

# Recentne spoznaje o mogućoj učinkovitosti antimalarika klorokina i njegovog derivata 4-hidroksiklorokina u liječenju COVIDA-19

---

Hunić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:538945>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Matea Hunić**

7397/PT

**RECENTNE SPOZNAJE O MOGUĆOJ UČINKOVITOSTI  
ANTIMALARIKA KLOROKINA I NJEGOVOG DERIVATA  
4-HIDROKSIKLOROKINA U LIJEČENJU COVIDA-19**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Organska kemija

**Mentor:** Prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### RECENTNE SPOZNAJE O MOGUĆOJ UČINKOVITOSTI ANTIMALARIKA KLOOROKINA I NJEGOVOG DERIVATA 4-HIDROKSIKLOOROKINA U LIJEČENJU COVIDA-19

*Matea Hunić, 0058210707*

**Sažetak:** Pojava novootkrivenog koronavirusa SARS-CoV-2 krajem 2019. godine izazvala je globalnu zabrinutost zbog svoje visoke stope smrtnosti, a zbog čega Svjetska zdravstvena organizacija 11. ožujka 2020. godine proglašava globalnu pandemiju bolesti COVID-19. Dok broj zaraženih osoba u svijetu i dalje raste, prioritet brojnih istraživačkih skupina širom svijeta postaje razvoj cjepiva i lijekova protiv COVIDA-19. Potencijalnu djelotvornost u liječenju nove bolesti imaju već odobreni antimikrobni lijekovi, među kojima su antimalarik klorokin i njegov derivat hidroksiklorokin. Stoga je cilj ovog rada opisati moguće mehanizme djelovanja te utjecaj klorokina i hidroksiklorokina na liječenje COVIDA-19 s obzirom na podrijetlo i molekulsku strukturu virusa SARS-CoV-2.

**Ključne riječi:** COVID-19, hidroksiklorokin, klorokin, koronavirus, SARS-CoV-2

**Rad sadrži:** 33 stranice, 12 slika, 6 shema, 73 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Lidija Barišić

**Datum obrane:** 01.09.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### RECENT INSIGHTS ABOUT POTENTIAL EFFICIENCY OF ANTIMALARIAL CHLOROQUINE AND ITS DERIVATIVE 4- HYDROXYCHLOROQUINE IN THE TREATMENT OF COVID-19

*Matea Hunić, 0058210707*

**Abstract:** The emergence of a novel coronavirus SARS-CoV-2 at the very end of 2019, has raised global concerns due to its high fatality rate and was declared as a global pandemic by the World Health Organization on 11 March 2020. As the number of infections continues to rise, numerous research groups around the globe have prioritized the identification and development of new COVID-19 treatments. Already approved antimicrobial drugs, including the antimalarial chloroquine and its derivative hydroxychloroquine, have potential promising efficacy in the treatment of COVID-19 disease. Therefore, the aim of this study was to describe the possible mechanisms of action and the influence of chloroquine and hydroxychloroquine on the treatment of COVID-19 with respect to the origin and molecular structure of the SARS-CoV-2.

**Keywords:** chloroquine, coronavirus, COVID-19, hydroxychloroquine, SARS-CoV-2

**Thesis contains:** 33 pages, 12 figures, 6 schemes, 73 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Ph. D. Lidija Barišić

**Defence date:** September 1<sup>st</sup> 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Svojstva SARS-CoV-2 .....	2
2.1.1. Struktura genoma i molekule SARS-CoV-2 .....	2
2.1.2. Replikacija koronavirusa .....	4
2.1.3. Imunološka reakcija organizma na COVID-19 .....	6
2.1.4. Metode liječenja COVIDA-19 antivirusnim agensima .....	8
2.2. Klorokin .....	9
2.2.1. Sinteza klorokina .....	10
2.2.2. Medicinska upotreba klorokina .....	13
2.2.3. Biokemijsko i stanično djelovanje klorokina .....	13
2.3. Mehanizmi virusne inhibicije klorokinom .....	14
2.3.1. Inhibicija endocitoze virusa i sprječavanje glikozilacije .....	15
2.3.2. Inhibicija autofagocitoze .....	16
2.3.3. Represija proupalnih čimbenika .....	17
2.4. Djelotvornost klorokina u liječenju COVIDA-19 .....	18
2.4.1. Pojava mogućih nuspojava tijekom liječenja COVIDA-19 klorokinom .....	20
2.5. 4-Hidroksiklorokin .....	21
2.5.1. Sinteza hidroksiklorokina .....	21
2.5.2. Djelotvornost hidroksiklorokina u liječenju COVIDA-19 .....	22
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	26
<b>4. LITERATURA</b> .....	27
<b>5. PRILOZI</b> .....	
Prilog 1. Popis kratica .....	

## 1. UVOD

COVID-19 (engl. *Coronavirus Disease of 2019*) je akutna bolest respiratornog sustava čiji je uzročnik koronavirus SARS-CoV-2. Pojava ove bolesti dogodila se u prosincu 2019. godine u gradu Wuhan unutar kineske provincije Hubei, kada se javlja veliki broj slučajeva upale pluća uzrokovanih novootkrivenim sojem koronavirusa. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization, WHO*) 30. siječnja 2020. godine službeno proglašava epidemiju COVID-19 izvanrednom situacijom javnog zdravstva od međunarodne važnosti.<sup>1</sup> Bolest se iznimnom brzinom proširila svijetom i do 1. srpnja 2020. godine zahvaćeno je 216 država, s preko 10 milijuna oboljelih osoba i pola milijuna smrtnih slučajeva.<sup>2</sup> Republika Hrvatska do 1. srpnja 2020. godine bilježi 2.725 oboljelih osoba i 107 smrtnih slučajeva.<sup>3</sup> Države pokušavaju usporiti širenje virusa liječenjem postojećih pacijenata te provedbom određenih mjera zaštite kao što su testiranja potencijalno oboljelih osoba i praćenje njihovih kontakata, samoizolacija, zabrana okupljanja većeg broja ljudi, ograničavanje međunarodnog prometa te privremeno zatvaranje granica.

Izvor SARS-CoV-2 nije utvrđen sa sigurnošću. Nekolicina pacijenata iz Wuhana epidemiološki je povezana sa tržnicom morske hrane Huanan. Međutim, za sada ne postoje važeći dokazi da je tržnica Huanan izvor infekcije jer dio pacijenata negira boravak u prostoru spomenute tržnice. Sumnja se da SARS-CoV-2 potječe iz životinjskih izvora i da se prenosi direktnim kontaktom s prijelaznim domaćinima virusa ili konzumacijom divljih životinja.<sup>1</sup> Prema nekim epidemiološkim istraživanjima, šišmiš kao prirodni izvor različitih vrsta koronavirusa, uključujući viruse koji uzrokuju teški akutni respiratorni sindrom (SARS) i bliskoistočni respiratorni sindrom (MERS), mogući je izvor SARS-CoV-2.<sup>4</sup>

Iako se intenzivno radi na pronalasku i pripremi cjepiva, još nije potvrđena njegova djelotvornost. Zbog nedostatka cjepiva, od iznimne je važnosti procjena potencijalnog preventivnog i terapijskog djelovanja već postojećih lijekova. Među njima se istražuju i klorokin i njegov derivat hidroksiklorokin, a koji se primarno koriste za sprječavanje i liječenje malarije. Određena istraživanja ukazuju na potencijalnu učinkovitost i sigurnost korištenja ovih lijekova prilikom liječenja COVIDA-19.<sup>5</sup>

U ovom završnom radu opisać će se podrijetlo i molekulska struktura SARS-CoV-2 te mogući mehanizmi djelovanja i utjecaj antimalarika klorokina i njegovog derivata hidroksiklorokina na liječenje COVIDA-19 s obzirom na svojstva virusa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Svojstva SARS-CoV-2

Ubrzo nakon pojave SARS-CoV-2, kineski znanstvenici uspijevaju izolirati virus iz oboljele osobe te 7. siječnja 2020. godine sekvenciranjem utvrđuju redoslijed nukleotida u virusnoj RNA.<sup>6</sup> Otkriveno je da SARS-CoV-2 pripada skupini  $\beta$ -koronavirusa. To su jednolančani, pozitivno usmjereni RNA-virusi s ovojnicom, a pripadaju potporodici *Orthocoronavirinae*.<sup>7</sup> Koronavirusi su podijeljeni u četiri roda koji uključuju  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -koronaviruse.  $\alpha$ - i  $\beta$ -koronavirusi mogu zaraziti sisavce, dok  $\gamma$ - i  $\delta$ -koronavirusi inficiraju ptice. Do sada je otkriveno ukupno šest koronavirusa koji mogu zaraziti ljude, a među njima su nisko patogeni  $\alpha$ -koronavirusi HCoV-229E i HCoV-NL63 te HCoV-HKU1 i HCoV-OC43 koji pripadaju  $\beta$ -koronavirusima. Oni uzrokuju blage simptome akutne respiratorne infekcije kao što su hunjavica, kihanje, osjećaj začepljenosti nosa i ušiju, suhoća, stezanje i lagana bol u ždrijelu.

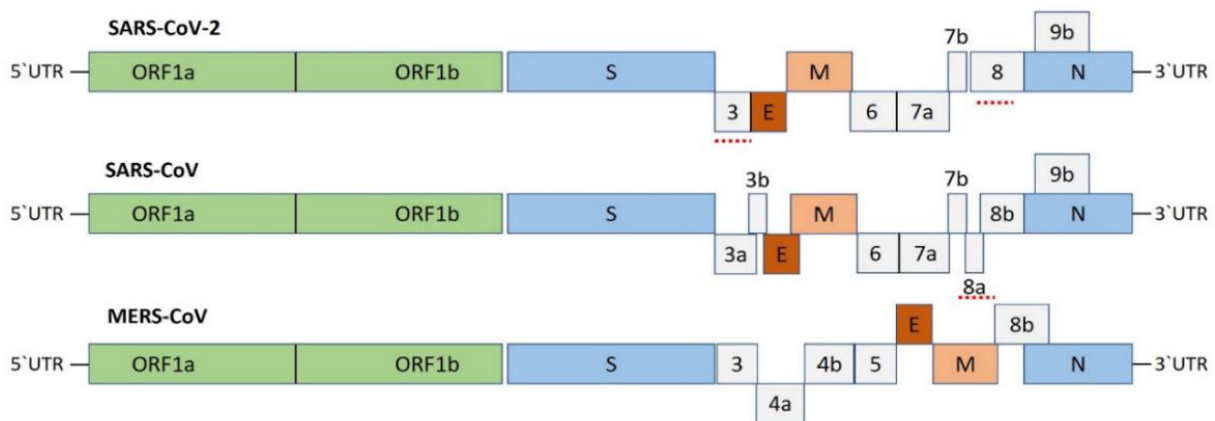
Nadalje, postoje dva  $\beta$ -koronavirusa koja uzrokuju ozbiljne i potencijalno smrtonosne infekcije respiratornog sustava – SARS-CoV i MERS-CoV.<sup>8</sup> SARS koronavirus uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom. Epidemija SARS-a trajala je od 2002.-2003. godine, a zahvatila je 29 država uključujući preko 8.000 zaraženih osoba i 774 smrtna slučaja.<sup>9</sup> MERS-CoV uzrokuje bliskoistočni respiratorni sindrom. Do siječnja 2020. godine prijavljeno je oko 2.500 slučajeva zaraze, a smrtnost iznosi oko 35%. Veće epidemije MERS-a dogodile su se u Južnoj Koreji 2015. godine te u Saudijskoj Arabiji 2018. godine.<sup>10</sup>

#### 2.1.1. Struktura genoma i molekule SARS-CoV-2

Istraživanja u području genetike virusa ukazuju na 79,5%-tno podudaranje sekvence genoma SARS-CoV-2 i SARS-CoV te 96,2%-tno podudaranje sa genomom koronavirusa RaTG13 izoliranog iz šišmiša.<sup>11</sup> U usporedbi s genomima SARS-CoV i MERS-CoV, novootkriveni SARS-CoV-2 ima najbližnju sekvencu gena u odnosu na koronavirus izoliran iz šišmiša. Filogenetska sličnost te sličnost genoma SARS-CoV-2 i SARS-CoV vidljiva je kod gena koji kodiraju za mjesto vezanja receptora S-proteina (engl. *receptor-binding domain*, RBD), međutim ostatak genoma S-glikoproteina SARS-CoV-2 znatno je različit od onoga kod drugih vrsta koronavirusa.<sup>12</sup>

Genom koronavirusa sadrži promjenjiv broj otvorenih okvira čitanja (ORF, engl. *Open Reading Frame*). Oko 70% virusne RNA koja se većinski nalazi u prvom otvorenom okviru čitanja ORF 1a/b (slika 1) kodira dva poliproteina pp1a i pp1ab te 16 nestrukturnih proteina, dok ostatak ORF-a kodira pomoćne i strukturne proteine.<sup>13</sup> Preostali dio genoma koronavirusa

kodira nekoliko pomoćnih proteina koji ometaju nespecifičnu (urođenu) imunološku reakciju domaćina i pet strukturnih proteina uključujući glikoproteinski šiljak (S-glikoprotein), protein hemaglutinin-esterazu (HE-protein), protein virusne ovojnice (E-protein), protein membrane (M-protein) i protein nukleokapside (N-protein).<sup>14</sup>

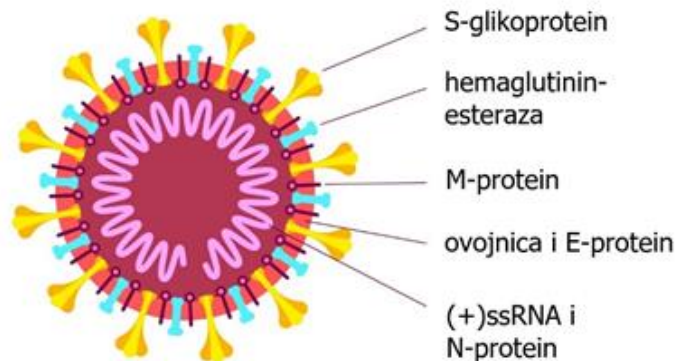


Slika 1. Organizacija genoma  $\beta$ -koronavirusa. Genom  $\beta$ -koronavirusa SARS-CoV-2, SARS-CoV i MERS-CoV sastoji se od 5'-kraja RNA molekule (5'-UTR) i 3'-kraja RNA molekule (3'-UTR), otvorenog okvira čitanja 1a/b (zeleno) koji kodira nestrukturane proteine, strukturnih proteina uključujući glikoproteinski šiljak na virusnoj ovojnici (plavo S), ovojnice (smeđe), membrane (ružičasto), proteina nukleokapside (plavo N) i pomoćnih proteina (sivo) kao što su ORF 3, 6, 7a, 7b, 8 i 9b u genomu SARS-CoV-2. Crveno podcrtani otvoreni okviri čitanja su pomoćni proteini koji čine glavnu razliku genoma SARS-CoV-2 i SARS-CoV.<sup>15</sup>

Protein virusne ovojnice (E-protein) mali je integralni membranski protein koji je uključen u pojedine dijelove životnog ciklusa koronavirusa kao što je formiranje ovojnice, patogeneza, prodiranje virusa kroz staničnu membranu i izlazak iz inficirane stanice. M-protein čini dio virusne ovojnice zajedno sa S-proteinima i E-proteinima, a glavna uloga mu je morfogeneza virusa pomoću interakcija sa drugim virusnim proteinima.<sup>16</sup> M-protein ima dominantnu imunogenost, odnosno sposobnost pobuđivanja imunološkog odgovora te bi iz tog razloga mogao koristiti prilikom razvoja cjepiva protiv COVIDA-19. Primarna funkcija proteina nukleokapside je sastavljanje viriona [potpuno infektivne virusne čestice s DNA ili RNA u jezgri i proteinskim omotačem (kapsidom), kakva se nalazi izvan stanice domaćina] koji se naziva i virusnom česticom<sup>17</sup>, odnosno stvaranje nukleokapside koja ima ključnu ulogu prilikom replikacije virusa. Također, N-protein u molekuli SARS-CoV-2 utječe na imunski odgovor stanice te može imati regulatornu ulogu tijekom životnog ciklusa koronavirusa.<sup>18</sup> S-glikoproteini nalaze se na lipidnoj ovojnici virusa, kao i HE-proteini, te zbog njih virus oblikom nalikuje na krunu. S-glikoproteini predstavljaju važnu ulogu prilikom pronalazjenja i razvoja



lijekova protiv COVIDA-19 jer ulazak koronavirusa u stanicu ovisi upravo o njihovom povezivanju sa receptorima na površini stanice, dok HE-proteini nisu toliko značajni za virulentnost.



