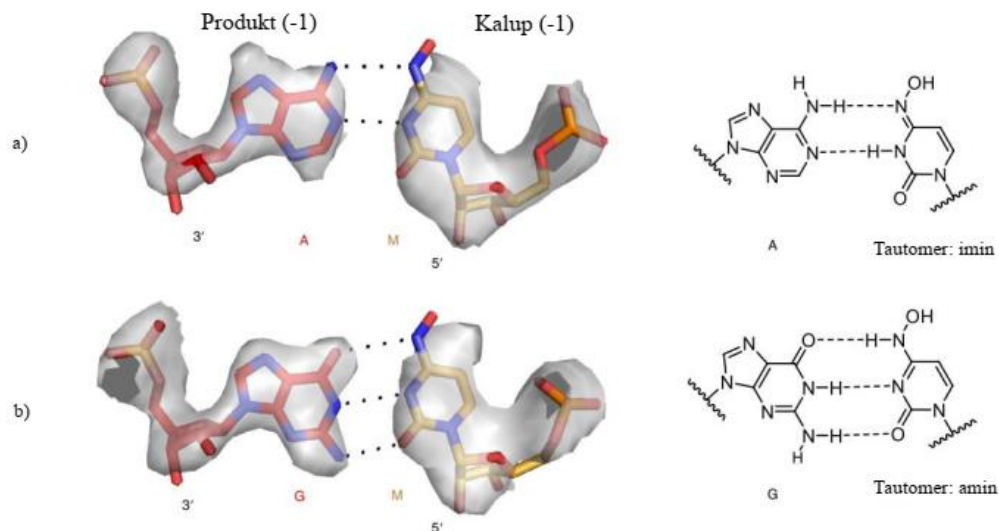
Molnupiravir djeluje tako što inhibira replikaciju SARS-CoV-2 i čini ga nezaraznim. Koristi se kako bi se smanjili simptomi i moguće posljedice zaraze s COVID-19 u pacijenata koji su već zaraženi.

Aktivnost molnupiravira započinje njegovim raspadom na NHC u organizmu (slika 8). NHC potom cilja enzim RNA ovisnu RNA polimerazu (RdRP) koju SARS-CoV-2 koristi kako bi se replicirao. Cijeli se mehanizam djelovanja temelji na strukturnoj sličnosti NHC i nukleotida (A, U, C, G) koji tvore rastući RNA lanac. NHC unutarstanično se fosforilira u NHC trifosfat.¹⁴ RdRP potom koristi NHC trifosfat kao supstrat kako bi stvorila novi RNA lanac čime čini greške u genetičkom kodu SARS-CoV-2 i čini virus disfunkcionalnim.¹³ Biokemijski testovi pokazali su da RdRP koristi NHC trifosfat kao supstrat umjesto citidin trifosfata ili uridin trifosfata te pritom tvori stabilne parove baza s G ili A u RdRP aktivnom centru time objašnjavajući kako polimeraza izbjegava ispravak i sintetizira mutiranu RNA.¹⁵



Slika 8. Usporedba strukture molnupiravira (lijevo) i NHC (desno). Molnupiravir je predlijeak N4-hidroksicitidina tj. primjenjuje se u nedjelotvornome obliku, a metaboličkim procesima u tijelu pretvara se u NHC koji ostvaruje terapijski učinak.

