

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 2

OSREDNJA TEMA:
VIRUS SARS-COV-2
IN BOLEZEN COVID-19

Praznujemo  let povezovanja.





STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE | PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

FARMACEVTSKI VESTNIK

št. 2 | junij 2020 | letnik 71

ODGOVORNI UREDNIK:
Borut Štrukelj

GLAVNA UREDNICA:
Nina Kočevar Glavač

UREDNIŠKI ODBOR:
Mitja Kos
Janja Marc
Andrijana Tivadar
Matjaž Tuš
Tomaž Vovk
Alenka Zvonar Pobirk

IZDAJATELJSKI SVET:
Mateja Cvirn Novak
Mirjana Gašperlin
Alenka Karničar
Sara Kenda
Janez Ilaš
Nina Pisk
Janez Toni

NASLOV UREDNIŠTVA /
ADDRESS OF THE EDITORIAL OFFICE:
Slovensko farmacevtsko društvo,
Dunajska 184a, 1000 Ljubljana
T.: +386 (01) 569 26 01
Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:
02010-0016686585.

Brez pisnega dovoljenja uredništva Farmacevtskega vestnika so prepovedani reproduciranje, distribuiranje, javna priobčitev, predelava in kakršna koli druga uporaba avtorskega dela ali njegovih delov v kakršnem koli obsegu in postopku kot tudi tiskanje in predelava elektronske oblike.

Izhaja petkrat letno.
Letna naročnina je 70 EUR.
Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM
Fotografija na naslovnici: Shutterstock
Naklada: 3.600 izvodov

Farmacevtski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 5 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society. Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

Farmacevtski vestnik sofinancira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz sredstev državnega proračuna iz naslova razpisa za sofinanciranje domačih znanstvenih periodičnih publikacij.

Epidemija virusa SARS-CoV-2, ki je v zadnjih treh mesecih dodobra vplivala na naš način življenja in navade, je preprečila tudi tradicionalno izvedbo vsakoletnega kongresa SFD v Portorožu. Da ne bi ostali brez vsebine, ki se vedno nanaša na simpozije ob skupščini kongresa, smo se v uredniškem odboru Farmacevtskega vestnika odločili, da v drugi letošnji številki pripravimo pregled vsebin, ki zadevajo bolezen covid-19. Tako je prvi članek namenjen spoznavanju virusa SARS-CoV-2 in poteku bolezni, kolegi s Katedre za klinično biokemijo so pripravili članek o dokazovanju prisotnosti okužbe, nato pa sledijo članek o z dokazi podprtem zdravljenju covid-19 z zdravili in dva članka o razvoju eksperimentalnih zdravilnih učinkovin proti covid-19 ter podpornem zdravljenju in preprečevanju okužb s SARS-CoV-2. Prav tako je pomembno blažiti vnetne procese, ki nastajajo med potekom covid-19, o čemer piše članek z naslovom »Blaženje sindroma sproščanja citokinov pri covid-19«. Ker je največ pričakovanj usmerjenih v razvoj cepiv proti novemu koronavirusu, smo vključili tudi obsežen pregled tega področja, ki so ga pripravili kolegi Kateder za farmacevtsko biologijo in klinično biokemijo. Na ta način smo zaobjeli vse smeri preprečevanja in zdravljenja bolezni covid-19.

Dovolite mi, da se poleg vsem avtorjem člankov zahvalim tudi vsem farmacevtom, kolegicam in kolegom v lekarnah, bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah, ki so s srčnostjo, požrtvovalnostjo in strokovnostjo kljub potencialni možnosti okužbe izjemno aktivno delovali v času pandemije v svojih delovnih okoljih. Mogoče je sedaj na mestu tudi poziv k večji medijski aktivnosti in prepoznavnosti slovenske farmacije, ki je vedno v prvih delovnih vrstah, a se je premalo medijsko izpostavila v trenutni epidemiji oziroma v izrednih razmerah.

V imenu uredniškega odbora Farmacevtskega vestnika vam vsem želim čim bolj zdravo in sproščujoče poletje, kjerkoli že boste, doma ali v tujini, osveščeni z novim znanjem, ki ga boste pridobili z branjem te številke.

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.
Odgovorni urednik



VSEBINA / CONTENT

PREGLEDNI ZNANSTVENI ČLANKI – REVIEW SCIENTIFIC ARTICLES

- 107** Tihomir Tomašič
Koronavirus SARS-CoV-2 in bolezen covid-19
Coronavirus SARS-CoV-2 and covid-19 disease
- 112** Jasna Omersel, Alenka Šmid, Taja Zore, Lara Slavec, Damjan Avsec,
Irena Prodan Žitnik, Joško Osredkar, Borut Božič, Janja Marc
Laboratorijska diagnostika covid-19: od dokazovanja okužbe do merjenja imunskega odziva
Laboratory diagnosis of COVID-19: from virus detection to immune response measurement
- 121** Lea Knez, Tanja Tomšič, Tina Morgan, Igor Locatelli
Z dokazi podprto zdravljenje covid-19 z zdravili
Evidence based medicine for covid-19 treatment
- 133** Tihomir Tomašič, Žiga Jakopin, Marko Anderluh
Protivirusne učinkovine proti SARS-CoV-2 za zdravljenje boleznih covid-19
Antiviral drugs against SARS-CoV-2 for the treatment of covid-19
- 141** Mojca Lunder, Tomaž Bratkovič, Borut Štrukelj
Podporno zdravljenje covid-19 in preprečevanje okužbe s SARS-CoV-2
Supportive therapy for covid -19 and preventing SARS-CoV-2 infection
- 149** Samo Kreft
Škrlatni ameriški slamnik (*Echinacea purpurea*) za zdravljenje in preprečevanje covid-19
Echinacea purpurea in the treatment and prevention of covid-19
- 153** Žiga Jakopin, Marko Anderluh, Mojca Lunder, Tomaž Bratkovič
Blaženje sindroma sproščanja citokinov pri covid-19
Alleviating cytokine release syndrome in covid-19
- 163** Tomaž Bratkovič, Mojca Lunder, Nika Lovšin
Razvoj cepiv proti virusu SARS-CoV-2
SARS-CoV-2 vaccine pipeline

DRUŠTVENE VESTI

- 174** Napovednik kongresa ŠSSFD

KORONAVIRUS SARS-COV-2 IN BOLEZEN COVID-19

CORONAVIRUS SARS-COV-2 AND COVID-19 DISEASE

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tihomir.tomasic@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

V mestu Vuhan, v provinci Hubei na Kitajskem, se je decembra 2019 pojavilo več primerov atipične pljučnice, pri katerih so izključili običajne povzročitelje respiratornih okužb in pljučnic. Potrdili so, da okužbe povzroča novi koronavirus, ki so ga poimenovali virus hudega akutnega respiratornega sindroma 2 (SARS-CoV-2), bolezen, ki jo povzroča, pa koronavirusna bolezen 2019 ali covid-19 (1). Virus se je v relativno kratkem času razširil po vsem svetu, zaradi česar je Svetovna zdravstvena organizacija 11. marca 2020 razglasila pandemijo. Do 1. junija 2020 so potrdili že več kot šest milijonov okužb in več kot 370.000 smrtnih primerov v več kot 200 državah po svetu (2). Bolezen covid-19 je prizadela tudi Slovenijo, tako neposredno zaradi obolelih kot tudi posredno zaradi številnih ukrepov

POVZETEK

Izbruhu novega koronavirusa SARS-CoV-2 na Kitajskem konec leta 2019 je sledilo hitro širjenje okužbe po svetu zaradi velike virulentnosti virusa in odsotnosti imunosti v populaciji. Zato je 11. marca 2020 Svetovna zdravstvena organizacija razglasila pandemijo, saj virus povzroča nevarno bolezen covid-19, ki je lahko smrtna pri velikem deležu obolelih v rizičnih skupinah. Čeprav o virusu SARS-CoV-2 in bolezni covid-19 na osnovi intenzivnih raziskav vemo vedno več, na številna pomembna vprašanja še ne poznamo končnega odgovora. V preglednem članku predstavljamo znana dejstva o virusu SARS-CoV-2 in poteku bolezni covid-19.

KLJUČNE BESEDE:

koronavirus, covid-19, pandemija, virusna pljučnica

ABSTRACT

Outbreak of the novel coronavirus SARS-CoV-2 in China in the end of 2019 was followed by its rapid spread all over the world due to its high virulence and the absence of immunity among the general population. Therefore, on 11th March 2020 the World Health Organisation has declared a global pandemic, since the virus causes a dangerous covid-19 disease, which can be fatal in a large proportion of high-risk patients. Although new facts about SARS-CoV-2 and covid-19 are coming daily, many important questions remain unanswered. In this review article we present current understanding of SARS-CoV-2 and covid-19 disease.

KEY WORDS:

coronavirus, covid-19, pandemic, viral pneumonia

(samo)izolacije in karantene, ki so imeli velik vpliv na vseh nivojih našega življenja. Do 1. junija 2020 so v Sloveniji potrdili 1473 primerov okužb s SARS-CoV-2 in 108 smrtnih primerov zaradi bolezni covid-19 (3).

2 KORONAVIRUSI

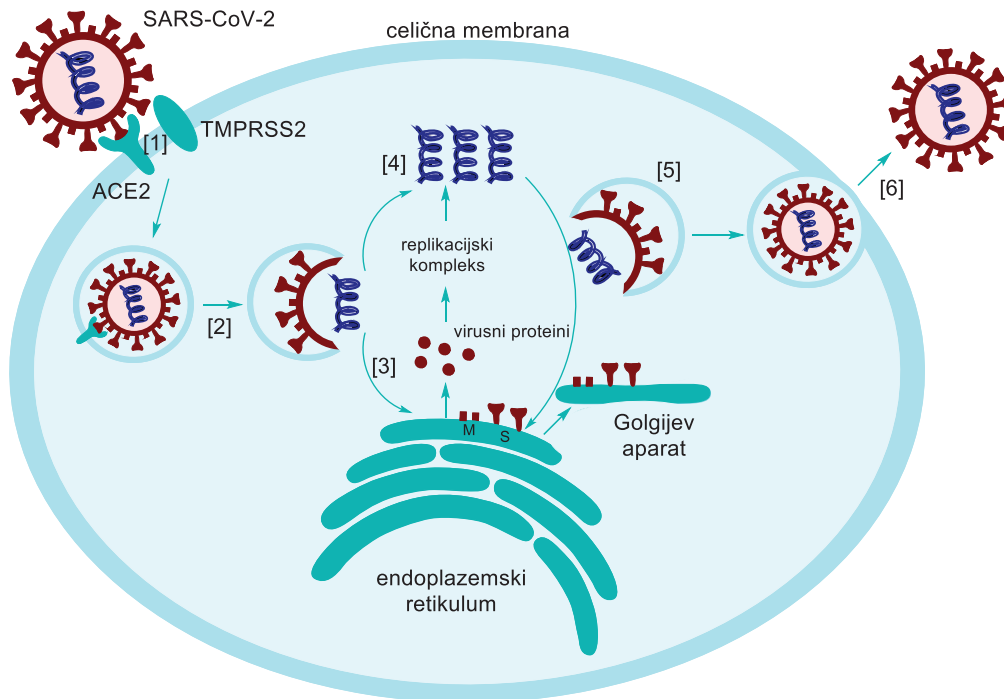
Koronavirusi (družina Orthocoronavirinae) so relativno veliki virusi, ki vsebujejo enojnovijačno kodirajočo verigo RNA



(ssRNA(+)), ovito s fosfolipidno membransko ovojnico. Virusno membrano prebadajo glikoproteini v obliki bodic, ki koronavirusom dajejo značilen videz v obliki krone. Koronaviruse delimo na razrede alfa, beta, gama in delta. Okužijo lahko živali in ljudi, vendar so določene živali, kot so netopirji, imuni za bolezen, povzročene s koronavirusi (4, 5). Človeka lahko okuži sedem znanih koronavirusov, od katerih med alfa koronaviruse uvrščamo HCoV-NL63 in HCoV-229E, med betakoronaviruse pa HCoV-OC43, HCoV-HKU1, virus, ki povzroča hudi akutni respiratorni sindrom (SARS-CoV), virus bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (MERS-CoV) in novi virus SARS-CoV-2, ki je povzročitelj bolezni covid-19. Našteti alfa koronavirusi, HCoV-OC43 in HCoV-HKU1 krožijo med ljudmi in živalmi že vrsto let, tudi v Sloveniji, in povzročajo predvsem prehladna obolenja. Nevarnejši so SARS-CoV, MERS-CoV in

SARS-CoV-2, saj povzročajo okužbe spodnjih dihal, ki v večini primerov vodijo do virusne pljučnice, prizadenejo pa tudi prebavila, srce, ledvica, jetra in centralni živčni sistem, kar lahko vodi do hkratne odpovedi več organov ter smrti. Na osnovi analize genov ta skupina betakoronavirusov izvira iz netopirjev, vendar je za prenos na človeka potreben vmesni gostitelj, v katerem pride do dodatnih mutacij virusa. Pri netopirjih lahko najdemo med 5.000 in 10.000 različnih podtipov koronavirusov. Tako je potencial za pojav novih koronavirusov, ki lahko okužijo človeka, izredno velik, zato je ključen razvoj novih učinkovin in cepiv proti tem patogenom (4, 6).

Genom betakoronavirusa SARS-CoV-2 je sestavljen iz 30 kilobaz in nosi zapis za številne strukturne in nestrukturne proteine, ki odigrajo ključno vlogo pri okužbi gostiteljske celice in širjenju virusa. Najpomembnejši strukturni protein



Slika 1: Vstop virusa SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico, podvajanje in sproščanje iz celice. Protein S se veže na receptor ACE2 na membrani gostiteljske celice [1]. Encim TMPRSS2 cepi in aktivira protein S, kar omogoči zlitje virusne in celične membrane in vstop virusa v gostiteljsko celico z endocitozo [2]. Virus sprosti svojo RNA [3]. S prevajanjem dela RNA se najprej tvori virusni poliprotein, ki ga proteazi 3CLpro in PLpro cepita v funkcionalne virusne proteine. Nastane replikacijski kompleks, v katerem nastane veliko kopij virusne RNA in virusnih proteinov [4]. Iz nastalih strukturnih proteinov in RNA v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu nastajajo novi virioni [5], ki zapustijo gostiteljsko celico z brstenjem [6].