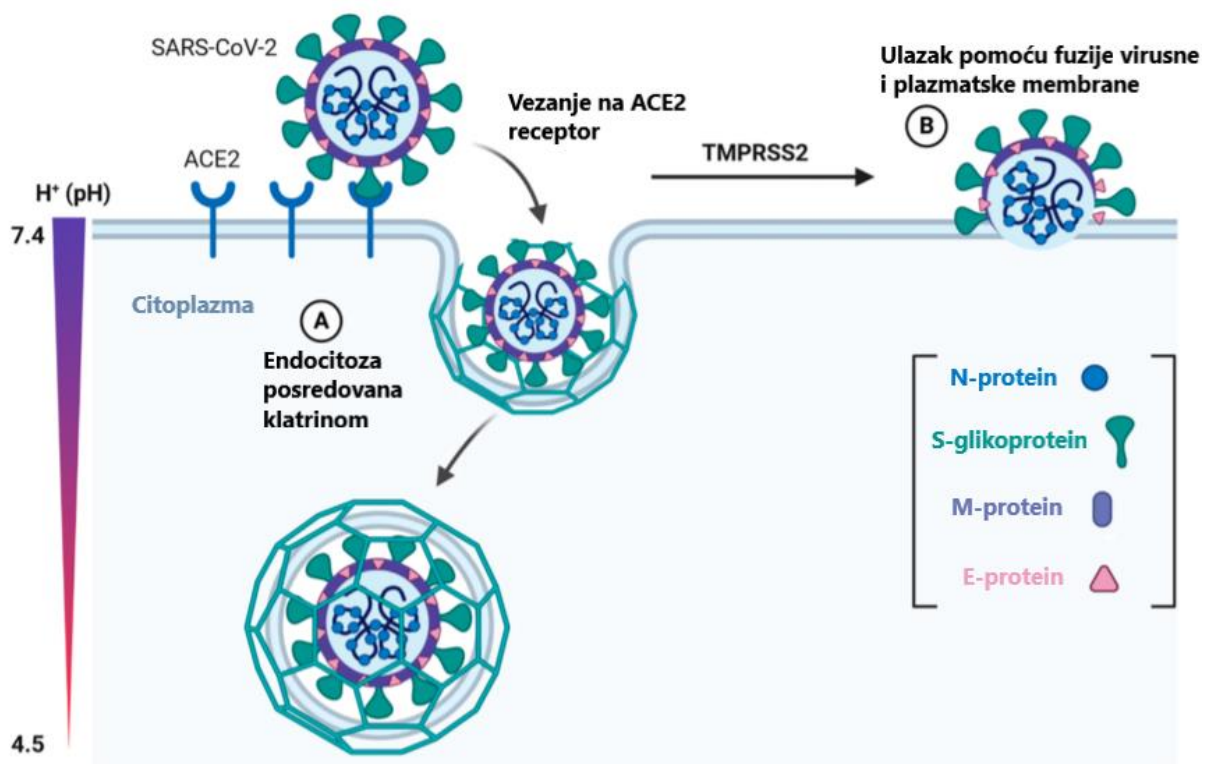
Slika 2. Struktura SARS-CoV-2.<sup>19</sup>

### 2.1.2. Replikacija koronavirusa

Replikacija (umnožavanje) virusa je enzimski proces prepisivanja virusnog genoma kojeg čini jedna od nukleinskih kiselina – DNA ili RNA. Umnožavanje virusa razlikuje se od razmnožavanja ostalih mikroorganizama jer se odvija isključivo u živoj stanici. Razumijevanje procesa replikacije određenog virusa od iznimne je važnosti za razvoj antivirusnih lijekova i cjepiva. Cijeli proces replikacije koronavirusa odvija se u citoplazmi. Za vrijeme umnožavanja na površini i u unutrašnjosti inficirane stanice nastaju određene promjene, a sam ciklus započinje vezanjem virusa na stanicu domaćina. Postoje dvije mogućnosti ulaska koronavirusa u stanicu – fuzija virusne i plazmatske membrane ili endocitoza posredovana klatrinom, proteinom koji ima centralnu ulogu u formiranju vezikula. U oba slučaja, ulazak virusa u stanicu uključuje receptore koji se nalaze na površini membrane.<sup>20</sup> Istraživanja su utvrdila da SARS-CoV-2 jednako kao i SARS-CoV za ulazak u stanicu koristi angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE 2) koji se pretežno nalazi u plućnim kapilarama.<sup>11</sup> Prilikom ulaska koronavirusa u stanicu putem endocitoze posredovane klatrinom, na ACE 2 receptor veže se S-glikoprotein. Strukturna analiza potvrđuje da je afinitet vezanja SARS-CoV-2 S-glikoproteina za ACE 2 receptor 10-20 puta veći nego u slučaju vezanja SARS-CoV S-glikoproteina,<sup>21</sup> što vjerojatno pridonosi većoj transmisiji SARS-CoV-2 u odnosu na SARS-CoV.

S-glikoprotein je transmembranski glikoprotein tipa I čiji je karboksilni kraj usmjeren prema citosolu. Sastoji se od dvije podjedinice – S1 i S2. S1 podjedinica u svoje mjesto za vezanje receptora (RBD) veže stanični receptor ACE 2 čime dolazi do promjene konformacije S2 podjedinice koja posljedično omogućava stapanje stanične membrane i virusne ovojnice.<sup>22</sup>

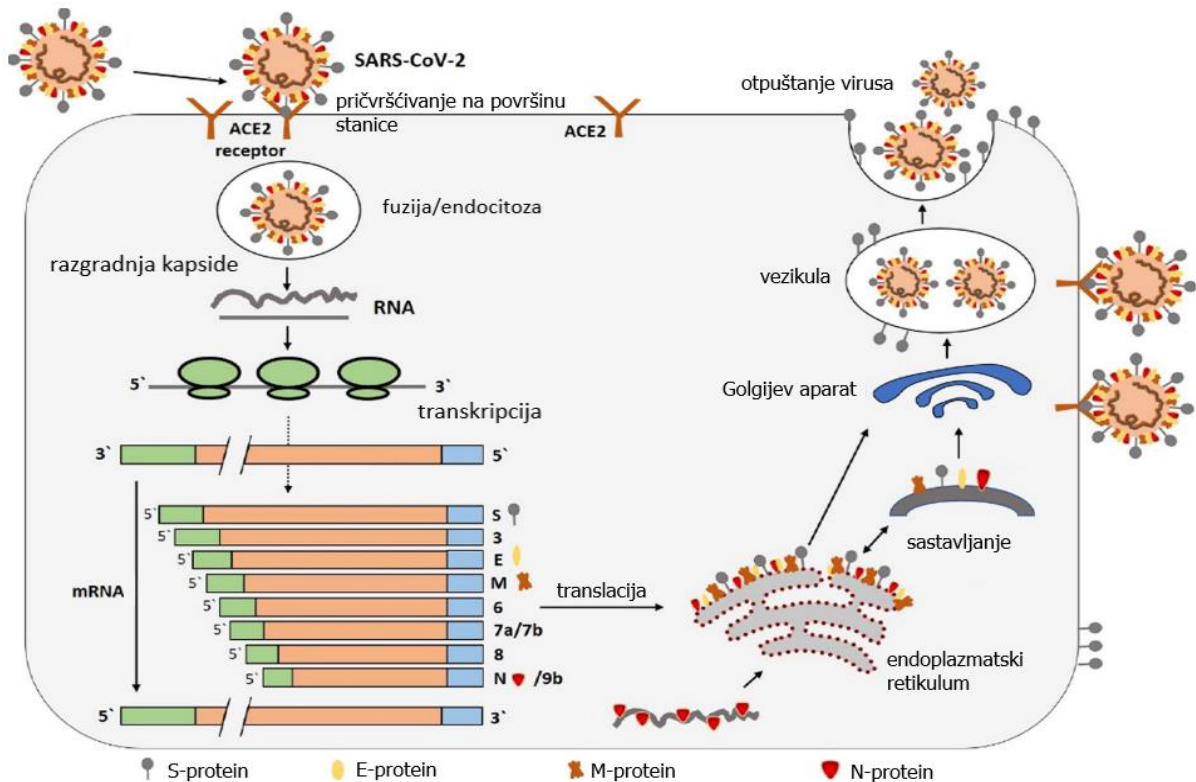
Ovaj proces predstavlja kritičnu točku ulaska virusa u stanicu domaćina jer prodiranje virusa u konačnici rezultira razgradnjom kapside i otpuštanjem virusne RNA u citoplazmu stanice. Prilikom ulaska virusa u stanicu putem stapanja virusne i plazmatske membrane, ključnu ulogu imaju proteolitički enzimi domaćina. U slučaju SARS-CoV-2, transmembranska serin-proteaza 2 (TMPRSS2, engl. *Transmembrane Protease Serine 2*) veže S-glikoprotein na mjestu cijepanja S1/S2 i time aktivira S-glikoprotein koji tako omogućava ulazak SARS-CoV-2 u stanicu pomoću fuzije.<sup>23,24</sup> Recentno istraživanje potvrđuje da su Vero E6 stanice s izraženim TMPRSS2 izrazito podložne infekciji SARS-CoV-2, što ujedno ukazuje na važnost tih proteaza tijekom replikacije virusa<sup>23</sup> (slika 3).



Slika 3. Ulazak koronavirusa u stanicu fuzijom (B) i endocitozom (A).<sup>12</sup>

Nakon ulaska u stanicu dolazi do razgradnje kapside virusne čestice te slijede procesi transkripcije i translacije. Prvi ORF kodira otprilike 67% genoma i podijeljen je na ORF 1a i 1b (slika 1). ORF1a i ORF1b kodiraju za proteine pp1a i pp1ab. Obrada ovih poliproteina rezultira sintezom različitih nestrukturnih proteina, uključujući RNA-ovisnu RNA-polimerazu i helikazu koje prepoznaju i sintetiziraju isključivo viralne RNA molekule.<sup>12</sup> RNA-polimeraza koristi jednolančanu pozitivnu RNA (engl. *positive stranded (+)RNA*) kao kalup za sintezu (-)RNA lanca. Transkripcijom (-)RNA lanca nastaje novi (+)RNA lanac te subgenomski mRNA fragmenti koji kodiraju strukturne i pomoćne proteine virusa.<sup>20</sup> Posredstvom endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tijela novonastala virusna RNA molekula zajedno sa proteinima

nukleokapside, proteinima membrane i proteinima ovojnice tvori vezikule koje u konačnici izlaze iz inficirane stanice (slika 4).



Slika 4. Proces umnožavanja (replikacije) virusa.<sup>15</sup>

### 2.1.3. Imunološka reakcija organizma na COVID-19

COVID-19 na čovjeka se prenosi kapljičnim putem, izravnim kontaktom sa zaraženom osobom te dodiranjem predmeta i površina izloženih virusu.<sup>25</sup> Klinički simptomi oboljelih osoba uključuju povišenu tjelesnu temperaturu, suhi kašalj i umor, dok mali broj bolesnika ima i simptome gastrointestinalne infekcije kao što su mučnina, povraćanje i abdominalni bolovi.<sup>26</sup> Osobe starije životne dobi i kronični bolesnici podložniji su težim oblicima bolesti koja prvenstveno napada i uništava pluća te uzrokuje zatajenje drugih organa.