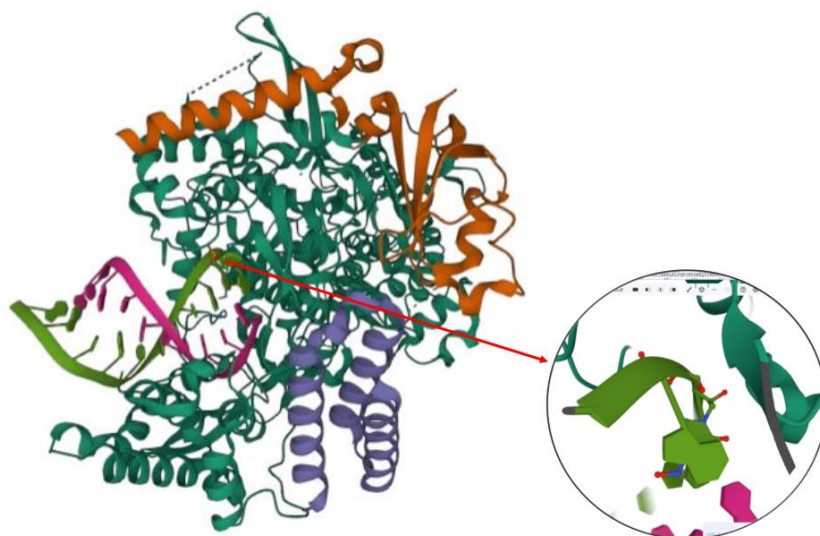
Promatrajući detaljnije strukturu aktivnog mjesta u RdRP-u, uočena je jedna iznimka. Gvanin tvori vodikove veze samo s NHC trifosfatom koji potječe od tautomera molnupiravira koji je u formi amina, dok adenin tvori vodikove veze s NHC trifosfatom koji potječe od tautomera molnupiravira koji je u formi imina. Navedena činjenica utvrđena je analizom rezultata dobivenih krio-elektronskom mikroskopijom i prikazana je za ostvarene parove baza s NHC trifosfatom na slici 9.¹⁵ Naime, ostvarivanje upravo ovih parova baza ključno je u djelovanju molnupiravira jer zbog znatne stabilnosti parova baza izbjegnuto je uočavanje greške prilikom egzonukleazne aktivnosti *proofreading*-a u aktivnom centru RdRP-a. Štoviše, na slici 9. prikazan je i ostvaren broj vodikovih veza. Pod a) se uočava ostvarivanje dvaju vodikovih veza između adenina i NHC trifosfata u što je u skladu s očekivanjem jer adenin inače tvori dvije vodikove veze s timinom čiji je analog u ovom slučaju NHC trifosfat. Pod b) se uočava ostvarivanje triju vodikovih veza između gvanina i NHC trifosfata što je također u skladu s očekivanjem jer gvanin ostvaruje inače tri vodikove veze s citozinom čiji je analog u ovom slučaju NHC trifosfat.¹⁵



Slika 9. Ostvarivanje stabilnih parova baza adenina pod a) i gvanina pod b) s tautomerima molnupiravira od kojih je jedan imin pod a), a drugi amin pod b).¹⁵

Glavni problem u mehanizmu poput ovog koji se temelji na sličnosti nukleotida jest da zdrave stanice također mogu integrirati NHC u RNA što može dovesti do mutacija i u konačnici smrti stanica.^{11,13}

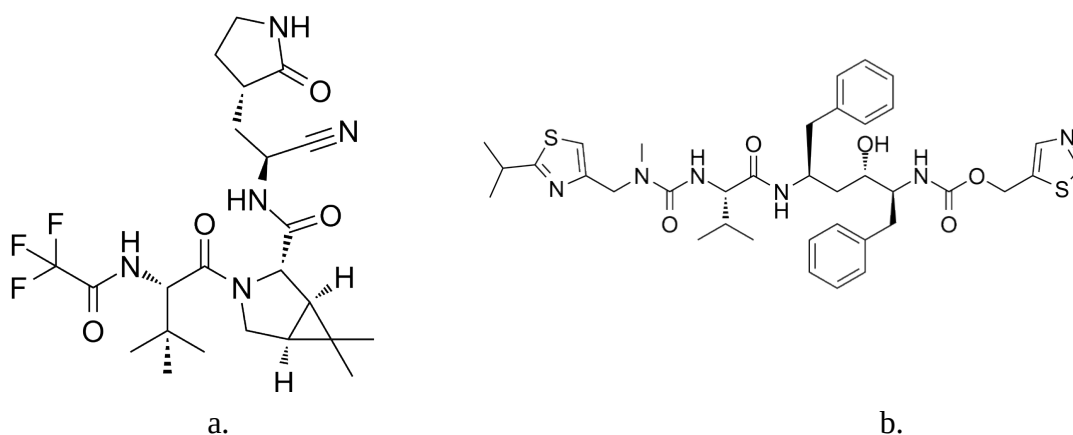
Na slici 10. Može se uočiti istaknuta molekula NHC trifosfata te njezino vezanje u aktivnom mjestu RdRP-a zajedno s ružičastim lancem koji predstavlja kalup RNA, a svijetlo zeleni lanac predstavlja novosintetiziranu RNA. Struktura RdRp-RNA kompleksa prikazana na slici 10. dokazuje da NHC može formirati stabilne bazne parove s G ili A u aktivnom centru RdRp-a, objašnjavajući da na taj način polimeraza izbjegava *proofreading* i sintetizira mutiranu RNA.