Figure 1: Entry of SARS-CoV-2 in the host cell, its replication and release from cell. Spike protein binds to its receptor ACE2 on the host cell membrane [1]. Enzyme TMPRSS2 primes the spike protein, which enables fusion of viral and cellular membrane. Virus enters the host cell by endocytosis [2]. Virus then releases its RNA [3]. Some RNA is translated to viral polyprotein, which is cleaved by 3CLpro and PLpro to functional viral proteins. In the formed replication complex, numerous copies of viral RNA and proteins are formed [4]. Proteins and RNA are assembled into new virions in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus [5]. Virions are finally released by exocytosis [6].

je protein S (*spike protein*), ki se veže na receptor – encim angiotenzin konvertaza 2 (ACE2), prisoten na površini membrane gostiteljske celice (7). Protein S je tudi kot antigen glavni induktor imunskega odziva gostitelja. Poleg tega pomembnega strukturnega proteina pa SARS-CoV-2 vsebuje še strukturne proteine N (nukleokapsida), E (ovojnica, *envelope*) in M (membrana) ter šestnajst nestrukturnih proteinov, od katerih imajo nekateri encimsko funkcijo. Med najpomembnejšimi so od RNA odvisna RNA-polimeraza (RdRp), glavna cistein proteaza 3CLpro in papainu podobna proteaza PLpro, ki imajo vsi ključno vlogo pri okužbi gostiteljske celice (1, 8).

Po vezavi na membrano z zgoraj opisano vezavo med proteinom S in ACE2 sledi endocitoza virusa v celico v endosome, kar olajša proteolitska cepitev in aktivacija proteina S s transmembransko serinsko proteazo TMPRSS2 (slika 1) (8). Po vstopu virusa v gostiteljsko celico se najprej sprosti virusni genom v obliki ssRNA(+). V okuženi celici nato v delu endoplazemskega retikuluma nastanejo številni vezikli z dvojno membrano (9). Ti vezikli so popolno mesto za zaščito virusnega genoma in omogočajo učinkovit proces podvajanja s pomočjo replikacijsko-transkripcijskega kompleksa virusa (10). Temu sledi prevajanje virusne RNA v virusni poliprotein, za kar virus zlorabi mehanizme gostiteljske celice. Nastali nefunkcionalni poliprotein nato virusni proteazi 3CLpro in PLpro cepita do funkcionalnih virusnih proteinov, odgovornih za podvajanje in sestavljanje virusnih delcev ali virionov, kar poteka v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu (11). Nastali virioni se prenesejo do celične membrane, sprostijo iz celice z brstenjem in širijo okužbo z vezavo na nove gostiteljske celice. Intenzivno podvajanje in sprostitve SARS-CoV-2 iz gostiteljske celice vodi tudi do piroptoze, ki je vrsta programirane celične smrti kot posledica vnetnega procesa. Piroptozo sledi sproščanje velike količine provnetnih citokinov in kemokinov, ki pritegnejo monocite, makrofage in celice T na mesto okužbe, s čimer povečujejo vnetje. Pri neustreznem imunskem odzivu temu sledi kopičenje imunskih celic v pljučih in pretirano nastajanje provnetnih citokinov, kar ima za posledico poškodbo pljučnega tkiva (12).

3 BOLEZEN COVID-19

Virus se prenaša zlasti kapljično, tako da pri kihanju in kašljanju okuženega kapljice z virusom pridejo v stik s sluznico

nosu, ust in oči oseb v bližini, padejo pa tudi na bližnje površine. V povprečju ena okužena oseba okuži 2 do 3 druge zdrave osebe. Ker je kužnost virusa zelo visoka, je ključna preventiva, ki zahteva razkuževanje površin in socialno distanco. V začetnem, asimptomatskem stanju bolezni covid-19, se virus veže na epiteljske celice v nosni votlini, kjer se intenzivno razmnožuje. Najintenzivneje se razmnožuje prvih nekaj dni, zato so osebe takrat tudi najbolj kužne, ni pa nujno, da že izkazujejo simptome bolezni (13). Inkubacijska doba traja od 2 do 14 dni, v povprečju od 4 do 6 dni. Količina virusa v nosno-žrelnem prostoru začne padati po sedmih dneh bolezni in v približno dveh tednih je v nosu prisotna le še neznatna količina (13).

Bolezen covid-19 se ne kaže s specifičnimi znaki ali simptomi, na osnovi katerih bi jo lahko razlikovali od ostalih virusnih okužb dihal, zato je za potrditev ali izključitev okužbe z novim koronavirusom potrebno mikrobiološko testiranje z odvzemom brisa nosno-žrelnega prostora, žrela, izpirka zgornjih dihal, izmečka dihal ali drugih kužnin (13, 14). Pri lažji obliki bolezni je značilno slabo počutje, utrujenost, bolečine v mišicah in sklepih, nahod, najpogostejša znaka pa sta zvišana telesna temperatura (pri več kot 88 % okuženih) in suh kašelj (pri več kot 60 % okuženih). Približno 80 % okuženih bolnikov ima le blage simptome, ki so omejeni na zgornje in prevodne dihalne poti. Pri približno 20 % bolnikov pa bolezen napreduje do razvoja okužbe spodnjih dihalnih poti, kar vodi do hipoksemije in poškodbe pljuč (15). Ti bolniki so v nevarnosti, da se pojavi akutna dihalna stiska, ki je lahko tudi usodna. Bolezen covid-19 tako klasificiramo na asimptomatsko in blago, ki ne potrebujeta bolnišničnega zdravljenja, ter zmerno covid-19 s pljučnico brez hipoksemije, pri kateri je potrebno ambulantno ali bolnišnično zdravljenje. Za hudo obliko, ki prizadene približno 15 % bolnikov, je značilna pljučnica s hipoksemijo, ki zahteva sprejem v bolnišnico in poostreno opazovanje zaradi možnosti poglobljanja hipoksemije. Pri 5 % bolnikov pa je bolezen kritična, zahteva zdravljenje v intenzivni enoti zaradi dihalne odpovedi in potrebe po umetnem predihavanju, lahko pa vodi celo do odpovedi več organov (13, 16, 17). Bolniki s pridruženimi boleznimi, kot so bolezni srca in ožilja, sladkorna bolezen, visok krvni tlak, kronične bolezni pljuč ali ledvic, rak in debelost, imajo večje tveganje za smrtni izid. Zelo pomemben dejavnik tveganja pa je tudi starost, saj smrtnost narašča s starostjo in je najvišja v skupini nad 80 let (18).

Okužba z virusom SARS-CoV-2 lahko sproži prekomeren odziv imunskega sistema, ki ga imenujemo sindrom sproščanja citokinov ali citokinska nevihta (12). Slednja je povezana s povišanim sproščanjem vnetnih citokinov, predvsem in-



terlevkina 6. Možni napovedni laboratorijski dejavniki hujšega poteka bolezni so limfopenija, zvišana koncentracija jetrnih encimov, zvišana laktat dehidrogenaza, zvišani označevalci vnetja (C-reaktivni protein, interlevkin 6, feritin), zvišan D-dimer, podaljšan protrombinski čas, zvišana troponin I in kreatin kinaza (19). Na slikah računalniške tomografije CT bolnikov s covid-19 so pogosto vidne spremembe z videzom mlečnega stekla, ki so značilne za virusne pljučnice (20).

Za okužbo s SARS-CoV-2 je ključna vezava virusa na ACE2 v celicah pljuč, je pa encim ACE2 izražen tudi v srcu, ledvicah, gastrointestinalnem traktu in testisih. ACE2 je komponenta sistema renin-angiotenzin in katalizira cepitev angiotenzina I v angiotenzin 1-9 ter angiotenzina II v angiotenzin 1-7. Ravnotežje med angiotenzinom II in angiotenzinom 1-7 je izredno pomembno, saj ima angiotenzin II vazokonstriktorno delovanje preko vezave na angiotenzinski receptor tipa 1 (AT1), angiotenzin 1-7 pa vazodilatatorno delovanje zaradi vezave na angiotenzinski receptor tipa 2 (AT2), kar ima številne ugodne učinke na kardiovaskularni in respiratorni sistem (21). Koristnost uporabe zaviralcev ACE ali antagonistov AT1 za zdravljenje covid-19 je še vedno nejasna, velja pa poudariti, da terapevtsko uporabni zaviralci ACE ne zavirajo ACE2 (22). Trenutno tudi ni dokazane povezave med jemanjem teh zdravil in hujšim potekom bolezni, kar je bila ena od hipotez, ker je hujši potek covid-19 pogostejši pri bolnikih s hipertenzijo (21, 23).

4 TARČE ZA RAZVOJ CEPIV IN ZDRAVILNIH UČINKOVIN

RNA virusa SARS-CoV-2 nosi zapis za številne proteine, ki so potencialne tarče za odkrivanje zdravilnih učinkovin. Največ raziskav poteka v smeri razvoja zaviralcev RdRp in proteaz 3CLpro in PLpro, katerih kristalne strukture so že poznane, to pa je podlaga za strukturno podprto načrtovanje. Hiter razvoj potencialnih protivirusnih učinkovin omogoča tudi velika podobnost genoma SARS-CoV-2 s SARS-CoV in MERS-CoV (24). Na primer, 3CLpro in RdRp SARS-CoV-2 in SARS-CoV imata več kot 95-odstotno podobnost aminokislinskega zaporedja. Proteazi PLpro obeh virusov imata sicer nižjo, 83-odstotno podobnost zaporedja, vendar je enakost aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu bistveno višja (6, 25). Ta podobnost omogoča, da lahko v kratkem času testiramo veliko število znanih spojin z dokazanim delovanjem na SARS-CoV in MERS-CoV, s pomočjo česar so že identificirali potencialne protivirusne učinkovine,

ki so v predkliničnih in kliničnih fazah razvoja (26). Tudi interakcija med proteinom S in receptorjem ACE2 na površini membrane gostiteljske celice ima velik pomen za odkrivanje novih učinkovin in cepiv za preprečevanje in zdravljenje covid-19, saj je to začetni stik, ki sproži proces okužbe (27). Hiter potek raziskav in obetavni rezultati kliničnih testiranj nam dajejo upanje, da bo kmalu na voljo varno in učinkovito zdravilo in/ali cepivo proti bolezni covid-19. Več informacij o razvoju učinkovin in cepiv sledi v drugih prispevkih te številke Farmacevtskega vestnika.

5 SKLEP

Nedvomno je pandemija zaradi izbruha SARS-CoV-2 in bolezni covid-19 vsaj za kratek čas spremenila ves svet. Tako hitrega in intenzivnega poteka raziskav, kot v primeru covid-19, še ni bilo nikoli. Čeprav spoznavamo vedno več dejstev o samem virusu in bolezni covid-19, veliko neznank še vedno ostaja. Skrb vzbujajoča so poročila, ki kažejo, da covid-19 lahko pusti dolgotrajnejše posledice na organizmu in da okužba s SARS-CoV-2 lahko vodi do avtoimunskih bolezni (npr. do Kawasakijevega sindroma pri otrocih (28)). Zaradi vrste strogih ukrepov je nekaterim državam, tudi Sloveniji, uspelo zajeziti širjenje virusa in počasi se naša življenja vračajo v stare tirnice, vendar ob neprekinjeni veljavi številnih omejitev zaradi strahu pred ponovnim porastom okužb. Pomembna vprašanja ostajajo še neodgovorjena: (i) Ali oseba, ki preboli covid-19, postane dolgotrajno imuna na okužbo s SARS-CoV-2?, (ii) Ali bomo imeli ponovni izbruh virusa SARS-CoV-2 v jeseni 2020 ali v naslednjih letih? Vsi z velikim pričakovanjem čakamo na rezultate kliničnih preskušanj zdravilnih učinkovin za zdravljenje covid-19 in cepiv za preprečevanje okužb s SARS-CoV-2, s katerimi bi lahko zaščitili predvsem rizične skupine oseb in pridobili potreben občutek varnosti za našo prihodnost, saj bo virus zelo verjetno ostal med nami.

6 LITERATURA

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):265-9.