Glavne značajke uspješnog patogena su mogućnost preživljavanja unutar domaćina i sposobnost izazivanja bolesti organizma. Reakcija imunološkog sustava je ključna za kontrolu i zaštitu organizma od infekcije koronavirusom, a istraživanja su pokazala da imunološka reakcija organizma na SARS-CoV-2 uključuje i nespecifični (urođeni) i specifični (stečeni) obrambeni mehanizam.<sup>27</sup>

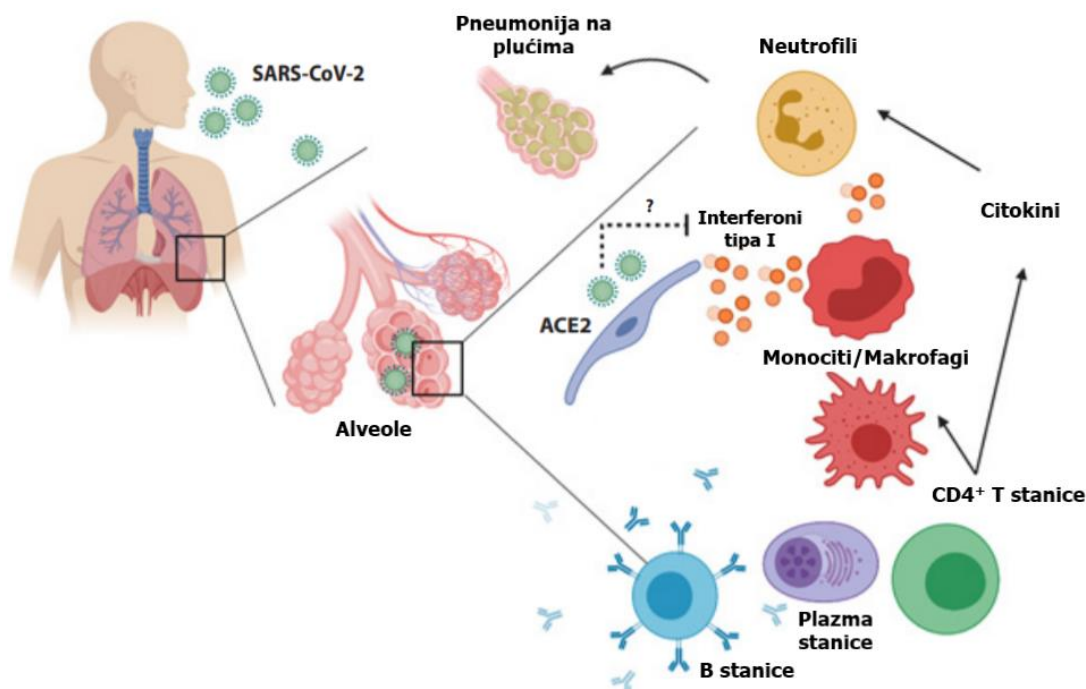
Ciljevi urođenog i stečenog imunološkog odgovora na viruse jesu sprječavanje zaraze i uklanjanje zaražene stanice. Urođena imunost predstavlja prvu liniju obrane organizma i od

rođenja osigurava vrlo dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama. Glavni mehanizam urođene imunosti protiv virusa čine interferoni tipa I koji sprječavaju zarazu i ubijanje zaraženih stanica, pomoću NK-stanica – velikih granuliranih limfocita koji funkcionalno pripadaju sustavu urođene imunosti. NK-stanice karakterizira snažna citotoksična aktivnost i značajna proizvodnja upalnih citokina.<sup>27</sup> SARS-CoV i MERS-CoV ometaju signalne puteve koji potiču proizvodnju interferona pa time potiskuju reakciju interferona tipa I. S obzirom na djelomično podudaranje sekvence genoma, pretpostavlja se da SARS-CoV-2 upotrebljava slične metode za modulaciju imunološke reakcije domaćina kao i spomenute vrste koronavirusa.<sup>28</sup> U plućima nalazimo dvije fagocitne populacije stanica - alveolarne makrofage i dendritičke stanice (DC) - koje ujedno prezentiraju antigen. Nakon infekcije i aktivacije koronavirusom, alveolarni makrofagi proizvode značajnu količinu proupalnih citokina kao što su IL-6 i TNF- $\alpha$ .<sup>28,29</sup> Iako imaju važnu ulogu u nespecifičnim mehanizmima obrane od virusa, snažna regrutacija alveolarnih makrofaga u plućima i proizvodnja velike količine proupalnih citokina može izazvati pojačani imunski odgovor te posljedično povećanje smrtnosti. Dendritičke stanice (DC) imaju ključnu ulogu u premošćivanju prirodne i stečene imunosti nakon infekcije virusima. Dendritičke stanice su vjerojatno primarno odgovorne za predočenje antigena koronavirusa i posljedičnu indukciju staničnog odgovora.

Stečena imunost na virusne zaraze uključuje protutijela koja blokiraju vezanje i ulazak virusa u stanicu domaćina te citotoksične limfocite T (CTL) koji uklanjaju infekciju ubijanjem zaraženih stanica. Većina citotoksičnih limfocita T specifičnih za viruse jesu CD8+ ili CD4+ T-stanice koje prepoznaju citoplazmatske virusne peptide. One se tijekom zaraze jako umnožavaju i uglavnom su specifične za nekoliko virusnih peptida. Osim ubijanja inficiranih stanica, protuvirusni učinak citotoksičnih limfocita T čine i mehanizmi koji uključuju aktivaciju nukleaza koje razgrađuju virusni genom te sekreciju citokina koji aktiviraju fagocite i imaju određeni protuvirusni učinak. Glavne kategorije citokina su interferoni (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), faktori tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), interleukini, kemokini, transformirajući faktor rasta (TGF) i faktori stimulacije hematopoetskih kolonija (CSF) (slika 5).

Kod pojedinih pacijenata oboljelih od COVIDA-19, uočena je povećana koncentracija određenih citokina i kemokina uključujući IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13 i IL-17.<sup>29,30</sup> U skladu s time, istraživanja provedena na pacijentima preminulima od COVIDA-19 pokazala su da je SARS-CoV-2 izazvao upalnu reakciju donjih dišnih putova što je dovelo do oštećenja pluća.<sup>1</sup> Pokazalo se da virus najprije napada sluznicu respiratornog sustava, a zatim i ostale stanice. Također, izgledno je da teži oblici infekcije mogu biti posljedica

pretjeranog umnožavanja citokina uzrokovanog pokretanjem niza reakcija imunološkog sustava.



Slika 5. Moguća reakcija imunološkog sustava domaćina na infekciju SARS-CoV-2.<sup>28</sup>

#### 2.1.4. Metode liječenja COVIDA-19 antivirusnim agensima

S obzirom na nedostatak učinkovitih terapija protiv infekcije COVID-19, liječenje je uglavnom temeljeno na respiratornoj potpori i dijagnostičkim metodama razvijenima tijekom suzbijanja epidemija izazvanih SARS-CoV i MERS-CoV.<sup>1</sup>

Antivirusni lijekovi [Rapivab (peramivir), Relenza (zanamivir), Tamiflu (oseltamivir) i Xofluza (baloxavir marboxil)] koji se primijenjuju za liječenje gripe<sup>31</sup> te kortikosteroidi ne mogu se koristiti pri liječenju bolesti izazvane SARS-CoV-2. Znanstvenici nastoje pronaći lijekove koji omogućuju sigurno liječenje komplikacija i posljedica pandemije COVID-19, a dosadašnja istraživanja utvrdila su potencijalnu djelotvornost pojedinih terapeutika na određene skupine oboljelih. Provede se klinička testiranja na nekoliko postojećih protuvirusnih lijekova koji se koriste za liječenje SARS-a, MERS-a, AIDS-a i malarije.<sup>32</sup> Izdvojeni antivirusni lijekovi na kojima se provode klinička istraživanja su lopinavir, ritonavir, remdesivir, tocilizumab te klorokin i njegov derivat hidroksiklorokin.<sup>33</sup> Nacionalna zdravstvena komisija Narodne Republike Kine u objavljenim Smjernicama za prevenciju, kontrolu i liječenje pneumonije uzrokovane SARS-CoV-2 navodi klorokin, ribavirin, lopinavir, ritonavir, IFN i arbidol kao antivirusne lijekove za

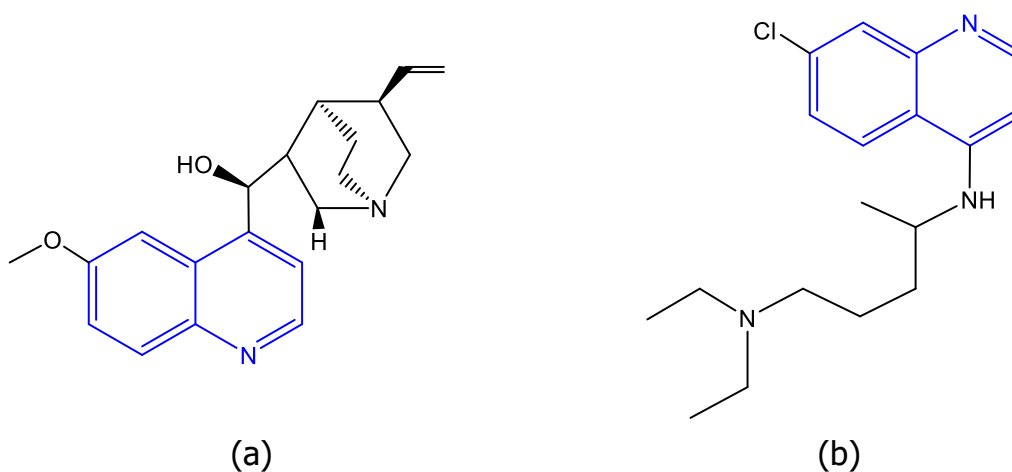
liječenje COVIDA-19.<sup>34</sup> Niti jedan navedeni oblik terapije nije dokazano učinkovit. Međutim, indicirana je mogućnost primjene jednog od antivirusnih lijekova u liječenju COVIDA-19 na temelju dosadašnjih istraživačkih saznanja i objavljenih rezultata.

Pri odabiru najbolje terapije za pojedinu skupinu bolesnika nužno je uzeti u obzir moguće nuspojave navedenih lijekova i interakcije koje oni mogu imati s drugim primijenjenim lijekovima, kao i potrebu korekcije doze lijeka ovisno o zatajenju pojedinih organa i organskih sustava.

## 2.2. Klorokin

Kinin, organska molekula koja sadrži **kinolinsku** podjedinicu, najvažniji je alkaloid izoliran iz južnoameričkih biljaka iz roda *Cinchona*, porodice *Rubiaceae*. Najviše kinina sadrži kora kininovca *Cinchona officinalis* L. (oko 8%) iz koje se izolira ekstrakcijom u obliku bijelog, granuliranog ili mikrokristaliničnog praška, vrlo gorkog okusa.<sup>35</sup> U današnje vrijeme, kinin se koristi kao antimalarik, antipiretik, amarum, uterotonik i abortiv. Osim kurativno, kinin se za liječenje malarije upotrebljava i preventivno – prije, za vrijeme i nekoliko tjedana nakon boravka u područjima u kojima malarija nije iskorijenjena.

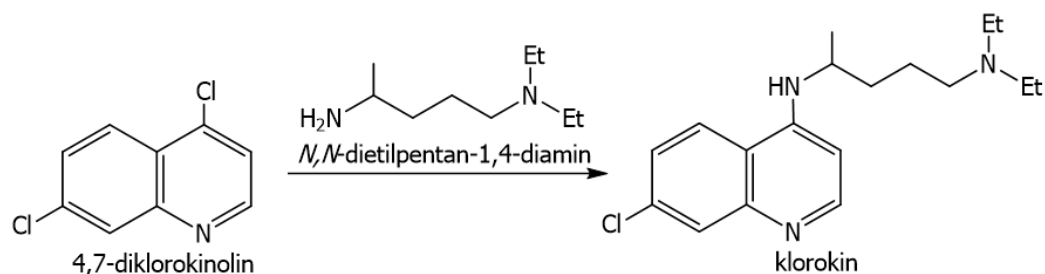
S obzirom na njegovu ograničenu dostupnost, kemijska industrija ulagala je veliki trud za razvoj novih lijekova sa antimalarijskim djelovanjem sličnih kininu, pa je tako njemački znanstvenik Hans Andersag 1934.<sup>36</sup>, radeći za njemačku kemijsku i farmaceutsku tvrtku Bayer AG, prvi sintetizirao klorokin, organsku molekulu iz skupine 4-supstituiranih **kinolina**.



Slika 6. Strukturne formule kinina (a) i klorokina (b).<sup>37</sup>

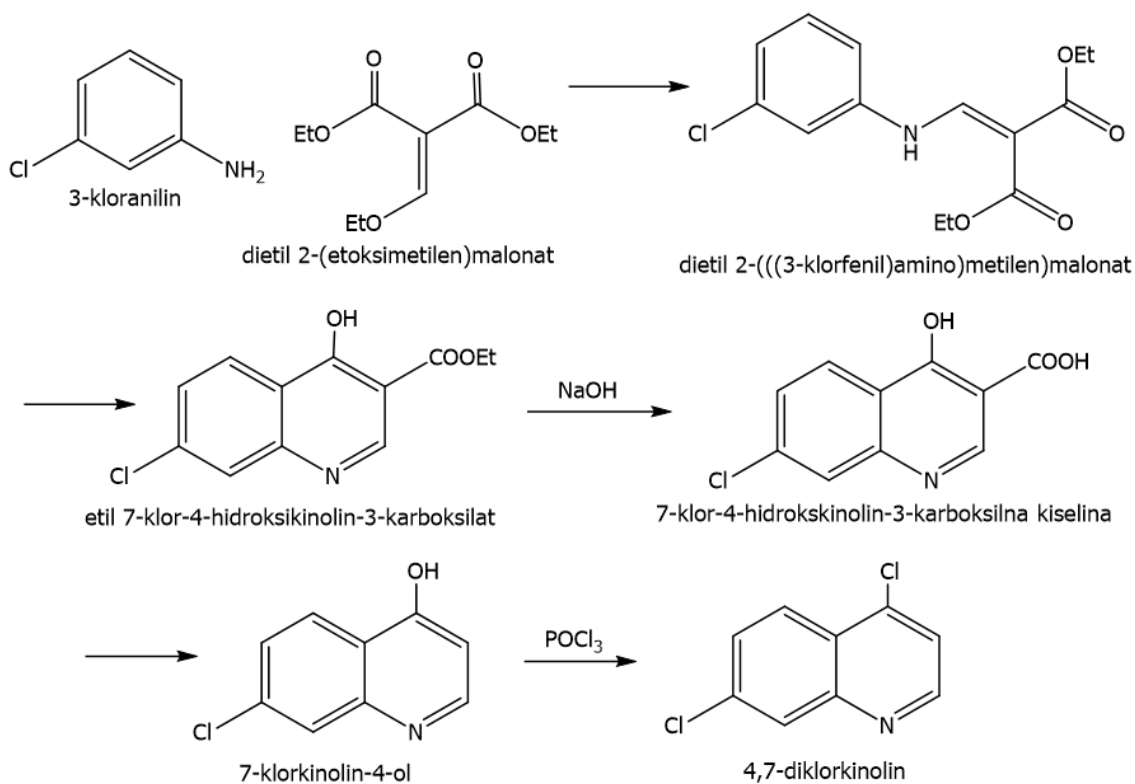
### 2.2.1. Sinteza klorokina

Klorokin nastaje reakcijom 4,7-diklorokinolina i *N,N*-dietilpentan-1,4-diamina pri 180 °C (shema 1).



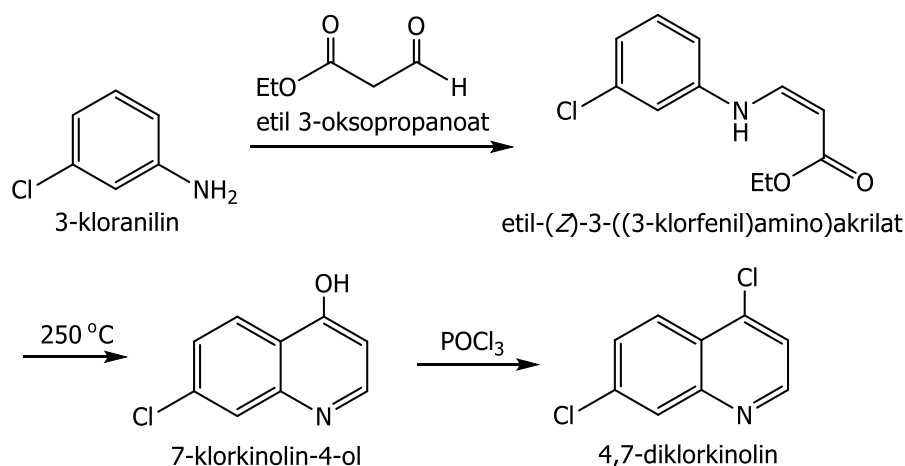
Shema 1. Sinteza klorokina reakcijom 4,7-diklorokinolina i *N,N*-dietilpentan-1,4-diamina.<sup>36</sup>

Kako bi se provela navedena reakcija, potrebno je sintetizirati reaktante. 4,7-diklorokinolin dobiva se iz 3-kloranilina na nekoliko načina. Jedan od pristupa u njegovoj sintezi uključuje reakciju 3-kloranilina s dietil-2-(etoksimetilen)malonatom, čime se dobiva dietil-2-(((3-klorfenil) amino)metilen)malonat. Nakon toga, provodi se heterociklizacija pri visokim temperaturama pri čemu nastaje etil-7-klor-4-hidroksikinolin-3-karboksilat. Hidrolizom uz prisutnost natrijeva hidroksida nastaje 7-klor-4-hidroksikinolin-3-karboksilna kiselina koja dekarboksilacijom pri 250-270 °C prelazi u 7-klorokinolin-4-ol. U konačnici, 4,7-diklorokinolin dobivamo tretiranjem 7-klorokinolin-4-ola sa POCl<sub>3</sub> (shema 2).