Slika 10. Virusni protein SARS-CoV-2 RdRP s NHC trifosfatom (istaknut crvenom linijom).¹⁵

2.1.4. Paxlovid

Paxlovid je antivirusni lijek koji sprječava rast i širenje virusa SARS-CoV-2. Koristi se za liječenje rane infekcije COVID-19 i pomaže u sprječavanju težih simptoma. Paxlovid je kombinacija 2 lijeka nirmatrelvir i ritonavir (slika 11). Nirmatrelvir zaustavlja rast i širenje virusa reverzibilnom inhibicijom proteaze SARS CoV-2 3CL^{pro} (engl. *SARS-CoV 3-chymotrypsin-like proteases*) koja ima važnu ulogu u replikaciji virusa¹⁶, a ritonavir inhibira metabolizam nirmatrelvira u jetri tako da se koncentracija nirmatrelvira zadržava visokom kako bi na taj način dulje obavljao svoju ulogu u borbi protiv virusa.¹⁷



Slika 11. a. Nirmatrelvir¹⁸ i b. Ritonavir¹⁹ su u skupini lijekova koji inhibiraju proteaze. Nirmatrelvir inhibira SARS CoV-2 3CL^{pro} dok je ritonavir jaki inhibitor citokroma P450-3A4 te se također koristi za jačanje djelovanja inhibitora HIV proteaza.

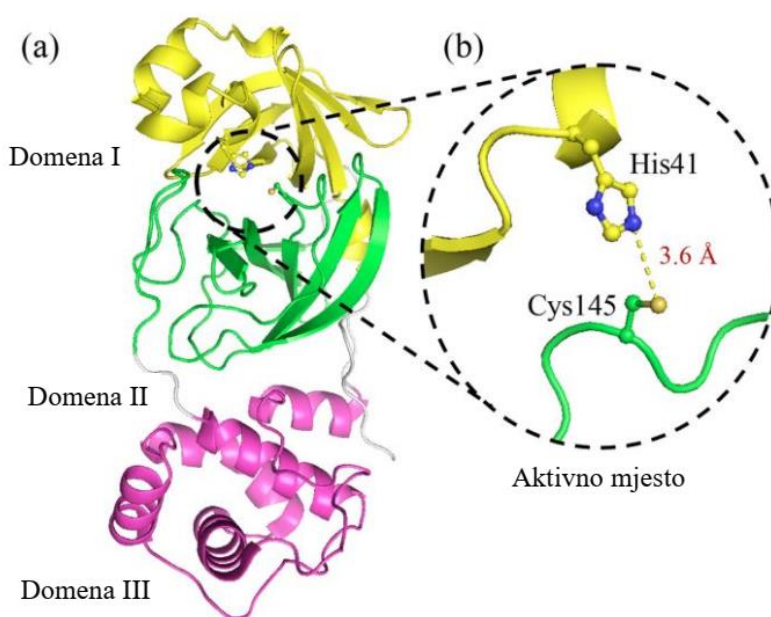
Tijekom liječenja, pacijenti uzimaju tri tablete dva puta dnevno (ujutro i navečer) u periodu od pet dana. Jutarnja i večernja doza su jednake, jedna tableta ritonavira od 100mg te dvije tablete nirmatrelvira od 150mg.²⁰ Paxlovid se preporuča osobama koje spadaju u rizičnu skupinu te koje imaju srednje do srednje teške simptome COVID-19. Kao i kod molnupiravira, liječenje je najbolje započeti u periodu od pet dana od pojave simptoma.²¹