2. Coronavirus [Internet]. [cited 2020 June 2]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
3. Dnevno spremljanje okužb s SARS-CoV-2 (COVID-19) [Internet]. [cited 2020 June 2]. Available from: <https://www.nijz.si/sl/dnevno-spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19>
4. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):676-9.
5. Osman EEA, Toogood PL, Neamati N. COVID-19: Living through another pandemic. *ACS Infect Dis*. 2020 May; <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00224>
6. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 1;9(1):221-36.
7. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020 Mar;367(6485):1444-8.
8. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020 Apr;181(2):271-280.e8.
9. Knoops K, Kikkert M, Worm SHE van den, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, et al. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol*. 2008 Sep;6(9):e226.
10. Hagemeyer MC, Verheije MH, Ulasli M, Shaltiel IA, Vries LA de, Reggiori F, et al. Dynamics of coronavirus replication-transcription complexes. *J Virol*. 2010 Feb;84(4):2134-49.
11. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner LV, Watkins SP, Carter LJ, et al. Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. *ACS Cent Sci*. 2020 Mar;6(3):315-31.
12. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Apr;1-12.
13. Tomazič J. Covid-19: kaj je dobro, da ve vsak zdravnik [Internet]. [cited 2020 May 24]. Available from: https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/covid-19_tomazic_j.finito.pdf
14. Koronavirus - pogosta vprašanja in odgovori [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.nijz.si/sl/koronavirus-pogosta-vprasanja-in-odgovori>
15. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. *JAMA*. 2020 Feb;323(13):1239-42.
16. Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, Liang W-H, Ou C-Q, He J-X, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020 Apr;382(18):1708-20.
17. Wang Y, Liu Y, Liu L, Wang X, Luo N, Li L. Clinical outcomes in 55 patients with Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 who were asymptomatic at hospital admission in Shenzhen, China. *J Infect Dis*. 2020 May;221(11):1770-4.
18. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020 May;8(5):475-81.
19. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2020 Mar;395(10229):1054-62.
20. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med*. 2020 May;35(5):1545-9.
21. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020 Apr;46(4):586-90.
22. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, McMurray JVV, Pfeffer MA, Solomon SD. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Apr;382(17):1653-9.
23. COVID-19 and the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and receptor blockers [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/covid-19-and-the-use-of-angiotensin-converting-enzyme-inhibitors-and-receptor-blockers>
24. Morse JS, Lalonde T, Xu S, Liu WR. Learning from the past: Possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. *ChemBioChem*. 2020 Mar;21(5):730-8.
25. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 Feb;395(10224):565-74.
26. Zhang J, Xie B, Hashimoto K. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis. *Brain Behav Immun*. 2020 Apr; <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.046>
27. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar;367(6483):1260-3.
28. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents temporally related to COVID-19 [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>

LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA COVID-19: OD DOKAZOVANJA OKUŽBE DO MERJENJA IMUNSKEGA ODZIVA

LABORATORY DIAGNOSIS OF COVID-19: FROM VIRUS DETECTION TO IMMUNE RESPONSE MEASUREMENT

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.¹

Doc. dr. Alenka Šmid, mag. farm.¹

Asist. Taja Zore, mag. lab. biomed.¹

Lara Slavec, mag. lab. biomed.^{1,2}

Asist. Damjan Avsec, mag. farm.¹

Asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.¹

Prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM^{1,3}

Prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM¹

Prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

³ Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Njegoševa 4, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: jasna.omersel@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

V spopadanju s pandemijo bolezni covid-19 so bile neprimerljivo uspešnejše države z obsežnim laboratorijskim testiranjem, doslednim spremljanjem in izolacijo okuženih oseb. K hitrejši in učinkoviti zdravniški obravnavi pomembno doprinese laboratorijska diagnostika. Njena vloga je, da izbira najboljše metode, ki so v danem trenutku na razpolago in zagotavljajo kakovostne, zanesljive rezultate v najkrajšem možnem času. V članku predstavljamo spoznanja o imunskem odzivu po okužbi s SARS-CoV-2, pristope v diagnostiki virusnih okužb in značilnosti dobre diagnostične metode. Predstavljena je diagnostika covid-19 z vidika prepoznavanja aktivne (virusna RNA) in prebolele okužbe (protitelesa proti virusnim antigenom) kot tudi spremembe v biokemijskih parametrih in uporabnost diagnostičnih rezultatov za uspešno obvladovanje pandemije SARS-CoV-2.

KLJUČNE BESEDE:

diagnostika SARS-CoV-2, imunski odziv, molekularne metode, serološki testi, zakonodaja

ABSTRACT

In the fight against covid -19, countries where extensive laboratory testing, consistent monitoring and isolation of infected individuals were implemented have been incomparably more successful. Laboratory diagnostics contributes to faster and more efficient medical decisions. Its role is to select the best methods available at a given time, and to provide high quality and reliable results in the shortest possible time. Herein, we present the latest findings on the immune response to a SARS-CoV-2 infection, approaches in the diagnosis of viral infections and the characteristics of a good diagnostic method. We present the diagnostics of covid-19 from recognising active (viral RNA) and past infection (antibodies against viral antigens) to changes in biochemical parameters and the applicability of diagnostic results for successful management of the SARS-CoV-2 pandemic.

KEY WORDS:

SARS-CoV-2 diagnostics, immune response, molecular methods, serological tests, legislation

1 UVOD

Za obvladovanje pandemije in boj proti eventualnemu novemu izbruhu okužbe covid-19 je bistvenega pomena testiranje na prisotnost okužbe ali na preteklo izpostavljenost virusu SARS-CoV-2. Za obvladovanje različnih stopenj pandemije je pomembno razumeti namen posameznega testiranja ter diagnostično uporabno vrednost (1). Vloga medicinskih laboratorijev je, da izbirajo najboljše metode, ki so na razpolago, in tako zagotavljajo kakovostne, zanesljive rezultate ter hitrejšo in učinkovito zdravniško obravnavo bolnika.

Simptomi covid-19 so raznoliki, predvsem pa nespecifični in sorodni številnim respiratornim okužbam. Zato je laboratorijska diagnostika nujna, saj lahko odkrije in potrdi povzročitelja okužbe, virus SARS-CoV-2. Klinična in znanstvena spoznanja, ki jih je stroka dobila ob epidemiji SARS leta 2002, so pomembno vodila in pospešila razvoj diagnostičnih metod ob pandemiji covid-19. Leta 2002 so potrebovali kar pet mesecev za odkritje nukleotidnega zaporedja virusnega genoma SARS-CoV, kar je končno vodilo do razvoja metode verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) ter dokazovanja povzročitelja okužb. V primeru SARS-CoV-2 je Center za kontrolo in preprečevanje bolezni (CDC) 13. januarja 2020 objavil, da je genom virusa SARS-CoV-2 dostopen v podatkovni bazi GenBank, prvo metodo za dokazovanje prisotnosti virusa pa so objavili tri dni kasneje (1, 2).

V prispevku predstavljamo in podajamo pomen ključnih laboratorijskih metod dokazovanja virusa SARS-CoV-2 in imunskega odziva nanj ter povzetek ostalih laboratorijskih parametrov, ki glede na trenutno poznavanje dopolnjujejo diagnostiko covid-19.

2 IMUNSKI ODZIV NA VIRUSNO OKUŽBO NA PRIMERU SARS-COV-2

Vstop virusa SARS-CoV-2 v celico poteče z receptorsko olajšano endocitozo virusnega delca, ki ji sledi zlitje virusne ovojnice z membrano endosoma. Posledica vstopa, dozorevanja virusa in sproščanja virusnih delcev je piroptoza, posebna oblika programirane celične smrti. Ta sproži aktivacijo okoliških celic epitelija, endotelija in alveolarnih ma-

krofagov, da izločajo kemokine in vnetne citokine, kar vodi v privabljanje monocitov, makrofagov in limfocitov na mesto vnetja v pljučih (3). Prvi odziv je torej aktivacija prirojenega imunskega odziva. Temu sledi aktivacija pridobljenega imunskega sistema, ki se pri bolnikih s covid-19 pokaže po enem tednu od nastopa simptomov (3). Aktivacija citotoksičnih limfocitov T vodi neposredno do smrti okužene celice, aktivirane dendritične celice in celice T pomagalka pa še dodatno aktivirajo tako citotoksične limfocite T kot tudi limfocite B. Sočasno izločajo vnetne citokine, potrebne za nadaljnjo rekrutacijo in aktivacijo imunskih celic, kar vodi do vzpostavitve povratne vnetne zanke. Aktivirani limfociti B posredujejo humoralno imunost v obliki specifičnih protiteles (4). Razvoj protiteles proti SARS-CoV-2 je načeloma hiter in v skladu z dinamiko virusnega bremena (3). Pri bolnikih s covid-19 so detektirali serokonverzijo (protitelesni imunski odziv) v prvem tednu po nastopu simptomov okužbe, najprej v obliki nizkoafinitetnih protiteles IgM, v drugem tednu so prevladala IgG, katerih titer je vrh dosegel do konca tretjega tedna (3, 5). V raziskavi na 285 bolnikih je Long s sodelavci pri vseh bolnikih dokazal specifična protitelesa v tretjem tednu od pojava simptomov covid-19 in potek serokonverzije na tri načine: IgM pred IgG, IgG sočasno z IgM in IgM za IgG. Koncentracija IgM oz. IgG je plato dosegla šest dni po serokonverziji, razlike med bolniki z najvišjo in najnižjo koncentracijo pa so bile kar do dvajsetkratne, ob čemer pa koncentracija ni nujno korelirala s kliničnimi znaki (6). Za dolgotrajno imunost proti SARS-CoV-2 so potrebna nevtralizacijska protitelesa, usmerjena proti površinskim antigenom. V primeru SARS-CoV-2 je ključen antigen protein S, ki je odgovoren za vstop virusa v celice. Raziskave okužb s SARS-CoV v letih 2002 do 2003 so pokazale, da je za uspešno premagovanje virusa potreben preklon iz prirojene v pridobljeno imunost. Pri SARS-CoV so spominske limfocite T odkrili tudi še po dveh letih od prebolele okužbe, kar nakazuje, da je za nadzor in razrešitev okužbe s SARS-CoV potrebna celična imunost (3). V primeru SARS-CoV je visoka koncentracija protiteles pomenila ugodnejši potek bolezni in manj zapletov (4). Nasprotno so raziskave covid-19 pokazale, da visoke koncentracije protiteles v akutni fazi okužbe (prva dva tedna) lahko poslabšajo vnetje in vodijo v prizadetost organov preko s protitelesi posredovanega ojačanja imunskega odziva, kar naj bi po nekaterih raziskavah pomenilo težji klinični potek bolezni (3, 7). Poleg tega nevtralizacijska protitelesa pozitivno korelirajo z označevalcem vnetja CRP in negativno s številčno koncentracijo limfocitov ob sprejemu, starejši bolniki pa imajo višje titre nevtralizacijskih protiteles v primerjavi z mlajšimi, ki imajo tudi sicer ugod-



nejšo napoved (8). Trenutno še ni znano, ali preboleli ostanejo dolgotrajno odporni proti SARS-CoV-2 (3, 8).

3 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA VIRUSNIH OKUŽB

Diagnostika virusnih okužb poteka na dveh ravneh: neposredno z dokazovanjem prisotnosti virusa in posredno z merjenjem odziva imunskega sistema okužene osebe na virus. Prisotnost virusa v splošnem ugotavljamo z dokazovanjem virusnih nukleinskih kislin (RNA ali DNA), običajno z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) ali PCR v realnem času. Osamitev virusov v celični kulturi je pred razvojem molekularnih preiskav predstavljala zlati standard v diagnostiki virusnih okužb, danes pa je predvsem zaradi zamudnosti in nižje analizne občutljivosti ter tudi večje ogroženosti laboratorijskega osebja nekoliko izgubila na pomenu. Virusne antigene določamo neposredno v kužnini ali po osamitvi v celični kulturi, običajno z metodo direktne imunofluorescence (DIF) ali z encimskoimunskimi metodami. V zadnjih letih so na voljo tudi testi za diagnostiko ob bolniku (POCT), ki delujejo na principu lateralne imunodifuzije, a izkazujejo bistveno nižjo analizno občutljivost (9, 10).

Serološke preiskave omogočajo oceno odziva okužene osebe na okužbo oziroma njenega imunskega statusa. Hemogram, rezultati biokemijskih preiskav in vnetni označevalci nam dajo vpogled v stanje organizma in omogočajo tudi napoved poteka bolezni. Z dokazovanjem prisotnosti specifičnih protiteles pa odkrijemo osebe, ki so okužbo prebolele in so pred ponovno okužbo morda tudi dolgotrajno zaščitene. Z dokazovanjem prisotnosti IgM ali IgG običajno razlikujemo med aktivno in prebolelo okužbo, vendar se prav pri SARS-CoV-2 to kaže za nezanesljivo. Dinamika nastajanja in persistence protiteles IgA v krvi je manj predvidljiva, zato jih v diagnostiki redkeje uporabljamo. Za določanje specifičnih protiteles v serumu najpogosteje uporabljamo imunske metode na trdnem nosilcu (npr. ELISA), aglutinacijske teste in metodo imunskega odtisa (11).

4 ZNAČILNOSTI DOBRE LABORATORIJSKE DIAGNOSTIČNE METODE

V vseh fazah razvoja, izdelave in uvajanja laboratorijske preiskave je vrednotenje pomembna osnova zagotavljanja

kakovostnih rezultatov. Vrednotimo lahko metodo, analizni komplet, rezultate ali celotno preiskavo, ki obsega metodo, reagentne in pripomočke, rezultate in učinkovitost postopka. Za vrednotenje metode so najpomembnejše meja detekcije (najmanjša zaznavna količina merjenja), analizna občutljivost (najmanjša zaznana sprememba množine merjenja) in analizna specifičnost (sposobnost določitve samo želenega merjenja v mešanici različnih snovi) (12).

Pri vrednotenju rezultatov je pomembna klinična učinkovitost: ali lahko z njimi ločujemo med skupinami zdravih in bolnih ter med skupinami bolnih s podobnimi boleznimi. Specifičnost rezultata ali diagnostično oz. klinično specifičnost izračunamo kot delež zdravih, pri katerih je rezultat testa normalen. Diagnostična oz. klinična občutljivost pa predstavlja delež bolnikov s patološkim rezultatom.

Vrednotenje analiznega kompleta je enako za uporabo v ročni ali avtomatizirani izvedbi. Imamo pa dodatne zahteve za uporabo v diagnostiki v primerjavi z uporabo za raziškovalne namene.

Vrednotenje preiskave sloni na pristopih vrednotenja zdravstvenih tehnologij, ki vključujejo tudi ekonomske in druge vidike (13), pri čemer je pomembno spremljanje vigilance medicinskih pripomočkov.

Pri metodah, ki temeljijo na imunokemijskih reakcijah, lahko analizna specifičnost predstavlja težavo zaradi heterogenosti pacientovih protiteles. Slednje vpliva tudi na vrednotenje rezultatov: imunski odziv sestavlja množica protiteles proti različnim mikrobnim antigenom in njihovim epitopom, na katere se vežejo z različnimi afinitetami. Tako z različnimi izvedbami metod zajamemo praviloma samo del protiteles in se zato lahko rezultati med seboj razlikujejo (14).

Diagnostična metoda je dobra, če z njo zaznamo klinično pomembna protitelesa (nanašajoč se na vrednotenje rezultatov) in lahko spremljamo že majhne spremembe v koncentracijah (nanašajoč se na vrednotenje metode).