Shema 2. Priprava 4,7-diklorokinolina iz 3-kloranilina i dietil-2-(etoksimetilen)malonata.

Drugi način sinteze 4,7-diklorokinolina je iz 3-kloranilina i etil-3-oksopropanoata (shema 3). Prvi dobiveni međuprodukt je etil-(*Z*)-3-((3-klorfenil)amino)akrilat koji pod utjecajem visokih temperatura ciklizira u 7-klorokinolin-4-ol koji u prisutnosti POCl<sub>3</sub> prelazi u 4,7-diklorokinolin.

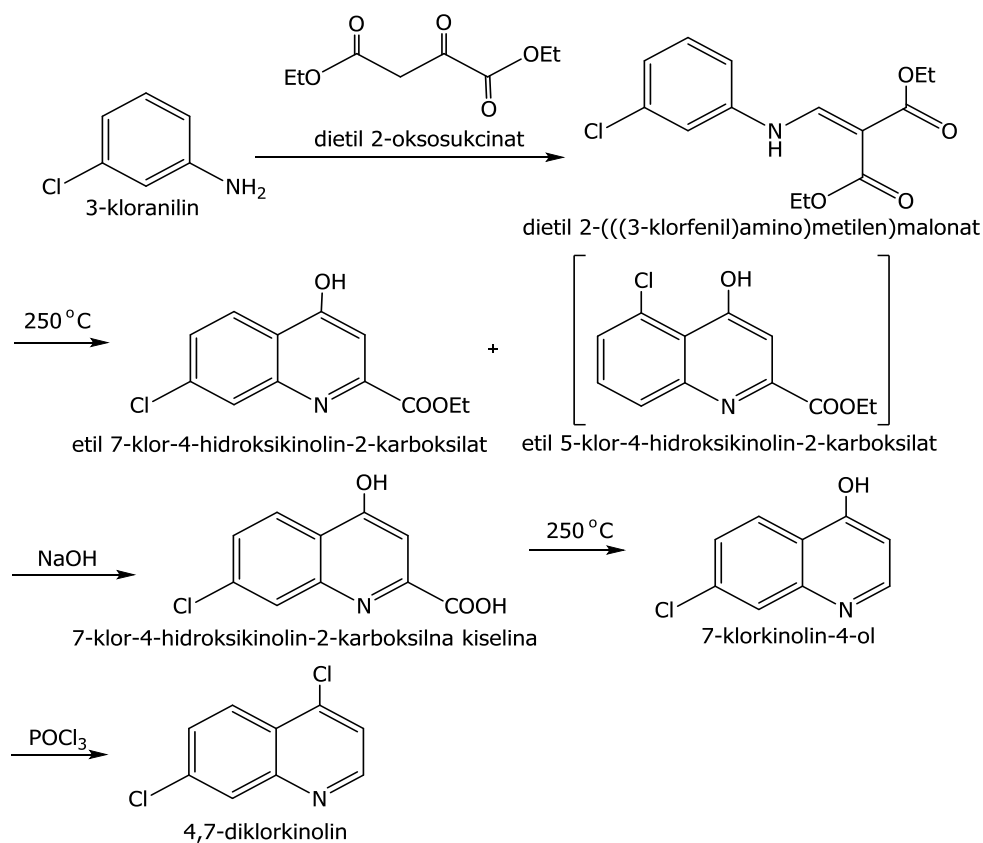


Shema 3. Reakcija dobivanja 4,7-diklorokinolina iz 3-kloranilina i etil-3-oksopropanoata.

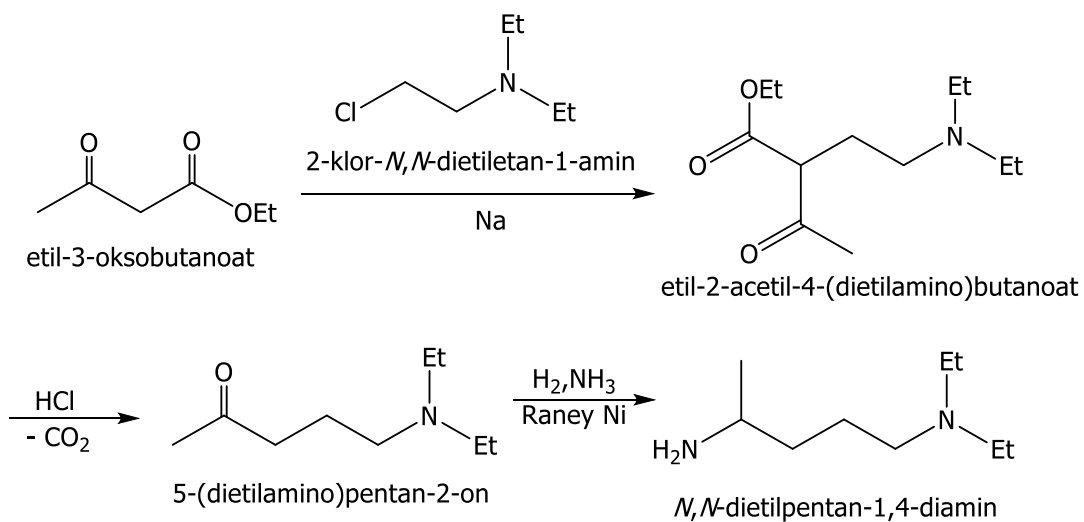
Još jedan način sinteze 4,7-diklorokinolina je reakcija 3-kloranilina sa dietil-2-oksosukcinatom kojom se najprije dobiva dietil-2-(((3-klorfenil)amino)metilen)malonat koji zagrijavanjem pri 250 °C prelazi u etil-7-klor-4-hidroksikinolin-2-karboksilat, uz tvorbu nusprodukta etil-5-klor-4-hidroksikinolin-2-karboksilata koji se od glavnog produkta odvaja kristalizacijom. 4,7-diklorokinolin se u konačnici dobiva alkalnom hidrolizom etil-7-klor-4-hidroksikinolin-2-karboksilata, nakon koje slijedi karboksilacija na visokim temperaturama i reakcija međuprodukta sa POCl<sub>3</sub> (shema 4).

*N,N*-dietilpentan-1,4-diamin koji je također potreban za sintezu klorokina, može se pripraviti na više načina. Jedan od njih uključuje alkiliranje etil-3-oksobutanoata 2-klor-*N,N*-dietiletan-1-aminom, a dobiveni spoj se naziva etil-2-acetil-4-(dietilamino)butanoat. On se podvrgava kiselinskoj hidrolizi i dekarboksilaciji dajući 5-(dietilamino)-pentan-1-amin koji reduktivnom aminacijom uz prisutnost H<sub>2</sub>, amonijaka i katalizatora iz legure Raney-Nikal prelazi u *N,N*-dietilpentan-1,4-diamin (shema 5).





Schema 4. Priprava 4,7-diklorokinolina iz 3-kloranilina i dietil-2-oksosukcinata.



Schema 5. Priprava N,N-dietilpentan-1,4-diamina iz etil-3-oksobutanoata i 2-klor-N,N-dietiletan-1-amina.

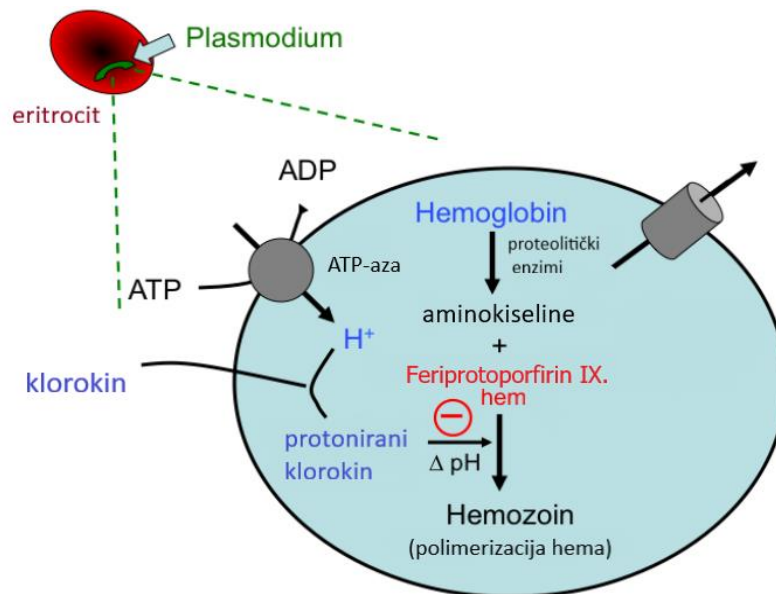
### **2.2.2. Medicinska upotreba klorokina**

Lijek klorokin nalazi se na Listi osnovnih najučinkovitijih i najsigurnijih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije.<sup>38</sup> Dostupan je kao generički lijek koji je bioekvivalentan originalnom lijeku u dozi, neškodljivosti, putu i načinu primjene, kvaliteti i obliku. Također, registriran je na osnovnoj listi lijekova HZZO-a pod generičkim imenom klorokin<sup>39</sup> i isti se nabavlja putem interventnog uvoza. Primarno se koristi za prevenciju i liječenje akutnih oblika malarije. Malarija je zarazna bolest crvenih krvnih stanica koju uzrokuje jednostanični parazit *Plasmodium*. Klorokin uspješno liječi oblike malarije uzrokovane parazitima *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium ovale*. Malarija uzrokovana parazitom *Plasmodium falciparum* ne može se liječiti klorokinom jer je ova vrsta plazmodija razvila otpornost na njegovo djelovanje.<sup>40</sup> Iako je sintetiziran kako bi se koristio kao antimalarik, klorokin dodatno pokazuje imunomodulatorno djelovanje što omogućuje njegovo korištenje i prilikom liječenja autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis i lupus.

### **2.2.3. Biokemijsko i stanično djelovanje klorokina**

Iako postoji nekoliko pretpostavki o njegovoj antivirusnoj i antimalarijskoj aktivnosti, točan mehanizam djelovanja klorokina nije potvrđen. Klorokin i njegovi derivati inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina parazita i time utječu na izvornu funkciju njegove DNA. Inhibicija se postiže povezivanjem klorokina i purinske baze vodikovim vezama te naknadnim uvođenjem molekule klorokina među parove baza u DNA-uzvojnici parazita. Time klorokin sprječava procese transkripcije i translacije te posljedično ograničava sintezu parazitskih nukleinskih kiselina.<sup>35</sup> Klorokin je slaba baza koja može utjecati i na disfunkciju određenih enzima. U izvanstaničnom prostoru, molekula klorokina je uglavnom prisutna u protoniranom obliku i zbog prevladavajućeg pozitivnog naboja nije u mogućnosti proći kroz staničnu membranu inficiranih eritrocita. Međutim, neprotonirani dio molekule može ući u unutarstanični odjeljak gdje biva protoniran jer je neutralni pH stanice manji od pKa-vrijednosti klorokina. Na taj se način molekule klorokina koncentriraju u crvenim krvnim stanicama. Nekolicina molekula ostaje neprotonirana i transportira se u lizosome parazita gdje vladaju kiseli uvjeti. U ovim organelima klorokin također biva protoniran i s vremenom se sve više nakuplja unutar lizosoma.<sup>41</sup> U stanicama eritrocita inficiranih malarijom, trofozoiti koji pripadaju jednoj od faza životnog ciklusa plazmodija, probavljaju hemoglobin i koriste aminokiseline dobivene razgradnjom proteina. Tijekom navedenog procesa dolazi do stvaranja toksičnog hem-nusprodukta feriprotoporfirina IX. U nedostatku klorokina, detoksifikaciju nusprodukta provodi enzim hem-polimeraza koji polimerizira hem u netoksični pigment hemozoin. Ukoliko je klorokin prisutan i koncentriran u lizosomima, on veže hem-nusprodukt

i sprječava njegovu polimerizaciju. Njegov toksični učinak u konačnici rezultira uništenjem parazita (slika 7).<sup>42</sup>



Slika 7. Inaktivacija polimerizacije hema u hemozoin.<sup>43</sup>

Unatoč rasprostranjenom korištenju klorokina od 1950.-ih godina do danas, nije se razvila značajna otpornost na njegovo djelovanje. Naime, funkcija klorokina ne ovisi o njegovoj sposobnosti vezanja na proteine već o njegovom vezanju na feriprotoporfirin IX koji se oslobađa prilikom proteolitičke razgradnje hemoglobina unutar lizosoma prisutnog u trofozoitu. Kako bi se smanjio afinitet vezanja klorokina na molekulu feriprotoporfirina IX, potrebno je promijeniti strukturu molekule. Međutim, parazit na promjenu strukture hema ne može utjecati mutacijom određenih gena i na taj način razviti rezistentnost na lijek. Otpornost se može steći smanjenim nakupljanjem klorokina u lizosomu plazmodija.<sup>44</sup> Ono se postiže višestrukim mutacijama gena koji kodira za transporter klorokina PFCRT (engl. *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*) kod vrste *Plasmodium falciparum*. Takve mutacije su razlog rezistentnosti *Plasmodium falciparum* na klorokin, zbog koje se ovaj agens sve manje koristi za liječenje malarije. S druge strane, niska cijena, tolerancija te imunomodulatorno djelovanje klorokina povezuje se sa njegovim biokemijskim učincima koji upućuju na njegovu potencijalnu uporabu prilikom liječenja virusnih infekcija, čiji simptomi proizlaze iz upalne reakcije imunološkog sustava.