2.1.5. Mehanizam djelovanja paxlovida

Paxlovid je antivirusna terapija koja sprječava širenje virusa u organizmu inhibicijom ključnih enzima. +ssRNA čini glavninu virusa SARS-CoV-2 te služi i kao genomska i kao mRNA. U stanicama se translacija i za to koristi materijale stanice domaćina poput ribosoma, tRNA i niza translacijskih faktora. Za virus je nužna translacija mRNA kako bi proizveo proteine potrebne

za njegovo funkcioniranje. Također, virus se u stanicama replicira i na taj način širi u organizmu.²¹ Translacijom genoma virusa SARS-CoV-2 nastaju dva velika poliproteina pp1a i pp1ab koje SARS CoV-2 3CL^{pro} cijepa na manje proteine te četiri strukturna proteina (spike (S) i membranski (M) glikoproteini te ovojnički (E) i nukleokapsidski (N)). Jedna proteaza je SARS CoV-2 3CL^{pro} koju upravo nirmatrelvir inhibira, a smatra se najvažnijom proteazom za taj virus zbog čega se često koristi i izraz SARS-CoV-2 M^{pro}.²¹ Spomenuta proteaza cijepa poliproteine na jedanaest različitih mjesta u svrhu nastanka manjih nestrukturnih proteina potrebnih za daljnje širenje virusa. Ti nestrukturni proteini imaju temeljnu ulogu u replikaciji i transkripciji gdje će inhibiranje proteaza blokirati oslobađanje tih nestrukturnih proteina i time zaustaviti infektivnost SARS-CoV-2.²²

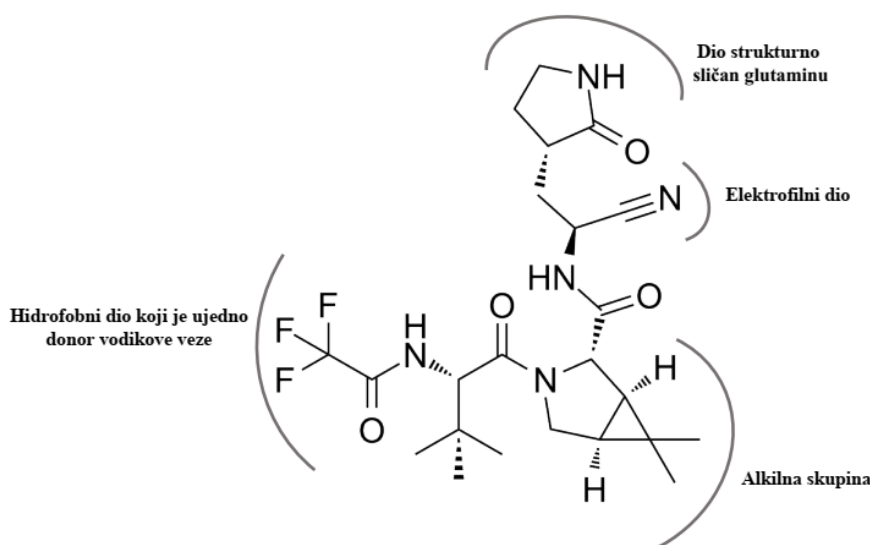
SARS CoV-2 3CL^{pro} je cisteinska proteaza s tri domene, a sadrži i katalitičku dijadu Cys145-His41 između domena I and II (slika 12). Cys i His povezani su vodikovom vezom na udaljenosti 3.6 Å.²²