5 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA COVID-19

5.1 BIOKEMIJSKI LABORATORIJSKI PARAMETRI OB OKUŽBI S SARS-COV-2

Klinične značilnosti covid-19 so široko opredeljene (15), medtem ko reprezentativni nabor laboratorijskih parametrov še vedno postavljajo. Laboratorijska medicina igra bistveno

vlogo pri zgodnjem odkrivanju in diagnozi covid-19, več parametrov pa kaže tudi napovedno vrednost.

Dosedanje metaanalize kažejo, da z laboratorijskimi analizami dobro opredelimo potek bolezni pri bolnikih, ki potrebujejo obravnavo v intenzivni negovalni enoti, slabše pa pri tistih, ki imajo blažji potek bolezni. Zhang in sod. v svoji raziskavi na 140 bolnikih s covid-19 (58 s hudim potekom) ugotavljajo bistveno višje vrednosti D-dimera (razgradnega produkta fibrina), CRP in prokalcitonina pri bolnikih s hudo boleznijo v primerjavi s tistimi z blažjo obliko (16). V raziskavi z 41 bolniki s covid-19 (13 s hudo boleznijo) so bili pomembni napovedni dejavniki sprejema na oddelek: levkocitoza, nevtrofilija, limfopenija, protrombinski čas, D-dimer, albumin, ALT, celotni bilirubin, LDH in prokalcitonin, katerega vrednosti so bile povišane pri 25 % bolnikov, sprejetih na intenzivno enoto, medtem ko pri bolnikih z blagim potekom ni bil povišan (17).

Povzamemo lahko, da so najpogostejše spremembe prisotne pri naslednjih parametrih: limfopenija (35–75 % primerov), povišane vrednosti CRP (75–93 % primerov), LDH (27–92 % primerov), sedimentacija eritrocitov (do 85 % primerov) in D-dimer (36–43 % primerov), nizke koncentracije albumina v serumu (50–98 % primerov) in hemoglobina (41–50 %) ter vnetni citokini, ki lahko privedejo do citokinske nevihte (18, 19). V preglednici 1 je povzetek kandidatnih parametrov, ki bi lahko služili kot klinični napovedni dejavniki za resnost bolezni ali smrtni izid covid-19 in bi jih uporabljali v stratifikacijskih modelih. V prihodnosti bo potrebno analizirati bazo bolnikov z različnim potekom in izidom bolezni in na ta način ugotoviti pomen posameznega parametra. Zelo pomembne bi bile tudi vrednosti omenjenih parametrov v skupini umrlih. Večino dosedanjih raziskav so naredili na populaciji vzhodne Azije,

predvsem Kitajske, v prihodnosti pa pričakujemo tudi rezultate iz evropskih in ameriških raziskav. Šele medsebojna primerjava rezultatov bo preseгла morebitni odklon zaradi razlik v rasi in pomenila nepristransko oceno pomena nekoga parametra.

5.2 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI OKUŽBE: VIRUSNA RNA IN VIRUSNI ANTIGENI

Za zgodnje in neposredno prepoznavanje okužbe z virusom SARS-CoV-2 uporabljamo metode, ki jih uvrstimo v dve kategoriji. V prvi so metode, ki zaznajo virusno RNA, v drugi pa tiste, ki zaznajo virusne antigene. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) in Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) trenutno priporočata predvsem uporabo metod iz prve kategorije, ki temeljijo na uporabi verižne reakcije s polimerazo v realnem času s predhodno reverzno transkripcijo (RT-qPCR), s katero pomnožimo in kvantificiramo odseke virusnega genetskega materiala v vzorcu preiskovanca (slika 1). Kot pozitivni kontrolni vzorec uporabljamo standardizirano koncentracijo specifičnega zaporedja RNA SARS-CoV-2, za negativno kontrolo pa vodo brez RNaz in DNaz in negativni vzorec izolacije RNA, ki ga pripravimo iz neuporabljene palčke za odvzem brisa. S testi določimo enega ali več tarčnih genov v genomu SARS-CoV-2, kot so geni E, N, S (kodirajo različne proteine, ki se nahajajo na površinski ovojnici) in RdRp (kodira virusno od RNA odvisno RNA-polimerazo). Za metode določanja SARS-CoV-2, ki temeljijo na RT-qPCR, sta značilni visoki analiza specifičnost (97–100 %) in analiza občutljivost, saj z njima zaznamo zelo nizko

Preglednica 1: Povzetek sprememb laboratorijskih parametrov pri bolnikih s težjo oz. usodno obliko covid-19 (16–19).

Table 1: Summary of changes in laboratory parameters in patients with severe covid-19 illness (16–19).

Hemogram	Biokemija	Vnetni označevalci
↑ število levkocitov ↑ število nevtrofilcev ↓ število limfocitov ↓ število trombocitov ↓ število eozinofilcev ↓ hemoglobin	↓ albumin ↑ alanin aminotransferaza ↑ aspartat aminotransferaza ↑ bilirubin, celotni ↑ sečnina ↑ kreatinin ↑ kreatin kinaza ↑ laktat dehidrogenaza ↑ mioglobin ↑ kreatin kinaza-MB ↑ srčni troponin I	↑ hitrost sedimentacije eritrocitov ↑ CRP ↑ serumski feritin ↑ prokalcitonin ↑ IL-2R ↑ IL-6 ↑ IL-8 ↑ IL-10
Koagulacija		
↑ protrombinski čas ↑ D-dimer		

koncentracijo virusne RNA (meja detekcije nekaterih testov je 1 do 10 kopij virusne RNA/reakcijo) (20). Nekoliko bolj problematična je klinična občutljivost, saj s testom zaradi variabilnih količin virusa (t. i. virusnega bremena) v zgornjih dihalih v posameznih stopnjah okužbe ali neustrezno odvzetega vzorca nekaterih okuženih posameznikov ne znamo. Prisotnost virusa najpogosteje ugotavljamo v vzorcih zgornjih dihal, kot sta bris ali izpirek nosno-žrelnega predela ali žrela, saj je odvzem teh najenostavnejši. Vendar pa v raziskavah ugotavljajo, da je virusno breme v prvih dveh tednih po okužbi največje v spodnjih dihalih, zato so analize na vzorcih spodnjih dihal, kot sta sputum in bronhoalveolarni izpirek, bolj zanesljive. Zbiranje teh je težavnejše, obstaja opa tudi večja možnost nastanka aerosola in posledično prenosa okužbe (21, 22). Kljub prisotni okužbi je tako test lahko negativen, če je v času vzorčenja virusno breme nizko. V primeru, da pri pacientu obstaja utemeljen sum na okužbo, je priporočljivo ponovno testiranje, ki ga, če je to le možno, izvedemo na vzorcu iz spodnjih dihal (22). Celoten analizi postopek skupaj z izolacijo virusne RNA iz vzorca traja od 3 do 5 ur, za izvedbo je potrebna posebna laboratorijska oprema. Pospešeno razvijajo metode, ki bi omogočile hitrejšo in enostavnejšo izvedbo analize. Zanimive so metode za detekcijo virusne RNA, ki temeljijo na mehanizmu z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja z reverzno transkripcijo (RT-LAMP), in metode, ki temeljijo na uporabi tehnologije CRISPR/Cas. Pri slednji encim Cas12 ali Cas13 hkrati cepi virusno RNA in fluorescentno označene sonde. To vodi v porast fluorescence vzorca, ki jo zaznamo. Kot RT-qPCR so v večini primerov tudi te metode sposobne zaznati zelo nizke koncentracije virusne RNA – meja detekcije ene izmed metod CRISPR/Cas SARS-CoV-2 je denimo 6,75 kopij RNA/mL transportnega medija (23). Analize potekajo pri nespremenjeni temperaturi, zato za izvedbo ne potrebujemo drage opreme. Nekatere metode omogočajo zaznavo rezultata s prostim očesom. Običajno so hitrejše, saj omogočajo

pridobitev rezultata v manj kot eni uri. Zato so te metode primerne tudi za razvoj hitrih testov (21).

5.3 POTRJEVANJE IMUNSKEGA ODZIVA NA OKUŽBO: MERJENJE PROTITELES

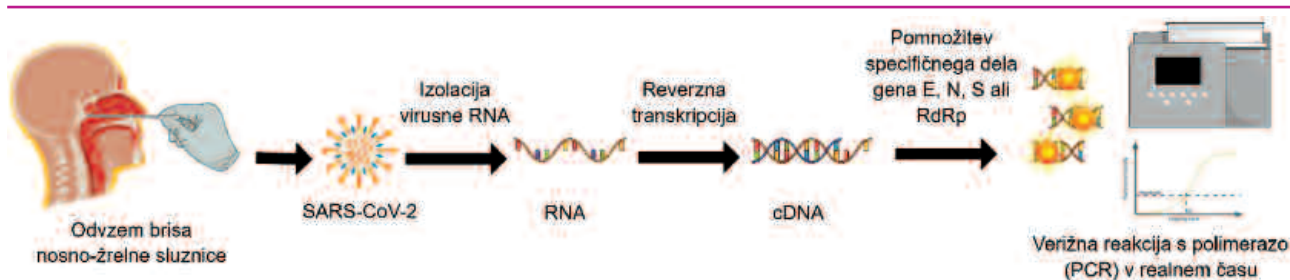
Glede na naše trenutno znanje o virusu SARS-CoV-2 in odzivu imunskega sistema nanj je serološko testiranje na protitelesa proti SARS-CoV-2 uporabno:

1. za posredni dokaz akutne okužbe in ugotavljanje prebolele okužbe,
2. za določitev prevalence virusa v določeni populaciji,
3. za identifikacijo posameznikov, ki so razvili močan protitelesni imunski odziv na okužbo in bi lahko bili darovalci rekonvalescentnega seruma za terapijo,
4. za bazične raziskave imunskega odziva ob okužbi s SARS-CoV-2 in razvoj cepiv ter
5. za določitev posameznikove odpornosti (imunosti) na SARS-CoV-2.

Za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so danes na trgu številni analizi kompleti, ki temeljijo na encimskoimunski tehniki na trdnem nosilcu ali imunokromatografiji.

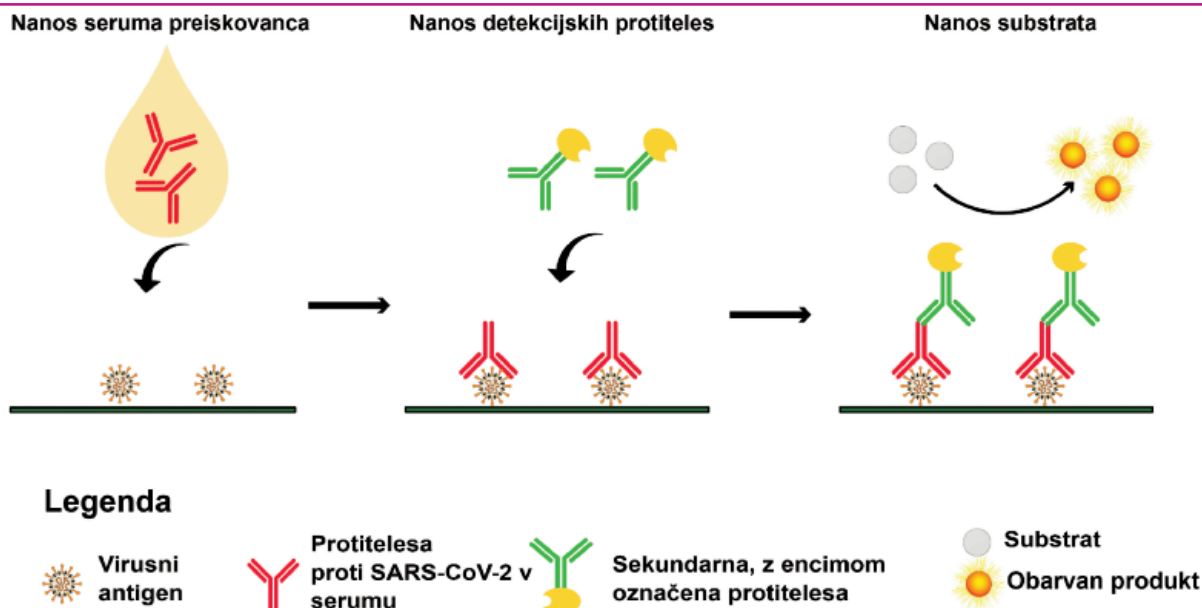
5.3.1 Encimskoimunske metode na trdnem nosilcu (ELISA)

ELISA je biokemijska metoda, ki jo v imunologiji uporabljamo za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Temelji na specifični interakciji med antigenom (npr. protein virusne ovojnice) in protitelesom v serumu preiskovanca (slika 2). V primeru okužbe s SARS-CoV-2 metodo ELISA uporabljamo predvsem za določanje prisotnosti protiteles IgG in IgM pri bolniku, lahko pa tudi za določanje protiteles IgA in celokupnih protiteles (3,4). Kot antigene v imunoloških me-



Slika 1: Metoda RT-qPCR za določanje prisotnosti virusne RNA v vzorcu nosno-žrelnega brisa preiskovanca.

Figure 1: RT-qPCR method for detection of viral RNA in a sample of nasopharyngeal swab.



Slika 2: Princip metode ELISA za določanje prisotnosti protiteles IgG in IgM v serumu preiskovanca s prisotno okužbo s SARS-CoV-2.
 Figure 2: Principle of ELISA method for detection of IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 in a serum sample.