### 2.3. Mehanizmi virusne inhibicije klorokinom

Iako neka od provedenih istraživanja na životinjskim modelima i staničnim kulturama potvrđuju da klorokin ima ljekoviti učinak protiv virusa kao što su niskopatogeni ljudski

koronavirus HCoV-OC43 i SARS-CoV, mehanizam djelovanja klorokina u liječenju virusnih bolesti, uključujući COVID-19, nije u potpunosti poznat.<sup>45</sup> Pretpostavke o antivirusnom djelovanju klorokina uključuju inhibiciju pH-ovisne replikacije virusa, sprječavanje glikozilacije virusnog glikoproteina ovojnice te receptora domaćina, a moguće je i da klorokin inhibira autofagocitozu. Vjerojatno je da klorokin, neovisno o direktnom djelovanju virusa, smanjuje ekspresiju upalnih čimbenika i receptora koji mogu uzrokovati akutni respiratorni distresni sindrom – primarno odgovoran za smrtnost povezanu s koronavirusom.<sup>7</sup>

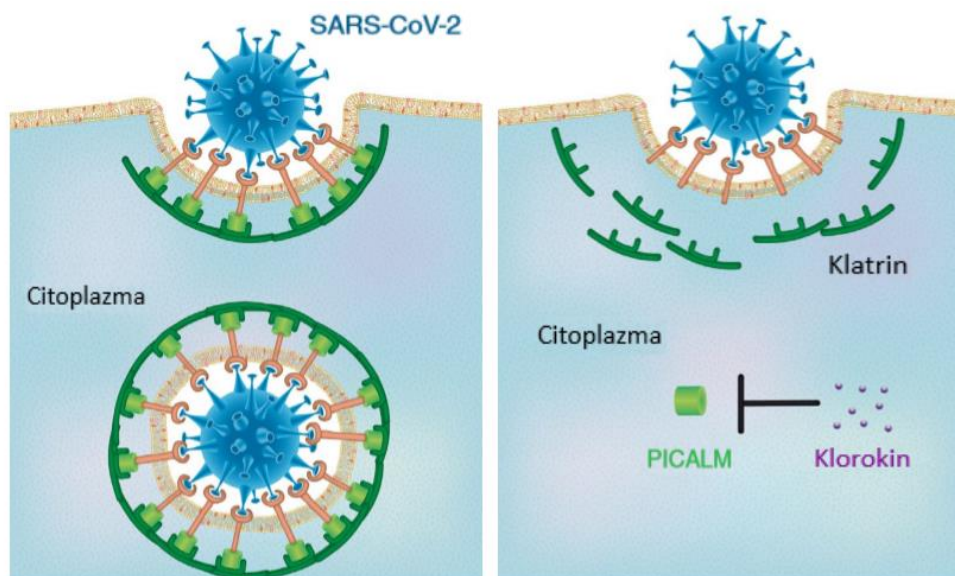
### **2.3.1. Inhibicija endocitoze virusa i sprječavanje glikozilacije**

Klorokin svojim djelovanjem na endocitozu i kasne faze replikacije onemogućava umnožavanje određenih virusa sa ovojnicom. Iz tog razloga, klorokin je korišten u području nanomedicine i to u istraživanjima apsorpcije nanočestica u stanice.<sup>45</sup> Svrha proučavanja interakcije stanica i sintetskih nanočestica u prisutnosti klorokina bila je otkrivanje mogućeg mehanizma djelovanja klorokina prisutnog u fazama koje prethode replikaciji virusa. Točnije, pokušale su se objasniti promjene u staničnoj apsorpciji SARS-CoV-2 koje nastaju zbog utjecaja klorokina.

Pokazalo se da klorokin ima široki spektar djelovanja kao inhibitor endocitoze nanočestica tkivnih makrofaga. Istraživanje provedeno na miševima pokazuje da klorokin smanjuje nakupljanje sintetičkih nanočestica raznih oblika u rasponu veličina od 14-2600 nm unutar staničnih kultura i sistema mononuklearnih fagocita.<sup>46</sup> Istraživanja o mehanizmu djelovanja pokazuju da klorokin reducira ekspresiju PICALM proteina (engl. *phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*). PICALM je citoplazmatski protein koji ima ključnu ulogu prilikom endocitoze posredovane klatrinom (protein koji ima središnju ulogu pri tvorbi vezikula) koja predstavlja važan stanični put unosa receptora i liganda, a mnogi virusi koriste upravo taj put za ulazak u stanicu.<sup>47</sup> SARS-CoV-2 ima sferičan oblik i raspon veličina od 60–140 nm te se prema tim svojstvima može usporediti sa skupinom najčešće istraživanih nanočestica. Zbog toga je moguće da mehanizam djelovanja odgovoran za učinak klorokina na SARS-CoV-2 uključuje smanjenje sposobnosti stanica za provedbu endocitoze posredovane klatrinom uslijed supresije PICALM-a (slika 8).

Poznato je da koronavirusi ulaze u stanicu domaćina pomoću endocitoze posredovane receptorima, točnije vezanjem na ACE 2 receptor, ali i stapanjem s plazmatskom membranom. Klorokin inducira sprječavanje fuzije kasnih endosoma i lizosoma koja služi kao mehanizam prijenosa endocitiranog, odnosno unesenog materijala unutar stanice. Time dolazi do ometanja endocitoznog puta i recikliranja membranskih receptora potrebnih za ulazak SARS-

CoV-2 u stanicu domaćina. Prema ranijim istraživanjima, klorokin u staničnim kulturama ima terapijski učinak protiv SARS-CoV, ali ne mijenja razinu receptora ACE 2 na površini stanice.<sup>48</sup> Međutim, pokazalo se da liječenje klorokinom uzrokuje inhibiciju kinon reduktaze 2, enzima koji sudjeluje u sintezi sijalične kiseline kao ključne komponente za prepoznavanje liganda.<sup>49</sup> Navedena inhibicija naknadno oslabljuje završetak glikozilacije ACE 2 receptora, što može utjecati na vezanje virusa na receptor. Kada ACE 2 nije glikoziliran, njegova interakcija sa S-glikoproteinom postaje manje učinkovita, što posljedično inhibira ulazak SARS-CoV-2 u stanicu. Također, terapijska doza klorokina značajno ne mijenja biosintezu i glikozilaciju glikoproteinskog šiljka SARS-CoV. Nakon ulaska virusa u stanicu pomoću endocitoze, proteaze (uglavnom katepsini koji se aktiviraju prilikom zakiseljavanja endosoma) cijepaju glikoproteinski šiljak na površini virusa. Takvo cijepanje uzrokuje promjenu konformacije glikoproteinskog šiljka koja posljedično omogućuje stapanje stanične membrane i virusne ovojnice. Inhibicija endosomalnog zakiseljavanja potaknuta klorokinom vrlo vjerojatno mijenja proces stapanja membrane i ovojnice što zadržava virus unutar endosoma.



Slika 8. Mehanizam represije PICALM-a klorokinom tijekom ulaska SARS-CoV-2 u stanicu domaćina.<sup>45</sup>

### 2.3.2. Inhibicija autofagocitoze

Autofagocitoza je osnovni stanični katabolički mehanizam koji provodi staničnu razgradnju nepotrebnih ili nefunkcionalnih staničnih dijelova. Tijekom tog procesa određeni citoplazmatski dijelovi izolirani su od ostatka stanice unutar vezikule s dvostrukom membranom – autofagosoma. Autofagosomi se spajaju s lizosomima, nakon čega se njihov sadržaj razgrađuje. Osim u mnogim temeljnim biološkim procesima poput stanične homeostaze i

imunosti, autofagocitoza je uočena u različitim bolestima uključujući infektivne bolesti.<sup>50</sup> Autofagocitoza na životni ciklus i patogenezu virusa može djelovati na dva načina – protuvirusno i provirusno, ovisno o njihovoj vrsti. Protuvirusni učinci autofagocitoze uključuju djelovanje proteina autofagije. Njihova funkcija je prikupljanje virusnih komponenti i samih virusa koje je potrebno razgraditi unutar lizosoma u procesu zvanom ksenofagija. Također, proteini autofagije sudjeluju u pokretanju urođene i stečene imunološke reakcije na virusnu infekciju.<sup>51</sup>

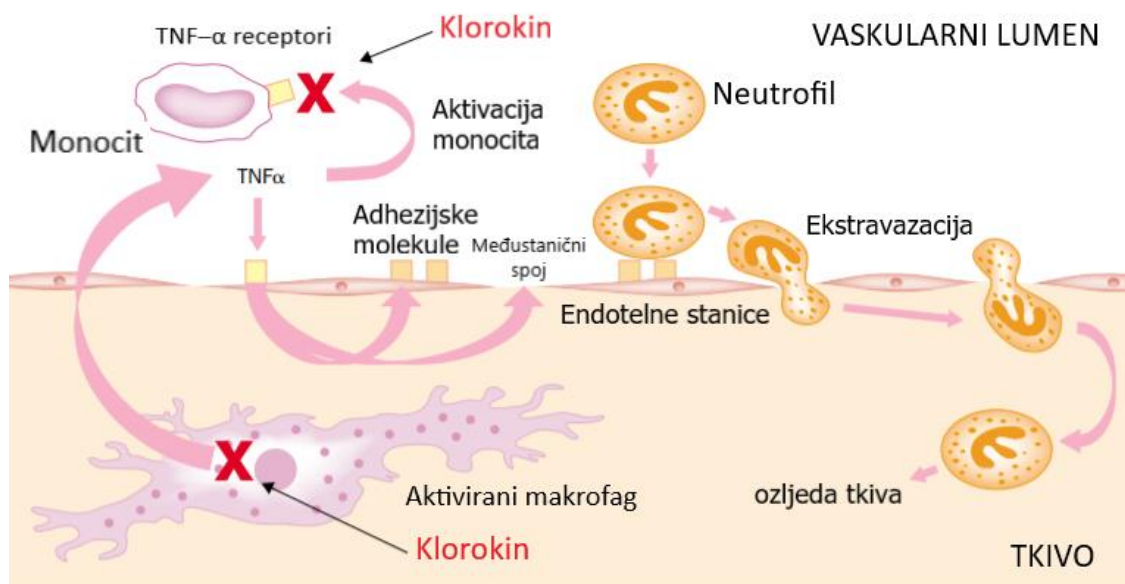
Ovaj proces stanične razgradnje, predložen je i kao mehanizam sastavljanja viriona, koji se odvija tijekom replikacije virusa koji imaju jednolančanu pozitivnu RNA.<sup>52</sup> U tu skupinu virusa pripadaju i koronavirusi kod kojih se tijekom sastavljanja nove virusne čestice stvara vezikula obavijena dvostrukom membranom. Takva vezikula se prema podrijetlu može povezati sa autofagosomima.<sup>52</sup> Također, pokazalo se da infekcija koronavirusom izaziva autofagocitozu koja posljedično služi virusu za proizvodnju staničnih struktura potrebnih za izgradnju membrana tijekom replikacije.

S obzirom na važnost autofagocitoze kod patogeneze virusnih infekcija, potrebno je inhibirati povoljno i poticati destruktivno djelovanje autofagocitoze na životni ciklus virusa. U skladu s tim, provedena su istraživanja koja predstavljaju efektivno djelovanje klorokina na autofagocitozu.<sup>53</sup> Klorokin se, kao slaba baza, nakuplja u organelima obavijenima membranom u kojima vlada niski pH i time mijenja njihovu kiselost. U parazitima koji uzrokuju malariju, klorokin na taj način inaktivira detoksifikaciju hema u hemozoin. Sličan efekt je vidljiv u stanicama sisavaca, kod kojih prisutnost klorokina uzrokuje povećanje pH-vrijednosti lizosoma.<sup>54</sup> Posljedica takve promjene pH je narušavanje ne samo autofagocitoze već i funkcije određenih enzima te inhibicija kovalentnih preinaka novonastalih proteina koje dolaze nakon translacije. Navedeno djelovanje klorokina, zabilježeno je kod određenih RNA virusa, uključujući i koronavirus.<sup>55</sup>

### **2.3.3. Represija proupalnih čimbenika**

Osim direktnog antivirusnog djelovanja na SARS-CoV-2, klorokin utječe i na imunوسي odgovor domaćina. Prilikom infekcije koronavirusom, dolazi do proizvodnje velike količine proupalnih citokina koji posljedično izazivaju pojačani imunوسي odgovor i dovode do težih oblika bolesti. Klorokin reducira lučenje proupalnih citokina od kojih se izdvajaju faktor tumorske nekroze TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6.<sup>56</sup> Iz tog razloga, nakupljanje klorokina u limfocitima i makrofagima djeluje protuupalno. Inhibicija proizvodnje TNF- $\alpha$  uzrokovana klorokinom uključuje nekoliko mehanizama: poremećaj stanične homeostaze željeza,<sup>57</sup> inhibicija

ekspresije gena za proizvodnju TNF- $\alpha$ <sup>58</sup> te inhibicija posttranslacijske modifikacije molekule TNF- $\alpha$ .<sup>59</sup> Osim na redukciju lučenja TNF- $\alpha$ , klorokin djeluje i na smanjenje površinske ekspresije TNF- $\alpha$  receptora u stanicama monocita. Funkcije TNF- $\alpha$  uključuju poticanje aktivacije monocita te ekstravazaciju neutrofila otvaranjem međustaničnog spoja između vaskularnih endotelnih stanica i adhezijskih molekula\* na leukocitima (slika 9).



Slika 9. Utjecaj klorokina na imunološki sustav.<sup>29</sup>

## 2.4. Djelotvornost klorokina u liječenju COVIDA-19

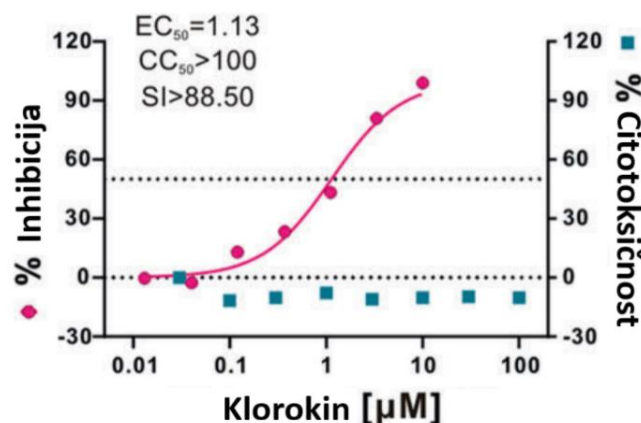
Brzi razvoj i odobrenje učinkovitih i sigurnih lijekova protiv bolesti COVID-19 trenutačno je najveći prioritet svih zdravstvenih institucija. Najbitnije je provođenje znanstvenih ispitivanja i dobivanje pouzdanih podataka temeljem kojih bi se mogle pružiti odgovarajuće preporuke zdravstvenim radnicima i oboljelima te omogućiti donošenje regulatornih mjera u borbi protiv bolesti.<sup>61</sup> Među lijekovima kojima se unutar kliničkih istraživanja ocjenjuju sigurnost primjene i učinkovitost nalazimo klorokin i njegove derivate. Do srpnja 2020. godine, globalno je zabilježeno 80 kliničkih istraživanja koja su ispitala utjecaj klorokina na SARS-CoV-2.<sup>62</sup>

\*Adhezijske molekule su proteini na staničnoj površini čija je uloga međusobno povezivanje stanica – homotropno i heterotropno, te povezivanje stanica s elementima izvanstaničnog matriksa. Homotropna adhezija je međusobno povezivanje istovrsnih stanica koje se događa npr. pri adheziji trombocita u procesu stvaranja ugruška. Heterotropna adhezija je međusobno povezivanje različitih vrsta stanica, a primjer za to je vezanje neutrofila za endotel krvnih žila.<sup>60</sup>

U jednom od ranijih istraživanja ispitala se antivirusna aktivnost pet lijekova koje odobrava Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*).<sup>63</sup>

Istraživanje je uključivalo ribavirin, penciklovir, nitazoksanid, nafamostat, klorokin, remdesivir i favipiravir, a provodilo se *in vitro*. Kako bi se utvrdila djelotvornost ovih spojeva na citotoksičnost te raširenost i otpornost virusa, provodili su se neki od standardnih testova. Citotoksičnost ispitivanih spojeva određivala se CCK 8 kolorimetrijskom metodom (engl. *Cell Counting Kit-8*) u Vero E6 stanicama. Nakon toga su Vero E6 stanice inficirane s nCoV2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019 – tipom SARS-CoV-2 izoliranog u Wuhanu, a broj virusa po stanici (MOI, engl. *Multiplicity of Infection*) iznosio je 0,05. Tijekom testiranja stanice su tretirane dimetilsulfoksidom (DMSO). Učinkovitost je ispitana Real-Time PCR metodom koja omogućava praćenje tijekom reakcije u svakom ciklusu, promjenama fluorescencijskog signala koje stvaraju DNA-vezujuće boje ili specifične fluorescentno obilježene probe. Konkretno za ovo istraživanje, korišten je esej kvantifikacije virusnih kopija. Dokazivanje ispitane učinkovitosti provedeno je vizualizacijom virusnog nukleoproteina (NP) imunofluorescentnom mikroskopijom, 48 sati nakon infekcije.