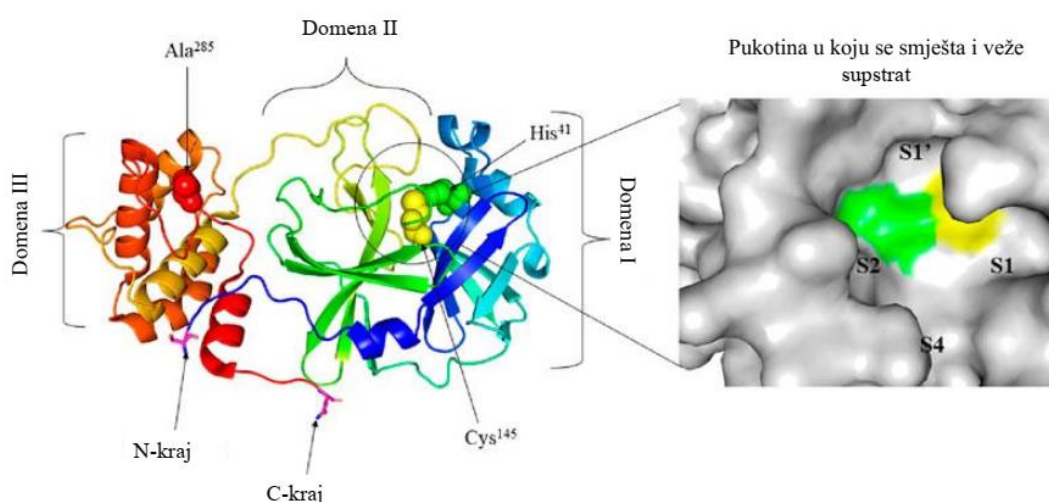
Slika 12. Kristalna struktura SARS CoV-2 3CL^{pro} s prikazanim a) domenama i b) aktivnim mjestom enzima. Aktivno mjesto nalazi se na dodiru domena I i II. U aktivnom se mjestu nalazi katalitička dijada.²²

Promatrajući strukturu nirmatrelvira na slici 13. može se objasniti njegova interakcija s aktivnim mjestom SARS CoV-2 3CL^{pro}. Hidrofobni dio molekule omogućuje olakšanu

permeabilnost stanice i sudjeluje u hidrofobnim interakcijama. Dio u kojemu se nalazi alkilna skupina omogućuje vezanje u S2 podjedinicu također hidrofobnim interakcijama dok dio koji je strukturno sličan glutaminu (laktam, ciklički amid) omogućuje vezanje u S1 podjedinicu vodikovim vezama (slika 14). Elektrofili dio reagira s cisteinskim ostatkom i time deaktivira enzim jer nastaje S-C kovalentna veza između C atoma nitrilne skupine i S atoma cisteinskog aminokiselinskog ostatka aktivnog mjesta.^{23–25} Također, prisutno je mnoštvo ostalih vodikovih veza i hidrofobnih interakcija što dodatno jača vezanje nirmatrelvira u aktivno mjesto SARS CoV-2 3CL^{pro}.^{26,27,26}



Slika 13. Struktura nirmatrelavira uz naznačene dijelove koji doprinose vezanju u aktivno mjesto SARS CoV-2 3CL^{pro}.



Slika 14. Kristalna struktura SARS CoV-2 3CL^{pro} uz prikaz aktivnog mjesta s naznačenim podjedinicama koja vežu aminokiselinske nastavke polipeptida.^{26,27,29}

Mehanizam sprječavanja širenja virusa uključuje i ritonavir koji inhibira citokrom P450-3A4 (CYP3A4 engl. *Cytochrome P450 3A4*), enzim koji metabolizira nekoliko tipova lijekova i uglavnom se nalazi u jetri i crijevima. (slika 15).