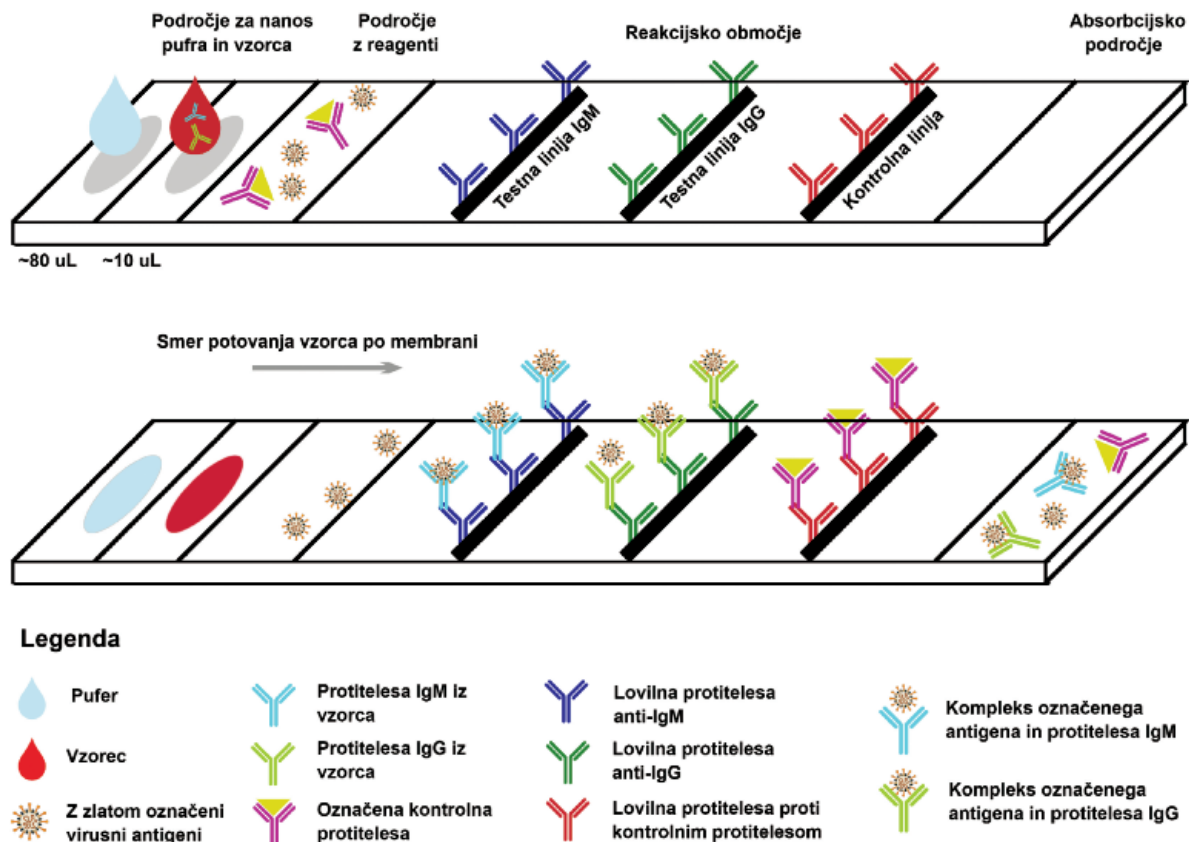
today we use different surface proteins SARS-CoV-2. Most often it is a recombinant protein of the nucleocapsid (N) or «spike» protein (its surface domain S1 or domain for receptor binding (RBD)), above all the RBD domain would be significant for SARS-CoV-2, as it is important for distinguishing the new coronavirus strain from previous ones (24, 25). When using these proteins as antigens, it is necessary to be aware of potential cross-reactivity of the tested antibodies against common circulating alpha- (NL63 and 229E) and betacoronavirus (OC43 and HKU1), which are present in our space. Even around potential cross-reactivity, it is currently the most common concern regarding the specificity of serological testing for antibodies against SARS-CoV-2 (24, 26).

In individual cases with asymptomatic COVID-19 infection, antibodies against SARS-CoV-2 are not detectable in the first seven days after the appearance of symptoms. In most hospitalized patients, we detect IgG antibodies 14 days, certainly by 28 days after the appearance of symptoms (25). Due to this, the effectiveness of serological methods for appropriate COVID-19 diagnosis is very limited. When can we detect the presence of antibodies against SARS-CoV-2, it depends on the individual's immune response and on the analytical sensitivity of the used method. Antibody response is not suitable for evaluation, but the tested person is checked at the moment whether they are positive or negative. In reliable, appropriately validated serological methods, a negative result indicates the absence of previous exposure

to the virus or to the absence of an immune response: the person could have been exposed to the virus, but seroconversion has not yet occurred or it has occurred in a smaller amount, so antibodies in the blood (yet) cannot be detected. Conversely, a positive test result for antibodies against SARS-CoV-2 means an acute or past infection (24). The results of the ELISA method, which is used by some Slovenian laboratories, show a 99.81% clinical specificity (95% confidence interval) and 88.1% or 100% clinical sensitivity (95% confidence interval), if the samples were tested seven or fourteen days after the confirmed infection with PCR (26).

5.3.2 Imunokromatografske metode

Immunochromatographic methods (*lateral flow immunoassays*) are usually qualitative (they give the result as presence or absence of infection), in some cases also semi-quantitative (they give the result in concentration ranges). The advantages of the methodology enable the preparation of a complete kit, which is portable and simple to use, so it can be used for testing of patients (POCT) or for self-testing (i.e. rapid tests). For the analysis, a small amount of sample (usually a drop of capillary blood) is needed, and the result is obtained within 10 to 30 minutes (26). They are relatively accessible, so the use of these tests is increasing. Among rapid tests for the detection of SARS-CoV-2, the fastest developing immunochromatographic tests



Slika 3: Princip imunokromatografske metode (hitri test) za določanje protiteles IgG in IgM v krvi, serumu ali plazmi preiskovanca, okuženega s SARS-CoV-2.

Figure 3: Principle of immunochromatographic method (rapid test) for detection of IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 in a blood, serum or plasma sample.

za določanje protivirusnih protiteles (IgM in IgG) v polni kapilarni krvi, serumu ali plazmi (slika 3) (29).

Na podoben način delujejo tudi hitri imunokromatografski testi za določanje virusnih antigenov v nosno-žrelnem brisu v stanju aktivne okužbe. Edina razlika je, da se po nanosu vzorca na testni listič virusni antigen iz vzorca veže na označena monoklonska protitelesa proti SARS-CoV-2 na ploščici.

Hitri testi za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so v nekaj mesecih od pojava covid-19 dobesedno preplavili vse svetovne trge. Stroka na (samo)testiranje s trenutno dostopnimi hitrimi testi gleda kritično, saj ti testi v mnogih primerih niso mednarodno preizkušeni. Obstaja namreč velika verjetnost za lažno negativne rezultate, ko je količina prisotnih protiteles oz. antigena pod pragom detekcije, ali lažno pozitivne rezultate v primeru pretekle okužbe z drugo vrsto koronavirusa (SARS-CoV, MERS-CoV).

6 OD RAZVOJA DIAGNOSTIČNE METODE DO TRGA IN POSAMEZNIKA

Laboratorijske metode, reagenti in pripomočki morajo biti skladni z evropsko zakonodajo na tem področju (oznaka CE) in validirani kot diagnostični medicinski pripomoček *in vitro* (oznaka IVD). Vrednotenje za diagnostiko je predpisano z Direktivo 93/42/EGS o medicinskih pripomočkih (MDD), Uredbo EU 2017/746, z zakonom (ZMedPri, 2009) in Pravilnikom o medicinskih pripomočkih (UL 37/10 in 66/12). Število molekularnih testov, ki prihajajo na tržišče, iz dneva v dan narašča. Do 20. maja 2020 je bilo na seznamu fundacije FIND (neprofitna organizacija, ki spodbuja inovacije in razvoj diagnostike) kar 269 metod RT-qPCR.

V Sloveniji so ob izbruhu pandemije molekularne diagnostične metode za prisotnost virusa SARS-CoV-2 v vzorcih

zgornjih dihal izvajali Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IMI) in Klinika Golnik.

Z začetkom nacionalne raziskave covid-19 so na IMI začeli tudi z uporabo metode ELISA za določanja protiteles IgG in IgA, ki so jo izbrali na konsenzu evropskih strokovnjakov glede na najboljše izkazane parametre občutljivosti in specifičnosti med takrat dostopnimi metodami. Imunokromatografski hitri testi za določanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so v Sloveniji zaenkrat namenjeni samo strokovni uporabi. Nekateri že izpolnjujejo zahteve standarda ISO 13485, s katerim proizvajalci medicinskih pripomočkov dokazujejo usklajenost sistema kakovosti in izpolnjevanje dela zahtev MDD. 20. maja 2020 je bilo v bazi FIND 122 na trgu dostopnih imunokromatografskih analiznih kompletov za detekcijo protiteles proti SARS-CoV-2 z oznako CE-IVD (20). Pričakovati je, da bodo za samotestiranje dostopni tudi v Sloveniji. Dokler ni poznana narava imunskega odziva in ni potrjena trajna imunost, je pomen rezultatov prisotnih IgG in IgM omejen. Hkrati velja opozoriti, da je na trgu tudi veliko hitrih testov nepreverjenih proizvajalcev, ki so neakovostni in vodijo do lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov. Dokler hitri imunokromatografski testi ne bodo ustrezno ovrednoteni, WHO odsvetuje njihovo uporabo v klinični praksi, spodbuja pa njihov razvoj, izboljševanje in preverjanje kakovosti (30).

7 IMUNSKI POTNI LIST

Pristop (samo)izolacije v obdobju pandemije covid-19 se je izkazal kot učinkovita strategija, ki omogoča relativno dobro preživetje v splošni populaciji, vendar ne brez posledic. V želji po čimprejšnjem zagonu gospodarstva in drugih aktivnostih se je pojavila ideja o imunskem potnem listu (*Immunity Passport*), izdanem na osnovi rezultatov testiranja. Potni list bi dovoljeval prosto gibanje in vrnitev na delovno mesto, saj bi zagotavljal, da lastnik ni več kužen, je pa odporen proti ponovni okužbi z virusom SARS-CoV-2. Zaradi številnih predanaliznih in analiznih dejavnikov, ki vplivajo na zanesljivost rezultatov trenutno dostopnih testov in relativno slabega poznavanja koncentracijske dinamike protiteles so se pojavile kritike takšnega pristopa. Izdaja imunskega potnega lista osebi s spregledano kužnostjo bi pomenila novo grožnjo za zdravje ljudi, iz etičnega vidika pa je na mestu tudi pomislek o privilegiranosti oseb z imun-

skim potnim listom (31). Čeprav je nekaj držav predlagalo uvedbo imunskega potnega lista (Čile, Nemčija, Italija, VB, ZDA itd.), v digitalni ali fizični obliki, pa WHO temu nasprotuje (32). Stališče WHO je, da trenutna testiranja ne morejo zagotavljati točnih rezultatov za izdajo imunskega potnega lista, vendar se lahko razmere z dvigom kakovosti testov in novih spoznanj o trajanju imunosti spremenijo.

8 SKLEP

Razvoj in uporaba sodobnih molekularnih tehnik danes omogočata hiter odziv na pojav nove okužbe v družbi in pravilno identifikacijo praktično katere koli vrste virusa ali bakterije. Večji izziv ostajajo serološke metode dokazovanja protiteles, tako z vidika validacije metode kot uporabne vrednosti rezultatov. V nekaj mesecih bo razvoj kakovostnih hitrih testov nedvomno doprinesel k učinkovitejši obravnavi bolnikov s covid-19 v morebitnem drugem valu epidemije, ki ga epidemiologi napovedujejo jeseni oziroma pozimi 2020. Ne glede na kakovost metod oz. zanesljivost rezultatov bosta ključnega pomena učinkovito sodelovanje med zdravniško stroko in zdravstvenimi delavci v laboratoriju ter ustrezna interpretacija rezultatov diagnostičnih metod skupaj s klinično sliko bolnika in lastnostmi analiziranega vzorca (bris ali kri, čas po nastopu simptomov). Resnost bolezni namreč ni odvisna samo od vrste virusa in virusnega bremena, temveč tudi od individualnih lastnosti imunskega odziva posameznika.

9 LITERATURA

1. Center for Disease Control and Prevention. Novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019), Wuhan, China. [cited 2020 21.5.]; Available from: <https://web.archive.org/web/20200114084712/https://www.cdc.gov/coronavirus/novel-coronavirus-2019.html>
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020 Jan;25(3).
3. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immun.* 2020 2020/04/28.
4. Nikolich-Zugich J, Knox KS, Rios CT, Natt B, Bhattacharya D, Fain MJ. SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we



- may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *Geroscience*. 2020 0:1-10.
5. di Mauro G, Cristina S, Concetta R, Francesco R, Annalisa C. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. *Int Immunopharm*. 2020 Apr 16;84:106519.
 6. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020 2020/04/29.
 7. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *medRxiv*. 2020:2020.03.02.20030189.
 8. Wu F WA, Liu M. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. [cited 2020 25.5.]; Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.30.20047365v2.full.pdf>
 9. Charlton CL, Babady E, Ginocchio CC, Hatchette TF, Jerris RC, Li Y, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jan;32(1).
 10. Petrovec M. Mikrobiološka diagnostika in epidemiologija virusnih okužb dihal. Infekcijske bolezni v pediatriji. Zbornik predavanj. 2011:31-42.
 11. Hodinka R. Serologic Tests in Clinical Virology. In: Jerome KR, editor. *Lenette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. Informa Healthcare. 2016:133-50.
 12. Bureau International des Poids et mesures. *International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms* 20.5.2020]. Available from: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>
 13. Evropska komisija. Ocena zdravstvenih tehnologij [cited 2020 20.5.]; Available from: https://ec.europa.eu/health/technology_assessment/overview_sl.
 14. Božič B, Marc J, Lukač-Bajalo J. Merjenje imunosti: od molekule do bolnika. Enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine. UL-Fakulteta za farmacijo, Ljubljana; 2007.
 15. Mattiuzzi C, Lippi G. Which lessons shall we learn from the 2019 novel coronavirus outbreak? *Ann Trans Med*. 2020;8(3):48.
 16. Zhang J-j, Dong X, Cao Y-y, Yuan Y-d, Yang Y-b, Yan Y-q, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020 2020/02/19;n/a(n/a).
 17. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* (London, England). 2020.
 18. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Science China Life Sciences*. 2020 2020/03/01;63(3):364-74.
 19. Brandon Michael H, Maria Helena Santos de O, Stefanie B, Mario P, Giuseppe L. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2020(0):20200369.
 20. FIND. 2020 [cited 2020 20.5.]; Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>
 21. Udugama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020 2020/04/28;14(4):3822-35.
 22. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases 2020 [cited 2020 21.5.]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 23. Instructions for Use Sherlock CRISP/Cas SARS-CoV-2 Kit. Sherlock Bioscience. Available from: <https://www.fda.gov/media/137746/download>
 24. Theel ES, Slev P, Wheeler S, Couturier MR, Wong SJ, Kadkhoda K. The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? *J Clin Microbiol*. 2020:JCM.00797-20.
 25. Torres R, Rinder HM. Double-Edged Spike—Are SARS-CoV-2 Serologic Tests Safe Right Now? *Lab Med*. 2020;51(3):236-8.
 26. Elecsys Anti-SARS-CoV-2. Roche Diagnostics [cited: 2020 20.5]. Available from: <https://www.fda.gov/media/137605/download>
 27. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, Grossi V, Lari B, Macchia D, et al. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. *IMAJ*. 2020;22(4):203-10.
 28. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):111-20.
 29. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci*. 2020 May 27;6(5):591-605.
 30. WHO. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. 2020 [cited 2020 22.5.]; Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>.
 31. Phelan AL. COVID-19 immunity passports and vaccination certificates: scientific, equitable, and legal challenges. *Lancet*. 2020 May 4; 395(10237):1595-1598.
 32. WHO. Immunity passports in the context of COVID-19. [cited: 2020 20.5]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/immunity-passports-in-the-context-of-covid-19>