Dobiveni rezultati pokazuju da klorokin sprječava infekciju koronavirusom pri malim mikromolarnim koncentracijama - srednja učinkovita koncentracija ( $EC_{50}$ ) iznosila je 1,13  $\mu\text{M}$ , a 50%-tna citotoksična koncentracija ( $CC_{50}$ ) bila je veća od 100  $\mu\text{M}$ . Također, utvrđeno je da klorokin ima dobru moć prodiranja u tkiva te radi toga povoljno djeluje na smanjenje umnožavanja virusa. Unutar ovog istraživanja također se spominje da klorokin blokira infekciju povećanjem pH-vrijednosti endosoma i utjecajem na glikozilaciju staničnih receptora za SARS-CoV-2. Osim navedenih tvrdnji, znanstvenici iznose pretpostavku koja se odnosi na mogućnost povećanja antivirusnog djelovanja klorokina *in vivo* (slika 10).



Slika 10. Antiviralna aktivnost klorokina protiv 2019-nCoV *in vitro*. Lijeva i desna y-os na grafu označavaju srednji postotak inhibicije virusa i srednji postotak citotoksičnosti klorokina.<sup>63</sup>

Brojna istraživanja provedena su kasnije u Kini, gdje se unutar više od 10 kliničkih ispitivanja ispitivala djelotvornost i sigurnost klorokina u liječenju COVIDA-19,<sup>64</sup> a rezultati



dobiveni kod više od 100 pacijenata pokazali su da klorokin uspješno inhibira pogoršanje pneumonije, poboljšava RTG-nalaze pluća i skraćuje trajanje bolesti. Ozbiljnije nepoželjne reakcije na klorokin nisu zabilježene kod pacijenata na kojima se istraživanje provodilo.

Preporuke za korištenje klorokina prilikom liječenja COVIDA-19 donesene su konsenzusom 20. veljače 2020. godine i to na temelju prijedloga stručnjaka iz Odjela za znanost i tehnologiju te Zdravstvene komisije kineske pokrajine Guangdong.<sup>5</sup> Uzimajući u obzir provedena *in vitro* istraživanja i klinička ispitivanja, preporučeno je korištenje određenih mjera opreza koje uključuju krvne pretrage, kako bi se na vrijeme uočile eventualne nuspojave – razvoj anemije, trombocitopenije ili leukopenije, kao i poremećaj koncentracije elektrolita u krvnom serumu.

#### **2.4.1. Pojava mogućih nuspojava tijekom liječenja COVIDA-19 klorokinom**

Klinička ispitivanja protuvirusnih lijekova i dalje su u tijeku kako bi se mogli ustanoviti pouzdani podaci o djelotvornosti i sigurnosti primjene tih lijekova u liječenju COVIDA-19. Stoga je važno da zdravstveni radnici, ali i bolesnici primjenjuju klorokin u skladu s odobrenjem za stavljanje lijeka u promet i određenim nacionalnim smjernicama. Također, ovaj lijek se ne smije primjenjivati bez odgovarajućeg recepta i liječničkog nadzora, jer tijekom liječenja većim dozama klorokina ili primjene klorokina u kombinaciji s drugim lijekovima može doći do ozbiljnih nuspojava.<sup>65,67</sup> Zbog trenutne epidemiološke situacije, i dalje postoji određeni pritisak na zdravstveni sustav. Neke države su uspostavile stroge protokole koji omogućavaju eksperimentalnu primjenu odobrenih antivirusnih lijekova kod bolesnika s težim oblikom bolesti. U RH, HZZO i Ministarstvo zdravstva izdaju naputak o ograničenom propisivanju i izdavanju lijekova u vrijeme epidemije COVID-19.

Europska agencija za lijekove (EMA) objavila je upozorenje koje se odnosi na moguće nuspojave klorokina tijekom liječenja COVIDA-19.<sup>67</sup> Navedeno je da klorokin potencijalno uzrokuje aritmiju, odnosno poremećaj srčanog ritma, koja se kod istodobne primjene s drugim lijekovima može pogoršati. U nedavno provedenim ispitivanjima<sup>68</sup> utvrđeni su ozbiljni poremećaji srčanog ritma tijekom primjene klorokina u visokim dozama ili u kombinaciji s antibiotikom azitromicinom koji slično djeluje na srce. Prilikom propisivanja klorokina, zdravstveni radnici trebaju uzeti u obzir postojeće poremećaje rada srca kod pacijenta i promjenu razine kalija ili magnezija u krvi, budući da navedeni čimbenici povećavaju mogućnost razvoja poremećaja srčanog ritma. Osim nuspojava koje utječu na srce, poznato je da ovi lijekovi mogu uzrokovati neuropsihijatrijske poremećaje poput uznemirenosti, nesanice, smetenosti, psihoze i suicidalnih misli. Ovi lijekovi mogu utjecati i na funkciju jetre, uzrokovati oštećenje živčanih stanica koje može dovesti do konvulzija te sniziti razinu šećera

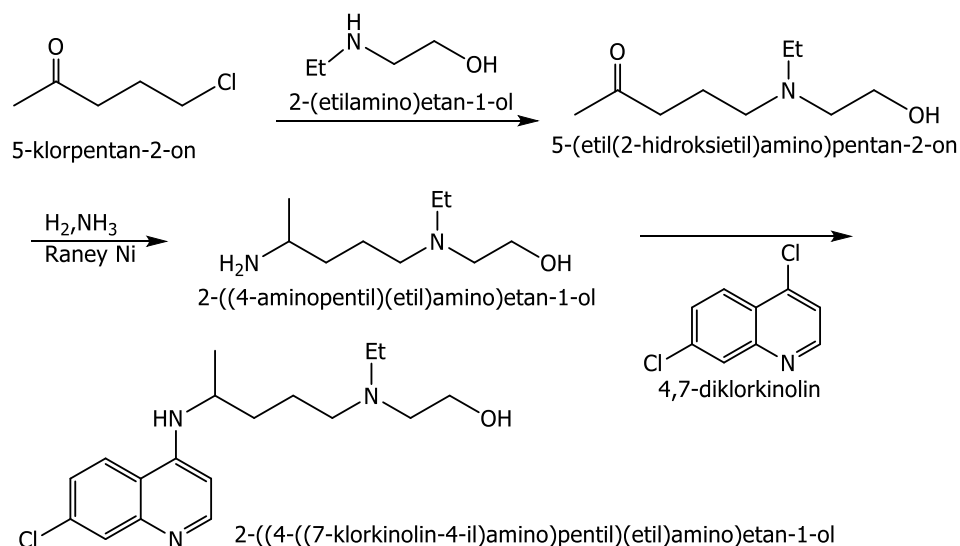
u krvi (hipoglikemija).<sup>33</sup> Klorokin se treba primjenjivati za liječenje bolesti COVID-19 samo pod strogim nadzorom u kliničkim ispitivanjima ili u sklopu programa milosrdnog davanja lijeka. Kako bi se dobili pouzdani i konkretni podaci o riziku primjene klorokina u liječenju bolesti COVID-19, potrebno je provesti daljnja klinička ispitivanja.

## 2.5. 4-Hidroksiklorokin

### 2.5.1. Sinteza hidroksiklorokina

Hidroksiklorokin-sulfat je derivat klorokina sintetiziran po prvi put 1946. godine uvođenjem hidroksilne skupine u molekulu klorokina. Hidroksiklorokin se primjenjuje kao lijek koji djeluje na staničnoj razini i izravno utječe na uzročnike bolesti.

Mehanizam sinteze hidroksiklorokina podijeljen je u tri koraka (shema 6). Prvi korak uključuje reakciju 5-klorpentan-2-ona i 2-(etilamino)etan-1-ola kojom nastaje odgovarajući aminoketon. U drugom koraku, dobiveni 5-(etil(2-hidroksietil)amino)pentan-2-on podvrgava se reduktivnoj aminaciji uz prisutnost H<sub>2</sub>, amonijaka i katalizatora iz legure Raney-Nikal, a kao produkt nastaje 2-((4-aminopentil)(etil)amino)etan-1-ol. Zadnji korak uključuje reakciju prethodno dobivenog spoja i 4,7-diklorokinolina čime se kao konačni produkt dobiva hidroksiklorokin, odnosno 2-((4-((7-klorokinolin-4-il)amino)pentil)(etil)amino)etan-1-ol.<sup>36</sup>

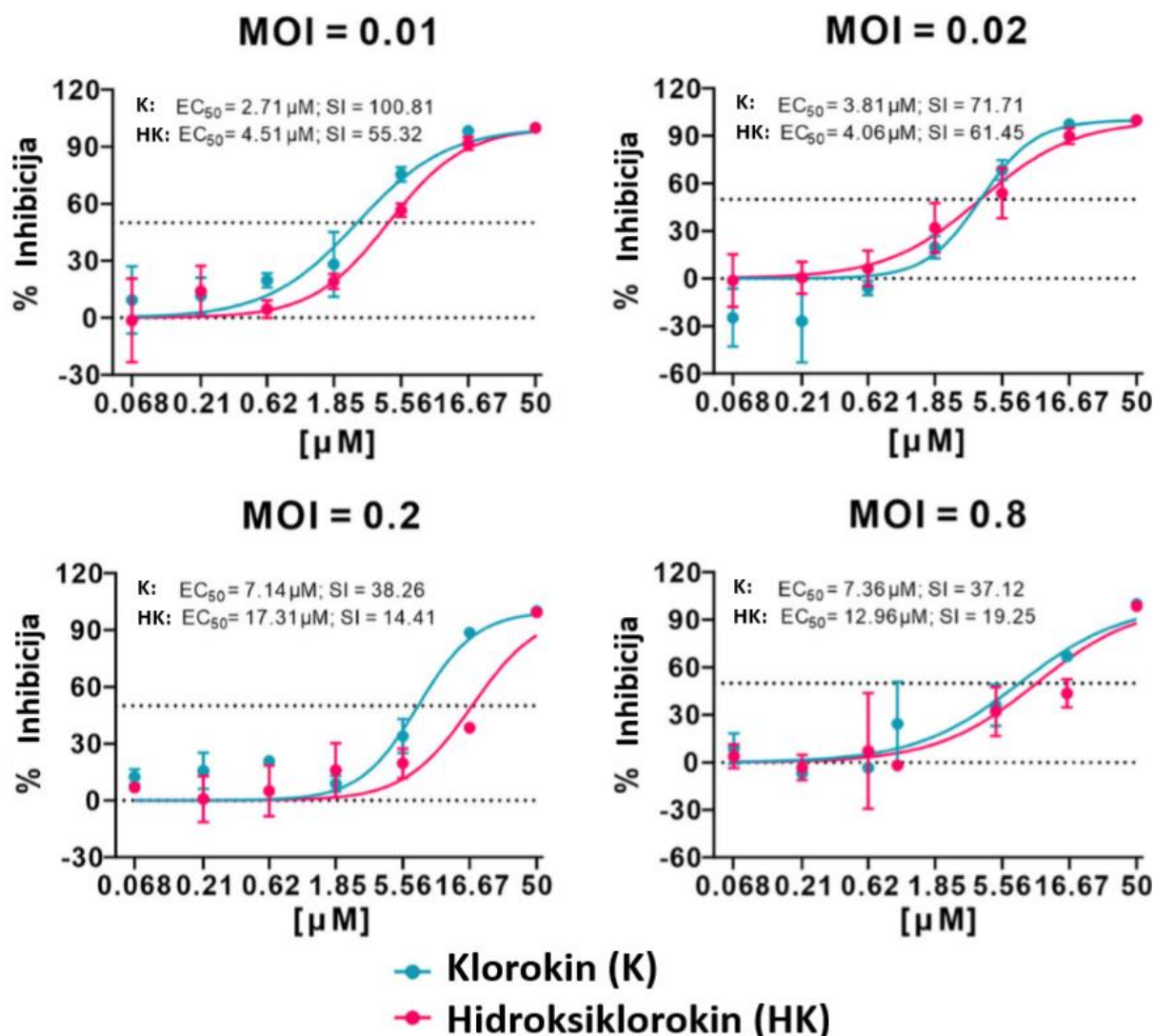


Shema 6. Priprava hidroksiklorokina iz 5-klorpentan-2-ona i 2-(etilamino)etan-1-ola.