Mehanizam ritonavira se temelji na inhibiranju CYP3A4 čime se metabolizam nirmatrelvira u jetri usporava, zbog čega je koncentracija nirmatrelvira visoka jer se ne metabolizira. Ritonavir se ireverzibilno veže u aktivno mjesto CYP3A4 na ion željeza preko atoma dušika iz tiazolnog prstena³⁰ (slika 11.b.) i tako zauzima aktivno mjesto i onemogućava vezanja drugih supstrata poput nirmatrelvira koji bi se potom mogli metabolizirati. Na taj je način učinak nirmatrelvira duži u borbi protiv virusa i eliminira se sporije. CYP3A4 glavni je ljudski enzim koji metabolizira lijekove.^{21,27}



Slika 15. Kristalna struktura ljudskog citokroma P4503A4, najvažnijeg ljudskog enzima za metaboliziranje lijekova s inhibitorom ritonavirom u aktivnom mjestu.³¹ U središtu enzima nalazi se aktivno mjesto u kojemu je vezan ritonavir.

2.2. Primjena molnupiravira i paxlovida u liječenju

Molnupiravir i paxlovid aktivno se koriste u liječenju COVID-19 prije svega kod ljudi koji spadaju u rizičnu skupinu i koji imaju srednje do srednje teške simptome.^{13,21}

Prednost oralnih lijekova za liječenje COVID-19 poput molnupiravira i paxlovida jest što su dostupni u formi tableta te se mogu uzimati kod kuće, nije potreban odlazak u bolnicu uz intravenozne terapije kao za neke metode liječenja COVID-19.¹³ Jako je bitno započeti terapiju ovim antivirusnim lijekovima u roku od pet dana od pojave simptoma. Oba lijeka dobro su rješenje za rano liječenje COVID-19 kao oralni lijekovi u svrhu smanjenja ozbiljnih posljedica hospitalizacije i smrti.²⁷

Paxlovid je pokazao veće smanjenje rizika od hospitalizacije i smrti u usporedbi s placebom nego molnupiravir u usporedbi s placebom. Paxlovid je imao 89% smanjenje rizika od hospitalizacije i smrti u ispitivanju koje je poduprijela EUA (engl. *Emergency Use Authorization*), a zbog visokog postotka Nacionalni institut za zdravlje (NI) mu je dao prednost u odnosu na druge tretmane za COVID-19. Štoviše, jeftiniji je od mnogih drugih lijekova. S druge strane, molnupiravir ima samo 30% smanjenje rizika od hospitalizacije i smrti od COVID-19 prema izvoru.³²

Prilikom kliničkih ispitivanja, došlo je do pojave "povratka" simptoma COVID-19 kod nekih ljudi unutar 2 do 8 dana nakon završetka petodnevnog terapije paxlovidom. Neki su ponovno bili pozitivni, ali asimptomatični dok su se drugima simptomi ponovno pojavili.³²

2.3. Zaključak

SARS-CoV-2 virus je koji je predstavio globalan problem u 21. stoljeću te uzrokovao pandemiju nezapamćenih razmjera. Bolest koju uzrokuje je COVID-19 koja ima spektar različitih oblika, od blagih do teških. Najčešći simptomi koji su indikator oboljenja su kašalj, povišena tjelesna temperatura, bolovi u mišićima i zglobovima te slabost i gubitak osjeta mirisa i okusa. S druge strane, zabilježen je velik broj asimptomatskih slučajeva. Način širenja virusa je s osobe na osobu i uglavnom se prenosi kapljičnim putem pri kihanju i kašljanju, kao i indirektno putem kontaminiranih ruku izlučevinama oboljele osobe s obzirom da virus može preživjeti nekoliko sati na površinama.

Temeljna uloga imunološkog sustava čovjeka jest zadržavanje zdravlja i mehanizma razvoja bolesti iliti patogeneze. Razlikuju se tri tipa imuniteta koje čovjek može razviti tijekom života: urođeni imunitet, prilagodljivi imunitet te pasivni imunitet. Kako bi se obranio od virusa SARS-CoV-2, organizam se brani prvo urođenim, a ukoliko je potrebno i prilagodljivim imunitetom. Urođeni imunitet prvi je korak obrane organizma i počinje aktiviranjem senzora koji detektiraju strane mikroorganizme metodom tzv. *prepoznavanja uzorka*. Potom pokreću trenutni odgovor lučenjem citokina i interferona. Nakon što se izluče, citokini i interferoni vežu se na receptore lokalnih stanica kako bi im signalizirali potrebnu obranu. Također, mogu inducirati i smrt zaraženih stanica kako bi se spriječilo daljnje širenje te okupiti bijele krvne stanice i usmjeriti ih na borbu protiv stranih mikroorganizama. Ključnu ulogu u prilagodljivom imunitetu imaju B i T-stanice. Nakon što dođu do tkiva u kojem je došlo do infekcije, T-stanice otkrivaju specifične fragmente virusa na površini zaraženih stanica i uništavaju ih. Antitijela koja luče B-stanice vežu se na površinu virusa i blokiraju ulazak u stanicu (neutralizirajuća antitijela). T i B-stanice postaju memorijske stanice te kad drugi put naiđe na isti virus, memorijske B-stanice proizvesti će mnogo brže i više antitijela.