Z DOKAZI PODPRTO ZDRAVLJENJE COVID-19 Z ZDRAVILI

EVIDENCE BASED MEDICINE FOR COVID-19 DRUG TREATMENT

AVTOR / AUTHOR:

Doc. dr. Lea Knez, mag. farm., spec.^{1,2}

Tanja Tomšič, mag. farm., spec.³

Asist. Tina Morgan, mag. farm., spec.¹

Izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.²

¹ Klinika Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,

Katedra za socialno farmacijo,

Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

³ Univerzitetni klinični center Maribor,

Ljubljanska 5, 2000 Maribor

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: lea.knez@klinika-golnik.si

1 NUJNO POTREBUJEMO ZDRAVILA ZA BOLNIKE S COVID-19, A Z DOKAZANIMA UČINKOVITOSTJO IN VARNOSTJO

Svet nestrpno čaka novico o odobritvi prvega zdravila z dokazanima varnostjo in učinkovitostjo pri zdravljenju koronavirusne bolezni covid-19. Zaskrbljujoče pa je, da se ne le laična, ampak tudi strokovna javnost pogosto nekri-

POVZETEK

V želji po zdravilu za zdravljenje covid-19 se tudi v strokovni javnosti razveselimo vsakega pozitivnega signala učinkovitosti in pozabljamo, da dokaz varnosti in učinkovitosti zdravil zahteva potrditev v randomiziranih kliničnih raziskavah. V prispevku opisujemo najbolj odmevna zdravila pri covid-19: remdesivir, lopinavir z ritonavirjem, favipiravir in (hidroksi)klorokin. Izpostavljamo predvsem remdesivir, ki je dostopen v okviru programa sočutne uporabe in ki je v randomizirani klinični raziskavi na 1059 bolnikih pokazal pomembno hitrejše klinično izboljšanje covid-19, brez pomembnih varnostnih signalov. Na drugi strani izpostavljamo pomanjkanje dokazov učinkovitosti (hidroksi)klorokina, ki smo ga začeli množično uporabljati po objavi predobrih izidov zdravljenja pri le 36 bolnikih, novejši velike opazovalne raziskave pa postavljajo celo sum o manj ugodnih izidih zdravljenja. To je le dokaz več, da se lahko le preko kliničnih raziskav, tudi v Sloveniji, premaknemo iz točke, ko »mislimo«, k temu, da »vemo«, katera zdravila so varna in učinkovita pri covid-19.

KLJUČNE BESEDE:

covid-19, favipiravir, hidroksiklorokin, lopinavir/ritonavir, remdesivir

ABSTRACT

In the siege for a drug for covid-19, early signals of drugs' effectiveness were magnified and the need to prove a drug as effective and safe in the frame of randomized clinical trials (RCT) was neglected. Herein the most prominent covid-19 treatments, remdesivir, lopinavir/ritonavir, favipiravir and (hydroxy)chloroquine, are presented. Remdesivir, accessible in Slovenia within a compassionate use program, is highlighted as proved effective in shortening the time to clinical improvement in a large RCT with 1059 covid-19 patients, with no important safety signals. On the other hand, the broad use of (hydroxy)chloroquine despite the lacking evidence of effectiveness is discussed in the light of its possible detrimental effects as suggested by recent large observational studies. A further proof of the need for clinical trials, also in



Slovenia, to upgrade from »thinking« to »knowing« drugs that are effective and safe in treating patients with covid-19.

KEY WORDS:

covid-19, favipiravir, hydroxichloroquine, lopinavir/ritonavir, remdesivir

tično veselita vsakega pozitivnega signala o učinkovitosti zdravila proti novemu koronavirusu SARS-CoV-2, četudi le na nivoju učinkovitosti *in vitro* ali anekdotičnih opisov primerov bolnikov. Tako pod pritiskom pandemije covid-19 pozabljamo na osnovno načelo »*primum non nocere*« in na to, da varnost in učinkovitost zdravila lahko dokažemo le v dobro načrtovanih randomiziranih kliničnih raziskavah s primerjalno skupino (1–3). Ta zahteva velja tudi za zdravila, ki že imajo dovoljenje za promet za drugo indikacijo. Za proučevanje teh zdravil so zelo povedne tudi velike, dobro načrtovane opazovalne raziskave uporabe zdravila iz klinične prakse, ki dajejo dokaze iz realnega okolja (*real-world evidence*). Seveda je izvajanje kliničnih raziskav v času epidemije in preobremenjenega zdravstvenega sistema zelo neugodno, vendar je to pri preskušanju protivirusnih zdravil edina možnost, saj izven časa epidemije primernih bolnikov preprosto ni (4). Dokaz za to imamo tudi pri covid-19, kjer so morali številne klinične raziskave predčasno zaključiti ravno zaradi zmanjšane vključevanja ob koncu epidemije (5, 6). S tem, ko izven kliničnih raziskav bolniku ponudimo »nekaj«, kar »mislimo«, da mu bo bolj koristilo kot škodilo, onemogočamo, da bi ob naslednjem valu epidemije vedeli, katere intervencije koristijo in katere škodijo. To zelo neposredno dokazujejo izkušnje iz nedavnih epidemij virusov SARS-CoV, ebole in influence A H1N1 (4, 7, 8). V trenutni pandemiji smo se lahko nekaj že naučili na primeru klorokina in hidroksiklorokina, ki smo ju začeli množično uporabljati na podlagi poročila o pretirano dobrih izidih zdravljenja pri 36 bolnikih iz metodološko zelo pomanjkljive raziskave (9). Novejše velike in metodološko premišljene opazovalne raziskave omenjenih učinkovin so postavile sum na njuno neučinkovitost in morda celo škodljivost (10, 11).

Četudi še nimamo odobrenega zdravila za zdravljenje covid-19, je danes znanstvena skupnost veliko bolj naravnana k raziskovanju kot v preteklosti (12). Število prijavljenih kliničnih raziskav zdravil in cepiv je izjemno, zato sedaj številni svarijo pred neustrezno porabo virov za izpeljavo majhnih kliničnih raziskav, ki ne morejo odgovoriti na ključna vprašanja, in opozarjajo, da je trud potrebno usmeriti v izvajanje velikih in dobro načrtovanih mednarodnih raziskav (3). V

tem duhu je Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) prevzela pobudo za koordinacijo randomizirane klinične raziskave SOLIDARITY, ki pri hospitaliziranih bolnikih s covid-19 primerja pet različnih zdravljenj, in sicer i) standardno obravnavo ali standardno obravnavo z dodanim zdravljenjem z ii) remdesivirjem, iii) klorokinom ali hidroksiklorokinom, iv) lopinavirjem z ritonavirjem ali v) lopinavirjem z ritonavirjem in interferonom β -1a (13). Z minimalnimi administrativnimi obremenitvami skušajo privabiti k sodelovanju čim večje število držav, da bi hitreje potrdili ali ovrgli učinkovitost teh zdravljenj pri covid-19. Trenutno vključuje bolnike že 35 držav, med katerimi ni Slovenije. V nadaljevanju predstavljamo osnovne značilnosti teh zdravil (preglednica 1), predvsem pa najnovejše dokaze o varnosti in učinkovitosti najbolj odmevnih zdravil, ki smo jih uporabljali tudi v Sloveniji.

2 NAČELA, POMEMBNA ZA RAZUMEVANJE ZDRAVLJENJA BOLEZNI COVID-19

Za ustrezno interpretacijo raziskav zdravljenja covid-19 je pomembno poznavanje značilnosti bolezni in zdravljenja. Koronavirusi so velika družina virusov, ki običajno povzročajo blage do zmerne okužbe zgornjih dihal, kot je navaden prehlad. Veljali so za nenevarne vse do pojava novejših koronavirusov SARS-CoV, MERS in najnovejšega SARS-CoV-2, ki lahko povzročajo tudi izbruh težkega akutnega respiratornega sindroma (14). Virus SARS-CoV-2 povzroča bolezen, ki jo imenujemo covid-19.

Pri vrednotenju raziskav covid-19 je pomembno upoštevati značilnosti vključenih bolnikov. Potek bolezni covid-19 je namreč zelo različen. Pri večini (80 %) bolnikov je blag ali zmeren, pri 15 % bolnikov hud in pri 5 % kritičen (preglednica 2) (15). Starejši bolniki, bolniki s srčno-žilnimi obolenji, kronično pljučno boleznijo, hipertenzijo, diabetesom in/ali debelostjo, verjetno pa še z drugimi, ta trenutek še neznanimi dejavniki tveganja, so bolj ogroženi za zaplete bolezni covid-19 (16).

Huda oblika bolezni se navadno začne približno en teden po začetku simptomov. Najpogostejši simptom, ki napoveduje hud potek bolezni, je dispneja, ki jo velikokrat spremlja tudi hipoksemija. Presenetljiva lastnost covid-19 je hitro napredovanje respiratorne odpovedi, tudi do sindroma akutne dihalne stiske (17). Ker je razvoj hujše oblike zakasnen in težko predvidljiv, je pričetek zdravljenja ob pojavu simptomov v prvi fazi skoraj nemogoč.

Preglednica 1. Povzetek osnovnih podatkov izbranih zdravil za zdravljenje covid-19 (57).

Table 1. Baseline characteristics of selected drugs for covid-19 treatment (57).

Zdravilo	Odmerek	Neželeni učinki	Nosečnost	Opombe
Remdesivir 100 mg prašek za IV RAZT	d1: 200 mg, 1x/d, IV; nato: 100 mg, 1x/dan, IV, do 10 d	Zvišanje jetrnih encimov, ledvična toksičnost	Varnost ni poznana, se odsvetuje	KI pri oGF < 30 ml/min
Lopinavir z ritonavirjem 80/20 mg/ml PO RAZT 200/50 mg TBL	400/100 mg 2x/d, PO, do 14 d	Pogosti: GIT NU (slabost, bruhanje, driska) Resni: pankreatitis, hepatotoksičnost, podaljšanje intervala PR	Uporaba možna, pretehtati koristi in tveganja	Močna CYP 3A4 zaviralca: obvezen pregled interakcij Ne drobiti tbl: zmanjšanje biološke uporabnosti Pri PO razt pozornost: 1 mL vsebuje 356,3 mg alkohola in 152,7 mg propilenglikola na 1 mL, predvsem pri nosečnosti, ledvični okvari, nekompatibilno s poliuretanskimi sondami
Favipiravir 200 mg TBL	d1: FVP 1800 mg 2x/d, PO; nato: 800 mg 2x/d, PO, do 10 d	Hiperurikemija, driska, zvišanje jetrnih encimov	Kontraindicirana uporaba	Teratogen: izključitev nosečnosti, obvezna kontracepcija tudi za moškega Zaviralec CYP2C8 in aldehydne oksidaze: pregled interakcij
Klorokin 250 mg TBL	500 mg 2x/d, PO, 5–10 d Različna odmerjanja v kliničnih raziskavah.	Pogosti: GIT NU (slabost, bruhanje, abdominalni krči, driska) Resni: podaljšanje QT-intervala, hematološki NU, hipoglikemija, retinalna toksičnost, NU na CZŠ	Uporaba možna, pretehtati koristi in tveganja	Pri oGF < 10 ml/min: 50 % odmerek Podaljšuje QT: pregled interakcij
Hidroksiklorokin 200 mg TBL	d1: 400 mg 2x/d, PO; nato: 200 mg 2x/d, PO, 5–10 d Različna odmerjanja v kliničnih raziskavah.	Kot klorokin, vendar manj pogosto	Uporaba možna, pretehtati koristi in tveganja	Podaljšuje QT: pregled interakcij

IV: intravenska; PO: peroralna; RAZT: raztopina; TBL: tablete; NU: neželeni učinki; GIT: gastrointestinalni; CYP: citokrom P450; d: dan; KI: kontraindicirano; oGF: ocena glomerulne filtracije; CZŠ: centralni živčni sistem

Zdravljenje bolnikov s covid-19 je odvisno od poteka bolezni, se pa standardna oskrba ne razlikuje od oskrbe ostalih bolnikov z respiratornimi virusnimi okužbami, za katere nimamo vzročnega zdravljenja. Ta lahko vključuje antipiretike, hidracijo, antibiotično zdravljenje, preprečevanje venskih tromboembolizmov, hemodinamski nadzor in prehransko podporo, vse odvisno od potreb in resnosti bolezni. Standardna oskrba covid-19 je bila predvsem v prvih izve-

denih kliničnih raziskavah raznolika in je zajemala različna zdravila, imunosupresivna in protivirusna zdravila ter tudi glukokortikoide (18). Ob hipoksemiji je nujno zdravljenje s kisikom, ki sprva poteka preko nosnega katetra ali maske. Če hipoksemija napreduje oz. se ne izboljša, je potrebno invazivno dovajanje zraka s kisikom v pljuča – mehanska ventilacija. Kadar običajne in napredne oblike invazivne mehanske ventilacije odpovejo, se poslužujemo še bolj in-



Preglednica 2. Klinična klasifikacija bolezni covid-19 (18).