### 2.5.2. Djelotvornost hidroksiklorokina u liječenju COVIDA-19

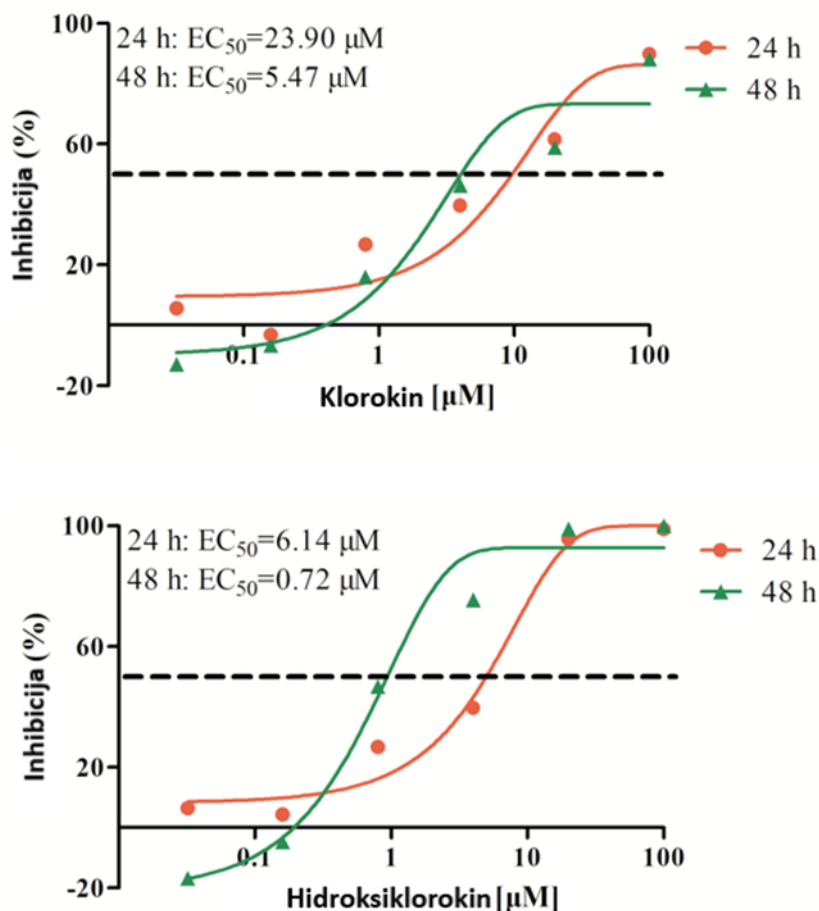
Hidroksiklorokin se kao i klorokin koristi za liječenje akutnih oblika malarije koje uzrokuju *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* i *P. falciparum*. Koristi se i prilikom liječenja autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis (RA) i sistemski eritemski lupus (SLE).<sup>54</sup> Učinkovitost i sigurnost je također slična klorokinu, međutim hidroksiklorokin ima bolju podnošljivost i do 40% manju toksičnost kod životinja u usporedbi sa klorokinom. Mehanizam djelovanja hidroksiklorokina uključuje inhibiciju virusnih enzima kao što su virusna DNA ili RNA polimeraza. Obuhvaćena je i inhibicija nekih faza životnog ciklusa virusa – glikozilacija virusnih proteina, sastavljanje viriona, transport nove virusne čestice te otpuštanje virusa iz inficirane stanice. Drugi mehanizmi djeluju na inhibiciju ACE 2 receptora i uzrokuju zakiseljavanje.<sup>44</sup> Naime, hidroksiklorokin i klorokin su lipofilne slabe baze koje pasivno difundiraju kroz stanične membrane te na taj način ulaze u endosome, lizosome i Golgijeve mjehuriće gdje povišuju pH-vrijednost.<sup>63</sup> Navedeni porast pH-vrijednosti unutar endosoma sprječava ulazak virusne čestice u stanicu pomoću fuzije.<sup>44</sup> S obzirom na sličnost kemijske strukture i mehanizma protuvirusnog djelovanja koji između ostalog uključuje imunomodulaciju, hidroksiklorokin se također razmatra kao potencijalno učinkovita terapija za liječenje bolesti COVID-19. Klorokin i hidroksiklorokin trenutačno se klinički ispituju u liječenju bolesti COVID-19, no podaci dobiveni kliničkim ispitivanjima su vrlo ograničeni te se ne mogu donijeti konačni zaključci o primjeni ovih lijekova.

Provedena je evaluacija protuvirusnog djelovanja hidroksiklorokina na SARS-CoV-2 *in vitro*, u usporedbi sa protuvirusnim djelovanjem klorokina (slika 11).<sup>69</sup> Istraživanje je uključivalo usporedbu citotoksičnosti klorokina i hidroksiklorokina, a mjerenje se provodilo CCK 8 kolorimetrijskom metodom u Vero E6 stanicama. Dobiveni su rezultati 50%-tne citotoksične koncentracije (CC<sub>50</sub>) spojeva, čije su vrijednosti iznosile 273.20 i 249.50 μM. Kako bi se bolje usporedila protuvirusna aktivnost ovih spojeva, provedena analiza uključivala je i kvantifikaciju virusnih RNA kopija u supernatantu stanične kulture 48 h nakon provedene infekcije. Kvantifikacija se provodila pri četiri različite MOI-vrijednosti (0.01, 0.02, 0.2, 0.8). Kod svih MOI-vrijednosti, srednja učinkovita koncentracija (EC<sub>50</sub>) za klorokin (2.71, 3.81, 7.14, 7.36 μM) bila je niža od one za hidroksiklorokin (4.51, 4.06, 17.31, 12.96 μM). Seleksijski indeks (SI=CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) klorokina (100.81, 71.71, 38.26, 37.12) posljedično je bio veći od onog za hidroksiklorokin (55.32, 61.45, 14.41, 19.25) (slika 11) Dobiveni rezultati potvrđeni su provedbom imunofluorescentne mikroskopije virusnog nukleoproteina (NP) 48 h nakon infekcije. Na temelju provedenog ispitivanja, zaključuje se da hidroksiklorokin pri određenim MOI-vrijednostima, ima slabiju djelotvornost na SARS-CoV-2 u odnosu na klorokin.



Slika 11. Usporedba antiviralne aktivnosti klorokina i hidroksiklorokina protiv SARS-CoV-2 *in vitro* pri različitim MOI vrijednostima.<sup>69</sup>

Antivirusna i profilaktička aktivnost klorokina i hidroksiklorokina protiv SARS-CoV-2 *in vitro*, provedena je unutar sličnog istraživanja na Vero E6 stanicama (slika 12).<sup>70</sup> Za oba lijeka koristilo se fiziološki bazirano farmakokinetičko (PBPK) modeliranje. Tijekom PBPK modeliranja korišteno je pet različitih doza hidroksiklorokina kako bi se otkrio najučinkovitiji režim liječenja. Prilikom ispitivanja antivirusne aktivnosti, Vero E6 stanice zaražene su brojem virusa po stanici (MOI) koji je iznosio 0.01 tijekom 24 i 48 h, dok su koncentracije klorokina i hidroksiklorokina iznosile 0.032, 0.16, 0.80, 4, 20 i 100  $\mu\text{M}$ .



Slika 12. Antiviralna aktivnost klorokina i hidroksiklorokina protiv SARS-CoV-2 *in vitro*, pri MOI=0,01 tijekom 24 i 48 h.<sup>70</sup>

Rezultati pokazuju da oba lijeka imaju dobru antivirusnu aktivnost protiv SARS-CoV-2, s obzirom da ovisno o koncentraciji smanjuju replikaciju virusa.  $EC_{50}$ -vrijednost klorokina za 24 h iznosila je 23,9  $\mu\text{M}$ , a za 48 h 5,47  $\mu\text{M}$ .  $EC_{50}$ -vrijednost hidroksiklorokina za 24 h iznosila je 6,14  $\mu\text{M}$ , a za 48 h 0,72  $\mu\text{M}$ . U skladu s rezultatima, hidroksiklorokin ( $EC_{50} = 0,72 \mu\text{M}$ ) u odnosu na klorokin ( $EC_{50} = 5,47 \mu\text{M}$ ) ima puno jače djelovanje *in vitro*. Na temelju rezultata PBPK modeliranja, preporuča se režim liječenja bolesti COVID-19 koji obuhvaća 400 mg udarne doze hidroksiklorokin-sufata dva puta dnevno, nakon čega slijedi 200 mg doze održavanja dva puta dnevno u trajanju od četiri dana. Navedeni režim liječenja postigao je tri puta veću učinkovitost od terapije koja je uključivala 500 mg klorokin-fosfata dva puta dnevno u trajanju od 5 dana, što dovodi do zaključka da je hidroksiklorokin pogodniji za liječenje COVIDA-19.

Postoji jako veliki broj globalno zabilježenih istraživanja koja ispituju samostalno djelovanje klorokina i hidroksiklorokina, ali i učinkovitost ovih spojeva u kombinaciji s drugim lijekovima. Istraživanje provedeno u Francuskoj 20. ožujka 2020. godine obuhvaćalo je terapiju primijenjenu na 42 pacijenta oboljelih od COVIDA-19.<sup>71</sup> Skupina od 26 pacijenata liječena je hidroksiklorokinom, a preostalih 16 pacijenata primalo je standardu terapiju. Dvadeset pacijenata koji su oralno dobivali 200 mg hidroksiklorokina svakih 8 sati, pokazivali su bolji napredak u usporedbi sa pacijentima na standardnoj terapiji. Sličan rezultat uočen je i prilikom istraživanja provedenog u Kini na 62 pacijenta s blažim oblikom bolesti COVID-19.<sup>72</sup> Pacijenti su podijeljeni na dvije jednake skupine od kojih je prva skupina liječena klorokinom, dok je druga primala placebo. Liječenje hidroksiklorokinom je kod 31 pacijenta rezultiralo puno bržim spuštanjem tjelesne temperature i prestankom kašlja, a kod većine je uzrokovalo i poboljšanje CT-snimke prsnog koša.

Svjetska zdravstvena organizacija je 17. lipnja 2020. godine objavila publikaciju u kojoj su opisane recentne spoznaje o sigurnosti i učinkovitosti primjene hidroksiklorokina i klorokina u liječenju COVID-19.<sup>73</sup> U zaključku publikacije navodi se da su raspoloživi dokazi o djelotvornosti i sigurnosti hidroksiklorokina prilikom liječenja COVIDA-19 ograničeni i upitne valjanosti. U usporedbi sa standardnim terapijama, liječenje hidroksiklorokinom nije izazvalo odstupanje ukupne smrtnosti. Postoje i pretpostavke da hidroksiklorokin inducira nepovoljne pojave koje tijekom liječenja standardnim terapijama nisu prisutne. Međutim, vjerodostojnost postojećih dokaza je i dalje sporna te je stoga potrebno situaciji pristupati oprezno.

### 3. ZAKLJUČAK

- Točan mehanizam djelovanja klorokina i hidroksiklorokina u liječenju virusnih bolesti, uključujući COVID-19, nije u potpunosti potvrđen. Pretpostavke o antivirusnom djelovanju ovih lijekova uključuju inhibiciju pH-ovisne replikacije virusa, sprječavanje glikozilacije virusnog glikoproteina ovojnice te receptora domaćina i inhibiciju autofagocitoze. Također, vjerojatno je da smanjuju ekspresiju upalnih čimbenika i receptora koji uzrokuju ozbiljniji oblik bolesti COVID-19.
- Postoji velik broj kliničkih ispitivanja i laboratorijskih istraživanja koja se bave učinkovitošću klorokina i hidroksiklorokina prilikom liječenja COVIDA-19, kao i sigurnošću dugotrajne uporabe ovih lijekova u kliničkoj praksi.
- Djelotvornost u liječenju bolesti COVID-19 još nije dokazana, a za donošenje zaključaka potrebna su daljnja laboratorijska i klinička ispitivanja. Također, za optimizaciju profilaktičkog i/ili terapijskog učinka klorokina i hidroksiklorokina protiv COVIDA-19 s obzirom na populaciju bolesnika, stadij bolesti i doziranje lijekova, potrebno je provesti dodatna znanstvena istraživanja kojima će se utvrditi točni mehanizmi djelovanja navedenih lijekova na SARS-CoV-2.
- Tijekom daljnje evaluacije, klorokin i hidroksiklorokin smiju se primjenjivati za liječenje bolesti COVID-19 samo pod strogim nadzorom u kliničkim ispitivanjima ili u sklopu programa milosrdnog davanja lijeka. Prilikom propisivanja ovih lijekova, trebaju se uzeti u obzir moguće nuspojave, pogotovo kod primjene viših doza klorokina i hidroksiklorokina u odnosu na preporučene doze, ili ako se navedeni lijekovi primjenjuju uz određene antibiotike poput azitromicina.

## 4. LITERATURA

- (1) Guo Y. R., Cao Q. D., Hong Z. S., Tan Y. Y., Chen S. D., Jin H. J., Tan K. S., Wang D. Y., Yan Y. (2020) The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Medical Research* **7**: 1 – 10.
- (2) World Health Organization (2020) *WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard*, <<https://covid19.who.int/>> Pristupljeno 1. srpnja 2020.
- (3) Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2020) *Koronavirus – najnoviji podatci*, <<https://www.koronavirus.hr/>> Pristupljeno 1. srpnja 2020.
- (4) Banerjee A., Kulcsar K., Misra V., Frieman M., Mossman K. (2019) Bats and Coronaviruses. *Viruses* **11**: 1 – 15.
- (5) Cortegiani A., Ingoglia G., Ippolito M., Giarratano A., Einav S. (2020) A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *Journal of critical care* **57**: 279 – 283.
- (6) Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W. J., Wang D., Xu W., Holmes E. C., Gao G. F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* **395**: 565 – 574.
- (7) Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G. F., Tan W., China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine* **382**: 727 – 733.
- (8) Yin Y., Wunderink R. G. (2018) MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* **23**: 130 – 137.
- (9) World Health Organization (2020) *SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)*, <<https://www.who.int/ith/diseases/sars/en/>> Pristupljeno 15. lipnja 2020.
- (10) World Health Organization (2019) *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*, <<https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>> Pristupljeno 15. lipnja 2020.
- (11) Zhou P., Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H. R., Zhu Y., Li B., Huang C. L., Chen H. D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R. D., Liu M. Q., Chen Y., Shen X. R., Wang X., Zheng X. S., Zhao K., Chen Q. J., Deng F., Liu L. L., Yan B., Zhan F. X., Wang Y. Y., Xiao G. F., Shi Z. L. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**: 270 – 273.



- (12) Xiu S., Dick A., Ju H., Mirzaie S., Abdi F., Cocklin S., Zhan P., Liu X. (2020) Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities. *Journal of medicinal chemistry*
- (13) de Wilde A. H., Snijder E. J., Kikkert M., van Hemert M. J. (2018) Host Factors in Coronavirus Replication. *Current topics in microbiology and immunology* **419**: 1 – 42.
- (14) Cui J., Li F., Shi Z. L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology* **17**: 181 – 192.
- (15) Shereen M. A., Khan S., Kazmi A., Bashir N., Siddique R. (2020) COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research* **24**: 91 – 98.
- (16) Neuman B. W., Kiss G., Kunding A. H., Bhella D., Baksh M. F., Connelly S., Droese B., Klaus J. P., Makino S., Sawicki S. G., Siddell S. G., Stamou D. G., Wilson I. A., Kuhn P., Buchmeier M. J. (2011) A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of structural biology* **174**: 11 – 22.
- (17) Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2020) *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*, <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=64778>> Pristupljeno 15. srpnja 2020.
- (18) Zhou B., Liu J., Wang Q., Liu X., Li X., Li P., Ma Q., Cao C. (2008) The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1alpha. *Journal of virology* **82**: 6962 – 6971.
- (19) Anonymous (2020) *Schematic representation of a coronavirus*, <<https://www.dectris.com/landing-pages/science-in-the-time-of-corona/>> Pristupljeno 18. lipnja 2020.
- (20) Lai M. M., Cavanagh D. (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research* **48**: 1 – 100.
- (21) Wrapp D., Wang N., Corbett K. S., Goldsmith J. A., Hsieh C. L., Abiona O., Graham B. S., McLellan J. S. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **367**: 1260 – 1263.
- (22) He Y., Zhou Y., Liu S., Kou Z., Li W., Farzan M., Jiang S. (2004) Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochemical and biophysical research communications* **324**: 773 – 781.
- (23) Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T. S., Herrler G., Wu N. H., Nitsche A., Müller M. A., Drosten C., Pöhlmann S. (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**: 271 – 280.