Oralni lijekovi su vrsta lijekova koji se uzimaju oralno (kroz usta). Postoje u čvrstom obliku ili kao tekućine. Bitno je naglasiti da antivirusne lijekove za akutne respiratorne infekcije je potrebno uzimati u samim počecima infekcije, do pet dana od pojave simptoma. Molnupiravir i paxlovid su promatrani u ovom radu. Molnupiravir djeluje tako što inhibira replikaciju SARS-CoV-2. NHC nastaje iz molnupiravira u organizmu te potom cilja enzim RNA ovisnu RNA polimerazu (RdRP) koju SARS-CoV-2 koristi kako bi se replicirao. RdRP potom koristi NHC

kako bi stvorila novi RNA lanac čime čini greške u genetičkom kodu SARS-CoV-2 i čini virus disfunkcionalnim. Paxlovid je kombinacija 2 lijeka nirmatrelvir i ritonavir te oba funkcioniraju kao inhibitori proteaza: nirmatrelvir inhibira SARS CoV-2 3CLpro dok je ritonavir jaki inhibitor citokroma P450-3A4 te se također koristi za jačanje djelovanja inhibitora HIV proteaza. Molnupiravir i paxlovid aktivno se koriste u liječenju COVID-19 prije svega kod ljudi koji spadaju u rizičnu skupinu i koji imaju srednje do srednje teške simptome. Paxlovid ima zamjetniju uspješnost u primjeni.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.hzjz.hr/priopcenja-mediji/pitanja-i-odgovori-o-bolesti-uzrokovanoj-novim-koronavirusom/> Pristupljeno 14.08.2022.
2. J.L. Schultze, A.C. Aschenbrenner, *Cell* **184** (2021) 1671–1692.
3. M. Ciotti, M. Ciccozzi, A. Terrinoni, W.-C. Jiang, C.-B. Wang, S. Bernardini, *Crit Rev Clin Lab Sci* **57** (2020) 365–388.
4. H.F. Florindo, R. Kleiner, D. Vaskovich-Koubi, R.C. Acúrcio, B. Carreira, E. Yeini, G. Tiram, Y. Liubomirski, R. Satchi-Fainaro, *Nat Nanotechnol* **15** (2020) 630–645.
5. M.A. Chowdhury, N. Hossain, M.A. Kashem, Md.A. Shahid, A. Alam, *J Infect Public Health* **13** (2020) 1619–1629.
6. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/lymphatic/components/thymus.html> Pristupljeno 17.9.2022.
7. F.A. Bonilla, H.C. Oettgen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125** (2010) S33–S40.
8. <https://learn.biorender.com/tutorial/covid-19-immunology-101-for-non-immunologists-english> Pristupljeno 15.08.2022.
9. J. Lan, J. Ge, J. Yu, S. Shan, H. Zhou, S. Fan, Q. Zhang, X. Shi, Q. Wang, L. Zhang, X. Wang, *Nature* **581** (2020) 215–220.
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK361020/> Pristupljeno: 15.08.2022.
11. <https://www.science.org/content/blog-post/molnupiravir-last-small-molecule-coronavirus-hopes> Pristupljeno 15.08.2022.
12. W.A. Fischer, J.J. Eron, W. Holman, M.S. Cohen, L. Fang, L.J. Szewczyk, T.P. Sheahan, R. Baric, K.R. Mollan, C.R. Wolfe, E.R. Duke, M.M. Azizad, K. Borroto-Esoda, D.A. Wohl, R.W. Coombs, A. James Loftis, P. Alabanza, F. Lipansky, W.P. Painter, *Sci Transl Med* **14** (2022).
13. A. Extance, *BMJ* (2022) o926.
14. A. Jayk Bernal, M.M. Gomes da Silva, D.B. Musungaie, E. Kovalchuk, A. Gonzalez, V. Delos Reyes, A. Martín-Quirós, Y. Caraco, A. Williams-Diaz, M.L. Brown, J. Du, A. Pedley, C. Assaid, J. Strizki, J.A. Grobler, H.H. Shamsuddin, R. Tipping, H. Wan,