Table 2. Classification of clinical presentation of covid-19 (18).

KLASIFIKACIJA	KLINIČNA SLIKA
Brezsimptomna	Brez simptomov.
Blaga	Blagi simptomi in znaki bolezni brez pljučnice.
Zmerna	Covid-19 pljučnica brez hipoksemije, običajno zdravljenje v bolnišnici.
Huda	Covid-19 pljučnica s hipoksemijo, praviloma zdravljenje v bolnišnici.
Kritična	Dihalna odpoved s potrebo po mehanski ventilaciji ali šok z odpovedjo organov in potrebo po zdravljenju v enoti intenzivnega zdravljenja.

vazivne metode za izboljšanje oksigenacije krvi – zunajtelesne membranske oksigenacije (ECMO, *extracorporeal membrane oxygenation*) (19).

Bolezen covid-19 je zelo razširjena, do tega trenutka smo na svetu po uradnih podatkih prepoznali 5,5 milijonov bolnikov (18). Ker v začetku bolezni, ko ta običajno še ni huda in ko pričakujemo največji učinek protivirusnih zdravil, pri posameznem bolniku ne znamo napovedati, ali bo doživel hujši potek, bi morali s protivirusnimi zdravili zdraviti zelo veliko število ljudi, da bi pomembneje preprečili napredovanje bolezni (npr. do potrebe po hospitalizaciji) ali smrtnost v populaciji. Ob pomembnem prispevku pretiranega vnetnega odgovora v patogenezi covid-19 pa bomo za uspešno zdravljenje, sploh pri hujše bolnih, verjetno primorani k uporabi več zdravil hkrati (20). To pomeni, da je pomembno imeti na voljo učinkovita, a predvsem varna protivirusna zdravila.

3 UČINKOVITOST IN VARNOST REMDESIVIRJA

Protivirusno delovanje remdesivirja so preskušali v randomizirani klinični raziskavi s 175 bolniki, okuženimi z virusom ebola, katere najpomembnejši zaključek je ocena varnosti remdesivirja kot ustrežna (21). Remdesivir je neregistrirano zdravilo, ki je za zdravljenje covid-19 trenutno na voljo v okviru programa sočutne uporabe za hudo bolne, ki do njega ne morejo dostopati v okviru kliničnih raziskav (preglednica 1). Odbor za zdravila za uporabo v humani medicini pri Evropski agenciji za zdravila (EMA) je v svojem poročilu glede uporabe remdesivirja pri zdravljenju covid-19 to sprva omejil le na kritično bolne, ki so potrebovali invazivno mehansko ventilacijo, in jo nato, na podlagi obetavnih

podatkov iz potekajočih kliničnih raziskav razširil na vse bolnike s hudim potekom bolezni (22).

Ravno iz uporabe remdesivirja v okviru programa sočutne uporabe v ZDA, Kanadi, Evropi in na Japonskem izhajajo prvi obsežnejši klinični podatki na 53 bolnikih s hudim potekom covid-19 (23). Pri tej skupini zelo prizadetih bolnikov, kjer je 64 % bolnikov potrebovalo mehansko ventilacijo in so zdravilo dobili šele 12 dni po nastopu simptomov, so 18. dan opisali manjšo potrebo po kisiku pri 68 % bolnikov, opustitev mehanske ventilacije pri več kot polovici (17/30) in prekinitev z ECMO pri treh od štirih bolnikov. V raziskavi ni bilo primerjalne skupine in zato ta opažanja niso dokaz učinkovitosti remdesivirja pri zdravljenju covid-19. Pravo oceno učinkovitosti bodo dale potekajoče velike randomizirane klinične raziskave, nekaj prvih preliminarnih rezultatov pa opisujemo v nadaljevanju (24).

Prva, ob koncu epidemije predčasno zaključena randomizirana, s placebom nadzorovana, dvojno slepa klinična raziskava remdesivirja pri 237 bolnikih s hudo obliko covid-19 je potekala v 10 bolnišnicah v Hubeju na Kitajskem (preglednica 3) (5). Zanimivo je, da so v obeh rokah poleg običajne standardne oskrbe številni bolniki prejeli tudi kortikosteroide (nad 60 %), lopinavir z ritonavirjem (pod 30 %) ter interferone (okoli 30 %). Pričakovano je nad 70 % bolnikov imelo sočasne bolezni. Med skupinama ni bilo statistično pomembne razlike niti v času do kliničnega izboljšanja niti v smrtnosti 28 dni po začetku zdravljenja. Neželeni učinki, tako vsi (okoli 65 %) kot resni (okoli 20 %), so bili med skupinama primerljivi tako v vrsti kot frekvenci, brez novih varnostnih signalov zdravljenja z remdesivirjem. V skupini z remdesivirjem je zaradi neželenih učinkov predčasno zaključilo terapijo več bolnikov kot v placebo skupini (12 % proti 5 %). Raziskava je pokazala zadovoljivo varnost remdesivirja, dokončnega odgovora o učinkovitosti remdesivirja pa ne more ponuditi, saj je ob predčasnem zaključku vključevanja bolnikov in ob predpostavljenu

Preglednica 3. Randomizirane klinične raziskave (RCT) z remdesivirjem, s kombinacijo lopinavirja in ritonavirja ter s favipiravirjem pri bolnikih s covid-19.

Table 3. Randomized clinical trials with remdesivir, lopinavir / ritonavir and favipiravir in patients with covid-19.

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki: oblika COVID-19, starost ^{&} in spol	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini	Izidi in rezultati [#]	Opombe
REMDESIVIR (RDV)					
Wang Y, Lancet 2020 (5)	RCT, dvojno slepa, Kitajska	n = 237 huda oblika 65 (55–70) let 60 % moških	I: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 158) P: placebo, iv; (n = 79)	Čas do KI*: 21 dni (I) vs. 23 dni (P); RR = 1,23 (95-% IZ: 0,87–1,75, p > 0,05). Smrtnost do 28. dne: 14 % (I) vs. 13 % (P); RD = 1,1 % (95-% IZ: -8,1–10,3 %, p > 0,05)	Vključitev v povprečju 10 dni po prvih simptomih.
Beigel JH, NEJM 2020 (25)	RCT, dvojno slepa, mednarodna	n = 1059 zmerna, huda ali kritična 59 (49–69) let, 64 % moških	I: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 538) P: placebo, iv; (n = 521)	Čas do KI*: 11 dni (I) vs. 15 dni (P); RR = 1,32 (95-% IZ: 1,12–1,55; p < 0,001) . Smrtnost do 14. dne: 7,1 % (I) vs. 12 % (P); HR = 0,70 (95-% IZ: 0,47–1,04, p > 0,05)	88 % bolnikov s hudo ali kritično obliko. Vključitev v povprečju 9 dni po prvih simptomih.
Goldman JD, NEJM 2020 (26)	RCT, odprta, mednarodna	n = 397 zmerna ali huda oblika 61 (50–70) let 64 % moških	I: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 197) P: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–5. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 200)	Čas do KI*: 11 dni (I) vs. 10 dni (P); RR = 0,79 (95-% IZ: 0,61–1,01, p > 0,05). Smrtnost do 14. dne: 11 % (I) vs. 8,0 % (P); razlika ni statistično značilna	Ni razlik med 5- in 10-dnevno terapijo. Nad 80 % bolnikov s hudo obliko. Vključitev v povprečju 8 ali več dni po prvih simptomih.
LOPINAVIR / RITONAVIR (LPV/r)					
Cao B, NEJM 2020 (28)	RCT, odprta, Kitajska	n = 199 huda oblika 58 (49–68) let 60 % moških	I: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 14 dni; ter SO; (n = 99). P: SO; (n = 100)	Čas do KI*: 16 dni (I) vs. 16 dni (P); RR = 1,31 (95-% IZ: 0,95–1,8; p = 0,09) Smrtnost do 28. dne: 19 % (I) vs. 25 % (P); RD = -5,8 % (95-% IZ: -17 %–5,7 % p > 0,05)	Vključitev v povprečju 13 dni po prvih simptomih.
Hung IF, Lancet 2020 (31)	RCT, odprta, Hong Kong	n = 127 blaga ali zmerna oblika 52 (32–62) let 54 % moških	I: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 14 dni; + RBV 400 mg 2x/d, PO, 14 dni; + INFβ1b 8M IU, sc; (n = 86) P: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 14 dni; (n = 41)	Čas do NB: 7 dni (I) vs. 12 dni (P); RR = 4,4 (95-% IZ: 1,9 – 10,2; p = 0,001) Čas do odpusta: 9 dni (I) vs. 14,5 d (P); RR = 2,7 (95-% IZ: 1,2 – 6,1; p = 0,016)	Vključitev v povprečju 5 dni po prvih simptomih.
Li Y, Med 2020 (58)	RCT, 3 roke, enojno slepa, Kitajska	n = 86 blaga ali zmerna oblika 59 (49–69) let 41 % moških	I1: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 7 do 14 dni; (n = 34) I2: umifenovir 200 mg 3x/d, PO, 7 do 14 dni; (n = 35) P: SO; (n = 17)	Čas do NB: 9,0 dni (I1) vs. 9,1 dni (I2) vs. 9,3 dni (P); p = 0,981; primerjava vseh treh med sabo	Ni primerjave med posameznimi rokami.
Huang M, J Mol Cell Biol 2020 (59)	RCT, odprta, Kitajska	n = 22 zmerna ali huda oblika 44 (37–58) let 59 % moških	I: CQ 500 mg 2x/d, PO, 10 dni; (n = 10) P: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 10 dni; (n = 22)	Delež bolnikov z NB do 10. dne: 90 % (I) vs. 75 % (P); RR = 1,20 (95-% IZ: 0,84 – 2,00, p > 0,05)	



Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki: oblika COVID-19, starost [§] in spol	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini	Izidi in rezultati	Opombe
FAVIPIRAVIR (FVP)					
Chen C, MedRxiv 2020 (33)	RCT, odprta, Kitajska	n = 236 blaga, zmerna, huda ali kritična oblika 80 % oseb < 65 let 47 % moških	I: 1. dan: FVP 1600 mg 2x/d, PO; ter 600 mg 2x/d, 7 do 10 dni, PO; (n = 116) P: umifenovir 200 mg 3x/d, PO, 7 do 10 dni; (n = 120)	Delež bolnikov s KI ⁺ do 7. dne: 61 % (I) vs. 52 % (P); RD = 9,5 % (95-% IZ: -3,1–22 %; p>0,05)	88 % oseb je imelo blago ali zmerno COVID-19.

CQ: klorokin; *INFB1b* 8M IU: interferon beta-1b v odmerku 8 milijonov mednarodnih enot največ 3-krat v prvih 7 dneh po pojavu simptomov; iv: intravensko; HR: razmerje ogroženosti; KI: klinično izboljšanje; NB: negativni nosno-žrelni bris; p: p vrednost, če je $p > 0,05$ je razlika statistično neznačilna; PO: peroralno; RCT: randomizirana klinična raziskava; RR: razmerje okrevanja; RD: razlika med deležema; RBV: ribavirin; sc: subkutano; SO: standardna oskrba; vs.: v primerjavi z; 1x/d: enkrat na dan, 2x/d: dvakrat na dan, 3x/d: trikrat na dan; 95%-IZ: 95-odstotni interval zaupanja.

[§] starost je podana kot mediana ali povprečje, v oklepaju je naveden razpon med prvim in tretjim kvartilom;

[#] statistično značilni izidi so v krepkem tisku;

* izboljšanje za 2 točki na 7-točkovni lestvici;

+ ne potrebuje več kisika ali podporne terapije.

šestdnevnu skrajšanju časa do kliničnega izboljšanja bolezni moč raziskave premajhna.

Bolj jasne odgovore dajejo rezultati nedavno objavljene raziskave ameriškega Nacionalnega inštituta za alergije in nalezljive bolezni, čeprav izhajajo iz vmesne analize (preglednica 3). Na podlagi podatkov 1059 bolnikov, večina (88 %) z vsaj hudim potekom bolezni, je remdesivir skrajšal čas do kliničnega izboljšanja bolezni iz 15 na 11 dni. Raziskava ni zaznala novih varnostnih signalov remdesivirja. Z nadaljevanjem vključevanja lahko pričakujemo tudi dokaz sedaj sicer samo nakazane manjše smrtnosti ob zdravljenju z remdesivirjem (25).

Nedavno je bila zaključena tudi prva stopnja raziskave, ki je primerjala 5- in 10-dnevno zdravljenje z remdesivirjem (preglednica 3). Pri 397 bolnikih z zmerno ali hudo obliko covid-19 niso pokazali razlik v učinkovitosti krajšega ali daljšega časa zdravljenja z remdesivirjem. Ta izsledek je zelo pomemben, saj v času pandemije in velike potrebe po remdesivirju, če bo dokončno potrjena njegova učinkovitost pri covid-19, omogoča zdravljenje večjega števila bolnikov z zmernim ali hudim potekom bolezni z enako količino zdravila (26).

Remdesivir je v raziskavah pokazal pozitivne rezultate. Skrajšal je čas do kliničnega izboljšanja stanja bolnikov, vendar bi si želeli zdravilo, ki bi zmanjšalo potrebo po invazivni mehanski ventilaciji in bi pomembno zmanjšalo tudi smrtnost. EMA že proučuje vlogo za pridobitev pogodnega dovoljenja za promet z remdesivirjem (27).

4 UČINKOVITOST IN VARNOST KOMBINACIJE LOPINAVIRJA Z RITONAVIRJEM

Kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem so v preteklosti uporabili v več kliničnih raziskavah bolnikov, okuženih s koronavirusom SARS-CoV, sicer brez dokončnih zaključkov o njeni učinkovitosti (7). Te izkušnje so podlaga za preskušanje lopinavirja z ritonavirjem pri SARS-CoV-2.