- (24) Shirato K., Kawase M., Matsuyama S. (2013) Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *Journal of virology* **87**: 12552 – 12561.
- (25) Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske (2020) *Koronavirus i mjere prevencije*, <<https://zdravlje.gov.hr/corona-virus-i-mjere-prevencije/4952>> Pristupljeno 24. lipnja 2020.
- (26) Guan W. J., Ni Z. Y., Hu Y., Liang W. H., Ou C. Q., He J. X., Liu L., Shan H., Lei C. L., Hui D. S. C., Du B., Li L. J., Zeng G., Yuen K. Y., Chen R. C., Tang C. L., Wang T., Chen P. Y., Xiang J., Li S. Y., Wang J. L., Liang Z. J., Peng Y. X., Wei L., Liu Y., Hu Y. H., Peng P., Wang J. M., Liu J. Y., Chen Z., Li G., Zheng Z. J., Qiu S. Q., Luo J., Ye C. J., Zhu S. Y., Zhong N. S. (2020) Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* **382**: 1708 – 1720.
- (27) Catanzaro M., Fagiani F., Racchi M., Corsini E., Govoni S., Lanni C. (2020) Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal transduction and targeted therapy* **5**: 1 – 10.
- (28) Prompetchara E., Ketloy C., Palaga T. (2020) Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific journal of allergy and immunology* **38**: 1 – 9.
- (29) Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D. S. (2020) Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*
- (30) Chen C., Zhang X. R., Ju Z. Y., He W. F. (2020) Advances in the Research of Mechanism and Related Immunotherapy on the Cytokine Storm Induced by Coronavirus Disease 2019. *Zhonghua shao shang za zhi = Zhonghua shaoshang zazhi = Chinese journal of burns* **36**: 471 – 475.
- (31) U.S. Food and Drug Administration (2019) *Influenza (Flu) Antiviral Drugs and Related Information*, <<https://www.fda.gov/drugs/information-drug-class/influenza-flu-antiviral-drugs-and-related-information>> Pristupljeno 29. lipnja 2020.
- (32) L G., De Clercq E. (2020) Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nature reviews. Drug discovery* **19**: 149 – 150.
- (33) Smith T., Bushek J., Prosser T. (2020) COVID-19 Drug Therapy – Potential Options. *Clinical Drug Information/Clinical Solutions*.
- (34) Dong L., Hu S., Gao J. (2020) Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug discoveries & therapeutics* **14**: 58 – 60.

- (35) Coatney G. R. (1963) Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **12**: 121 – 128.
- (36) Vardanyan R. S., Hruby V. (2006) Drugs for Treating Protozoan Infections, *Synthesis of Essential Drugs* **10**: 559 – 582.
- (37) Quave C. (2020) *The different chemical structures of quinine and chloroquine*, <<https://theconversation.com/no-cinchona-bark-is-not-a-cure-for-coronavirus-134947>> Pristupljeno 15. srpnja 2020.
- (38) World Health Organization (2020) *WHO Model Lists of Essential Medicines*, <<https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>> Pristupljeno 13. srpnja 2020.
- (39) Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje (2020) *Tražilica za lijekove*, <<https://www.hzzo.hr/trazilica-za-lijekove/>> Pristupljeno 13. srpnja 2020.
- (40) Plowe C. V. (2005) Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence. *Current topics in microbiology and immunology* **295**: 55 – 79.
- (41) Warhurst D. C., Steele J. C., Adagu I. S., Craig J. C., Cullander C. (2003) Hydroxychloroquine is much less active than chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, in agreement with its physicochemical properties. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **52**: 188 – 193.
- (42) Thomé R., Lopes S. C., Cost F. T., Verinaud L. (2013) Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunology letters* **153**: 50 – 57.
- (43) Anonymous (2017) Proposed mechanism of chloroquine mechanism of action in the parasite's food vacuole, <[http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/all\\_antimalarial\\_drugs?do=](http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/all_antimalarial_drugs?do=)> Pristupljeno 04. srpnja 2020.
- (44) Bhattacharjee M. K. (2016) *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*, Springer. str. 184 – 186.
- (45) Hu T. Y., Frieman M., Wolfram J. (2020) Insights from nanomedicine into chloroquine efficacy against COVID-19. *Nature nanotechnology* **15**: 247 – 249.
- (46) Wolfram J., Nizzero S., Liu H., Li F., Zhang G., Li Z., Shen H., Blanc E., Ferrari M. (2017) A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery. *Scientific reports* **7**: 1 – 13.
- (47) Miller S. E., Mathiasen S., Bright N. A., Pierre F., Kelly B. T., Kladt N., Schauss A., Merrifield C. J., Stamou D., Höning S., Owen D. J. (2015) CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. *Developmental cell* **33**: 163 – 175.

- (48) Vincent M. J., Bergeron E., Benjannet S., Erickson B. R., Rollin P. E., Ksiazek T. G., Seidah N. G., Nichol S. T. (2005) Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology journal* **2**: 69.
- (49) Kwiek J. J., Haystead T. A., Rudolph J. (2004) Kinetic mechanism of quinone oxidoreductase 2 and its inhibition by the antimalarial quinolines. *Biochemistry* **43**: 4538 – 4547.
- (50) Wang C. W., Klionsky D. J. (2003) The molecular mechanism of autophagy, *Molecular Medicine*. Str. 65 – 76.
- (51) Kudchodkar S. B., Levine B. (2009) Viruses and autophagy. *Reviews in Medical Virology* **19**: 359 – 378.
- (52) Prentice E., Jerome W. G., Yoshimori T., Mizushima N., Denison M. R. (2004) Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *The Journal of biological chemistry* **279**: 10136 – 10141.
- (53) Golden E. B., Cho H. Y., Hofman F. M., Louie S. G., Schönthal A. H., Chen T. C. (2015) Quinoline-based antimalarial drugs: a novel class of autophagy inhibitors. *Neurosurgical focus* **38**: E12.
- (54) Savarino A., Boelaert J. R., Cassone A., Majori G., Cauda R. (2003) Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *The Lancet*. **3**: 722 – 727.
- (55) Reggiori F., Klionsky D. J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic cell* **1**: 11 – 21.
- (56) Karres I., Kremer J. P., Dietl I., Steckholzer U., Jochum M., Ertel, W. (1998) Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *The American journal of physiology* **274**: R1058 – R1064.
- (57) Picot S., Peyron F., Donadille A., Vuillez J. P., Barbe G., Ambroise-Thomas P. (1993) Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. *Immunology* **80**: 127 – 33.
- (58) Bondeson J., Sundler R. (1998) Antimalarial drugs inhibit phospholipase A2 activation and induction of interleukin 1beta and tumor necrosis factor alpha in macrophages: implications for their mode of action in rheumatoid arthritis. *General pharmacology* **30**: 357 – 366.
- (59) Weber S. M., Levitz S. M. (2000) Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *Journal of immunology* **165**: 1534 – 1540.
- (60) Springer T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, **346**: 425 – 434.

- (61) European Medicines Agency (2020) *Update on treatments and vaccines against COVID-19 under development*, <<https://www.ema.europa.eu/en/news/update-treatments-vaccines-against-covid-19-under-development>> Pristupljeno 04. srpnja 2020.
- (62) U.S. National Library of Medicine (2020), <<https://clinicaltrials.gov/>> Pristupljeno 04. srpnja 2020.
- (63) Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., Shi Z., Hu Z., Zhong W., Xiao G. (2020) Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research* **30**: 269 – 271.
- (64) Gao J., Tia Z., Yang X. (2020) Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Bioscience trends* **14**: 72 – 73.
- (65) Chen C., Wang F., Lin C. (2006) Chronic hydroxychloroquine use associated with qt prolongation and refractory ventricular arrhythmia. *Clinical Toxicology* **44**: 173 – 175.
- (66) Stas P., Faes D., Noyens P. (2008) Conduction disorder and QT prolongation secondary to long-term treatment with chloroquine. *International journal of cardiology* **127**: e80 – e82.
- (67) Borba M., Val F., Sampaio V. S., Alexandre M., Melo G. C., Brito M., Mourão M., Brito-Sousa J. D., Baía-da-Silva D., Guerra M., Hajjar L. A., Pinto R. C., Balieiro A., Pacheco A., Santos J., Jr Naveca F. G., Xavier M. S., Siqueira A. M., Schwarzbald A., Croda J., Nogueira M. L., Romero G. A. S., Bassat Q., Fontes C. J., Albuquerque B. C., Daniel-Ribeiro C. T., Monteiro W. M., Lacerda M. V. G., CloroCovid-19 Team (2020) Chloroquine diphosphate in two different dosages as adjunctive therapy of hospitalized patients with severe respiratory syndrome in the context of coronavirus (SARS-CoV-2) infection: Preliminary safety results of a randomized, double-blinded, phase IIb clinical trial (CloroCovid-19 Study). *medRxiv*.
- (68) Borba M., Val F., Sampaio V. S., Alexandre M., Melo G. C., Brito M., Mourão M., Brito-Sousa J. D., Baía-da-Silva D., Guerra M., Hajjar L. A., Pinto R. C., Balieiro A., Pacheco A., Santos J., Jr Naveca F. G., Xavier M. S., Siqueira A. M., Schwarzbald A., Croda J., Nogueira M. L., Romero G. A. S., Bassat Q., Fontes C. J., Albuquerque B. C., Daniel-Ribeiro C. T., Monteiro W. M., Lacerda M. V. G., CloroCovid-19 Team (2020) Effect of High vs Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA network open*, **3**: e208857 – e208857.

- (69) Liu J., Cao R., Xu M., Wang X., Zhang H., Hu H., Li Y., Hu Z., Zhon W., Wang M. (2020) Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell discovery* **6**: 1 – 4.
- (70) Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P., Liu X., Zhao L., Dong E., Song C., Zhan S., Lu R., Li H., Tan W., Liu D., (2020) In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.
- (71) Gautret P., Lagier J. C., Parola P., Hoang V. T., Meddeb L., Mailhe M., Doudier B., Courjon J., Giordanengo V., Vieira V. E., Dupont H. T., Honoré S., Colson P., Chabrière E., La Scola B., Rolain J. M., Brouqui P., Raoult D. (2020) Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *International journal of antimicrobial agents*, 105949.
- (72) Chen Z., Hu J., Zhang Z., Jiang S., Han S., Yan D., Zhuang R., Hu B., Zhang Z. (2020) Efficacy of Hydroxychloroquine in Patients with COVID-19: Results of a Randomized Clinical Trial. *MedRxiv*.
- (73) World Health Organization (2020.) *Targeted Update: Safety and efficacy of hydroxychloroquine or chloroquine for treatment of COVID-19*, <<https://www.who.int/publications/m/item/targeted-update-safety-and-efficacy-of-hydroxychloroquine-or-chloroquine-for-treatment-of-covid-19>> Pristupljeno 22. lipnja 2020.

## 4. PRILOZI

### Prilog 1. Popis kratica

2019-nCoV	(od engl. <i>2019-novel coronavirus</i> )
3'-UTR	(od engl. <i>Three prime untranslated region</i> )
5'-UTR	(od engl. <i>Five prime untranslated region</i> )
ACE 2	angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (od engl. <i>Angiotensin-converting enzyme2</i> )
AIDS	Stečeni sindrom imunodeficijencije (od engl. <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> )
CC <sub>50</sub>	50%-tna citotoksična koncentracija (od engl. <i>50% cytotoxic concentration</i> )
CCK 8	(od engl. <i>Cell Counting Kit-8</i> )
CD4+	(od engl. <i>Cluster of differentiation 4+</i> )
CD8+	(od engl. <i>Cluster of differentiation 8+</i> )
COVID-19	(od eng. <i>Coronavirus Disease of 2019</i> )
CSF	Faktor stimulacije hematopoetskih kolonija (od engl. <i>Colony-Stimulating Factor</i> )
CT	Računalna tomografija (od engl. <i>Computed tomography</i> )
CTL	Citotoksični T limfociti
DC	dendritičke stanice (od engl. <i>Dendritic cells</i> )
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EC <sub>50</sub>	Srednja učinkovita koncentracija (od engl. <i>Half maximal effective concentration</i> )
EMA	Europska agencija za lijekove (od engl. <i>European Medicines Agency</i> )
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (od engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
HCoV-229E	Ljudski koronavirus 229E (od engl. <i>Human coronavirus 229E</i> )
HCoV-HKU1	Ljudski koronavirus HKU1 (od engl. <i>Human coronavirus HKU1</i> )
HCoV-NL63	Ljudski koronavirus NL63 (od engl. <i>Human coronavirus NL63</i> )
HCoV-OC43	Ljudski koronavirus OC43 (od engl. <i>Human coronavirus OC43</i> )
HZZO	Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje
IFN	Interferon
IL	Interleukin

MERS	Bliskoistočni respiratorni sindrom (od engl. <i>Middle East Respiratory Syndrome</i> )
MERS-CoV	Bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirus (od engl. <i>Middle East Respiratory Syndrome coronavirus</i> )
MOI	Broj virusa po stanici (od engl. <i>Multiplicity of Infection</i> )
mRNA	Glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
NK	Veliki granulirani limfociti (od engl. <i>Natural killer cells</i> )
ORF	otvoreni okvir čitanja (od engl. <i>Open Reading Frame</i> )
PBPK	Fiziološki bazirano farmakokinetičko modeliranje (od engl. <i>Physiologically based pharmacokinetic modelling</i> )
PCR	Polimerazna lančana reakcija (od engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFCRT	(od engl. <i>Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter</i> )
pH	(od lat. <i>potentia hydrogenii</i> )
PICALM	(od engl. <i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i> )
pKa	Negativna vrijednost logaritma konstante disocijacije kiseline
RA	Reumatoidni artritis
RBD	mjesto vezanja receptora (od engl. <i>receptor-binding domain</i> )
RH	Republika Hrvatska
RNA	Ribonukleinska kiselina (od engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RTG	Rentgensko snimanje
SARS	Teški akutni respiratorni sindrom (od engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> )
SARS-CoV	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus (od engl. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> )
SARS-CoV-2	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (od engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2</i> )
SI	Selekcijski indeks (od engl. <i>Selective index</i> )
SLE	Sistemska eritemski lupus
TGF	Transformirajući faktor rasta (od engl. <i>Transforming growth factor</i> )
TMPRSS2	transmembranska serin-proteaza 2 (od engl. <i>Transmembrane Protease Serine 2</i> )
TNF	Faktor tumorske nekroze (od engl. <i>Tumor necrosis factor</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. <i>World Health Organization</i> )



## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Matea Plumić

ime i prezime studenta