- A. Paschke, J.R. Butters, M.G. Johnson, C. de Anda, *New England Journal of Medicine* **386** (2022) 509–520.
15. F. Kabinger, C. Stiller, J. Schmitzová, C. Dienemann, G. Kokic, H.S. Hillen, C. Höbartner, P. Cramer, *Nat Struct Mol Biol* **28** (2021) 740–746.
16. C.-W. Lin, C.-H. Tsai, F.-J. Tsai, P.-J. Chen, C.-C. Lai, L. Wan, H.-H. Chiu, K.-H. Lin, *FEBS Lett* **574** (2004) 131–137.
17. <https://www.yalemedicine.org/news/13-things-to-know-paxlovid-covid-19> Pristupljeno 15.08.2022.
18. <https://www.medchemexpress.com/pf-07321332.html> Pristupljeno 15.08.2022.
19. <https://www.hexabiogen.com/autres-produits-186/ritonavir-155213-67-5-231000986.html> Pristupljeno 15.08.2022.
20. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/paxlovid-pf-07321332-ritonavir-covid-19-article-53-procedure-assessment-report_en.pdf Pristupljeno 18.09.2022.
21. A. Extance, *BMJ* (2022) o1037.
22. J.C. Ferreira, W.M. Rabeh, *Sci Rep* **10** (2020) 22200.
23. C.-W. Lin, C.-H. Tsai, F.-J. Tsai, P.-J. Chen, C.-C. Lai, L. Wan, H.-H. Chiu, K.-H. Lin, *FEBS Lett* **574** (2004) 131–137.
24. R.L. Hoffman, R.S. Kania, M.A. Brothers, J.F. Davies, R.A. Ferre, K.S. Gajiwala, M. He, R.J. Hogan, K. Kozminski, L.Y. Li, J.W. Lockner, J. Lou, M.T. Marra, L.J. Mitchell, B.W. Murray, J.A. Nieman, S. Noell, S.P. Planken, T. Rowe, K. Ryan, G.J. Smith, J.E. Solowiej, C.M. Steppan, B. Taggart, *J Med Chem* **63** (2020) 12725–12747.
25. A. Dömling, L. Gao, *Chem* **6** (2020) 1283–1295.
26. Y.-P. Hung, J.-C. Lee, C.-W. Chiu, C.-C. Lee, P.-J. Tsai, I.-L. Hsu, W.-C. Ko, *Antibiotics* **11** (2022) 220.
27. L.D. Saravolatz, S. Depcinski, M. Sharma, *Clinical Infectious Diseases* (2022).
28. <https://www.rcsb.org/structure/8DG3> Pristupljeno 16.08.2022., (n.d.).
29. H.M. Mengist, T. Dilnessa, T. Jin, *Front Chem* **9** (2021).
30. I.F. Sevioukova, T.L. Poulos, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (2010) 18422–18427.
31. <https://www.rcsb.org/3d-view/3NXU> Pristupljeno 16.08.2022.
32. <https://www.yalemedicine.org/news/13-things-to-know-paxlovid-covid-19#:~:text=Paxlovid%20is%20an%20oral%20antiviral> Pristupljeno 19.09.2022.