V znanstveni literaturi najdemo veliko podatkov o uporabi lopinavirja z ritonavirjem pri zdravljenju covid-19, kljub temu pa dokončnega odgovora o njuni učinkovitosti še vedno nimamo (14, 18). Med številnimi opazovalnimi raziskavami se lahko pri iskanju odgovora opremo tudi na nekaj prospektivnih randomiziranih kliničnih raziskav (preglednica 3); pomembnejše izpostavljamo v nadaljevanju.

Raziskava Cao in sodelavcev, kjer so pri 199 bolnikih s težkim potekom bolezni covid-19, primerjali učinkovitost lopinavirja z ritonavirjem proti placebo, sodi kot prva randomizirana klinična raziskava pri bolnikih s covid-19 med najbolj odmevne raziskave na tem področju (28). Primarni izid raziskave, čas do kliničnega izboljšanja, je bil 16 dni in se med skupinama ni razlikoval. Smrtnost po 28 dneh je bila sicer številčno nižja v intervencijski kot v kontrolni skupini (19,2 % vs. 25,0 %), vendar ni dosegla statistične značilnosti. Neželene učinke so opisali pri skoraj polovici bolnikov v obeh skupinah, v intervencijski skupini so izstopali

že znani gastrointestinalni neželeni učinki lopinavirja z ritonavirjem, kot so slabost, bruhanje in diareja, ki so botrovali k ukinitvi zdravljenja pri 13,8 % bolnikih (preglednica 1). Raziskava ni dokazala statistično značilno boljših izidov bolezni ob zdravljenju s kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem, a hkrati tudi ni dokazala odsotnosti takega učinka ob premajhni velikosti vzorca in pričakovanemu učinku skrajšanja časa do kliničnega izboljšanja za osem dni (29, 30). Neformalni odmevi na objavljeno raziskavo izpostavljajo tudi, da tako čas začetka zdravljenja, v povprečju šele 13 dni po pojavu prvih simptomov bolezni, kakor tudi izbor bolnikov, ki so bili hudo bolni, kot dokazuje visoka, 22-odstotna smrtnost, ne sovpadata s pričakovanim učinkom zdravila predvsem v zgodnjem poteku bolezni. Na podlagi trenutno dostopnih podatkov strokovnjaki odsvetujejo uporabo zdravila v redni klinični praksi, hkrati pa opozarjajo na nujnost nadaljevanja randomiziranih, s placebom nadzorovanih kliničnih raziskav, ki bodo lahko zanesljivo potrdile ali ovrgle učinkovitost lopinavirja z ritonavirjem pri zdravljenju covid-19 (13, 16, 18).

Ob zmerni protivirusni aktivnosti lopinavirja z ritonavirjem so to kombinacijo že v preteklih epidemijah SARS-CoV in MERS-CoV uporabili sočasno z drugimi protivirusnimi učinkovinami, kot so nukleozidni analog ribavirin in interferoni α in β (7). Huang in sodelavci so v nedavni randomizirani klinični raziskavi pri 127 bolnikih z blagim ali zmernim potekom covid-19 primerjali sočasno uporabo treh zdravil, in sicer interferona β -1b, lopinavirja z ritonavirjem in ribavirina, proti lopinavirju z ritonavirjem (31). V intervencijski skupini je bil čas do negativnega nosno-žrelnega brisa za SARS-CoV-2 bistveno, za pet dni, krajši kot v primerjalni skupini in posledično so bili tudi pet dni prej odpuščeni iz bolnišnice. Obe razliki sta se ohranili samo v podskupini 76 bolnikov, ki so bili vključeni v sedmih dneh od pojava simptomov bolezni in so zato v intervencijski skupini prejeli interferon β -1b. Po sedmem dnevu od pojava prvih simptomov bolezni interferona β -1b namreč niso uporabljali zaradi možnega negativnega vpliva njegovega provnetnega delovanja na kasnejši potek bolezni. Skoraj polovica bolnikov v obeh skupinah je imela neželene učinke zdravljenja, predvsem za kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem značilni slabost (približno tretjina bolnikov) in diarejo (okoli 40 % bolnikov), ki nista zahtevali prekinitve zdravljenja in sta bili med skupinama primerljivi. Seveda pa ob relativno majhnemu številu 52 bolnikov, ki so prejeli vsa tri zdravila, so zaključki o varnosti njihove sočasne uporabe še nedokončni. Ob navdušenju nad zelo pozitivnimi rezultati dobro zasnovane raziskave se seveda postavlja vprašanje, kakšni sta učinkovitost in varnost trojne kombinacije pri bolnikih z

blago boleznijo v primerjavi s placebom, ter predvsem, kakšni sta učinkovitost in varnost pri bolnikih s težkim potekom bolezni covid-19, kjer so učinkovita zdravila bolj nujno potrebna.

5 UČINKOVITOST IN VARNOST FAVIPIRAVIRJA

Favipiravir je od leta 2014 na Japonskem registriran kot učinkovina za zdravljenje gripe (preglednica 1) (27). Ker pa je njegova uporaba omejena le na posamezne pod tipe virusa influence in le v posebnih okoliščinah bolezni, je kliničnih izkušenj s favipiravirjem relativno malo. Na podlagi kliničnih raziskav pri bolnikih z gripo in pri bolnikih z ebolo je varnostni profil favipiravirja ugoden (28). Med neželenimi učinki prevladujejo blage gastrointestinalne težave in asimptomatski dvigi sečne kisline, zdravljenje pa le redko, pri 1 % bolnikov, zahteva prekinitve. Izpostaviti je potrebno teratogenost favipiravirja, ki zahteva izključitev nosečnosti pred uporabo in strogo kontracepcijo v času zdravljenja in po njem.

Dokazi o učinkovitosti favipiravirja pri bolnikih s covid-19 so trenutno omejeni na dve klinični raziskavi. Prva, v slovenskih medijih zelo odmevna, je objava majhne kohortne raziskave Cai in sodelavcev pri 80 bolnikih z blago ali zmerno obliko covid-19 (32). Ker raziskava ni bila randomizirana, lahko poročani rezultati s krajšim trajanjem kužnosti ob zdravljenju s favipiravirjem v primerjavi s kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem služijo le kot hipoteza in je zato ne opisujemo bolj podrobno. Bolj zanesljive zaključke lahko potegnemo iz druge, čeprav še nerenzicirane objave randomizirane klinične raziskave Chena in sodelavcev (33). Raziskava je pri 236 bolnikih z diagnosticirano covid-19 pljučnico primerjala favipiravir z umifenovirjem, ki ju v Rusiji in na Kitajskem uporabljajo za zdravljenje gripe. Delež bolnikov, pri katerih je v sedmih dneh po vključitvi prišlo do kliničnega izboljšanja, se med skupinama ni razlikoval. Izboljšanje so dokazali le pri podskupini bolnikov brez kritičnega poteka bolezni, ki predstavlja skoraj 90 % vseh vključenih (71 % vs. 56 %; $p = 0,0199$). Tolmačenje tega izsledka zahteva previdnost, ker izbor bolnikov ni jasno definiran, podanaliza ni bila vnaprej načrtovana in tudi število drugih izvedenih podanaliz ni znano. Podobno si razlaga obe študiji tudi SZO, ki se na podlagi trenutnih dokazov ni odločila za vključitev favipiravirja v klinično preskušanje SOLIDARITY



in čaka na rezultate potekajočih kliničnih raziskav favipiravirja kot samostojnega ali kombiniranega zdravljenja covid-19 (19, 31).

6 KLOROKIN IN HIDROSIKLOKOKIN

Teoretične domneve o možnem ugodnem učinku klorokina in hidroksiklorokina, učinkovin za zdravljenje malarije in revmatoidnega artritisa, za zdravljenje covid-19 slonijo na širokem protivirusnem in protivnetnem delovanju (34). Kljub dokazom *in vitro* za protivirusne učinke se v kliničnih raziskavah nista izkazala kot učinkovita (35–37). Še več, obstajajo tudi domneve o njuni potencialni škodljivosti zaradi izražanja protivnetnih učinkov (38, 39). V najzgodnejši fazi bolezni covid-19 je namreč dober imunski odziv ključen. Zato lahko v komentarjih in pismih urednikom revij preberemo argumentirana svarila strokovnjakov, ki menijo, da poleg možnih ugodnih učinkov obstajajo tudi resna tveganja klorokina oz. hidroksiklorokina na potek bolezni covid-19, ne zgolj v zvezi z možnimi neželenimi učinki (40–43).

6.1 PRVE KLINIČNE RAZISKAVE

O poročilu Gautreta s sodelavci glede učinka hidroksiklorokina z azitromicinom bomo razpravljali zgolj zato, ker je močno odmevalo tako v laični kot strokovni in celo politični javnosti, saj je raziskava tako pomanjkljiva, da ne bi smela vzbuditi nikakršnega zanimanja znanstvene in strokovne skupnosti. Izsledki nerandomizirane raziskave na 36 ljudeh so bili na videz zelo dobri. Zdravljenje s kombinacijo hidroksiklorokina z azitromicinom (v primerjavi s samim hidroksiklorokinom ali kontrolno roko brez zdravil) je pri vseh bolnikih že v šestih dneh povzročilo negativni izvid nosnožrelnega brisa za SARS-CoV-2. Delo je bilo kljub hudim pomanjkljivostim v rekordnem času sprejeto v objavo v reviji *International Journal of Antimicrobial Agents*, v kateri je soavtor dotičnega članka glavni urednik. Predvsem na internetu (in ne v znanstvenih revijah) so nato različni avtorji proučevali metodologijo dela v raziskavi in izpostavili, da so brez komentarjev v rezultatih izpustili izsledke za šest bolnikov (vsi so prejeli bodisi hidroksiklorokin bodisi kombinacijo), od katerih so tri premestili na intenzivni oddelek, eden pa je umrl. O še drugih pomanjkljivostih raziskave se zainteresirani bralec lahko pouči preko spodaj navedenih referenc (44, 45).

Sledil je razmah uporabe samega hidroksiklorokina in kombinacije po vsem svetu, o čemer pričajo podatki velikih opazovalnih raziskav, ki jih bomo omenili v nadaljevanju prispevka. Na to so se agencije za zdravila odzvale s prepovedjo predpisovanja in izdaje klorokina, hidroksiklorokina in azitromicina za indikacijo covid-19 na recept, v bolnišničnem okolju pa so dovolile le uporabo v kliničnih raziskavah ali nacionalnih programih za izredno uporabo za zdravljenje covid-19 (46).

Odličnih rezultatov Gautreta v naslednjih raziskavah niso potrdili. Omenimo samo zgodnji odziv francoske skupine, ki je že po dveh tednih v hitrem pregledu 11 zaporednih bolnikov ugotovila, da so bili rezultati brisov bolnikov šesti dan od prejema kombinacije hidroksiklorokina z azitromicinom pri 80 % bolnikov še pozitivni (47). Podobno odličnih rezultatov Gautreta niso potrdili v nobeni izmed do sedaj objavljenih randomiziranih kliničnih raziskav hidroksiklorokina oz. klorokina, kar kljub njihovim številnim metodološkim pomanjkljivostim nakazuje na to, da so bili Gautretovi rezultati precejšnji (preglednica 4) (6, 48, 49). Iz podanega lahko zaključimo, da kliničnih podatkov o ugodnem učinku hidroksiklorokina za zdravljenje covid-19 ni.

6.2 VELIKE OPAZOVALNE KOHORTNE RAZISKAVE

Z izvedbo velikih opazovalnih kohortnih raziskav dobimo vpogled v dokaze o učinkovitosti v realnem okolju. Te raziskave temeljijo na analizi elektronskih podatkov o zdravljenju bolnikov, ki jih pridobimo ob redni zdravstveni obravnavi. Običajno take podatke spremljamo za posameznega bolnika skozi neko časovno obdobje. Kohorte predstavljajo skupine bolnikov z različnimi načini zdravljenja, tako največjimi kot tudi z že uveljavljenimi načini. S sodobnimi statističnimi metodami je mogoče medsebojno primerjati različne kohorte bolnikov. Tukaj se pojavi vprašanje, ali imajo bolniki v posameznih kohortah na začetku raziskave primerljive lastnosti. V tem delu so randomizirane klinične raziskave v veliki prednosti, saj randomizacija intervencije pri zdravljenju bolnikov zagotavlja primerljivost med skupinami in s tem relevantnost rezultatov raziskave. To v določeni meri lahko zagotovimo tudi v velikih kohortnih raziskavah, in sicer z uporabo statističnih modelov z upoštevanjem velikega števila spremenljivk, ki odražajo lastnosti bolnikov. Na tak način lahko kohortne raziskave, če so podatki anonimizirani, ustrezno zbrani in transparentno obdelani, uporabimo za proučevanje izidov, za katere npr. še nimamo rezultatov kliničnih preskušanj ali jih sploh ne pričakujemo.

Preglednica 4. Randomizirane klinične raziskave in večje opazovalne raziskave s klorokinom (CQ) in hidroksiklorokinom (HCQ) pri bolnikih s COVID-19.

Table 4. Randomized clinical trials and major observational studies with chloroquine and hydroxychloroquine in patients with COVID-19.

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini ali kohortah (K)	Izidi in rezultati	Opombe
RANDOMIZIRANE KLINIČNE RAZISKAVE					
Chen J, MedRxiv 2020 (48)	RCT, Kitajska	n = 30 nabor bolnikov ni opisan	I: HCQ 400 mg 1/d, PO, 5 dni; (n = 15) P: SO (n = 15)	Delež bolnikov z NB do 7. dne: 87 % (I) vs. 93 % (P); p>0,05	V kitajščini, dostopen zgolj povzetek v angleščini.
Chen Z, MedRxiv 2020 (49)	RCT, odprta, Kitajska	n = 62 zmerna oblika bolezni 44 (SD: 15) let 47 % moških	I: HCQ 200mg 2x/d, PO, 5 dni; (n = 31) P: SO (n = 31)	Čas do normalne TT: 2,2 dni (I) vs 3,2 dni (P) p>0,05 Izboljšanje pljučnice na CT do 6. dne: 80 % (I) vs. 55 % (P)	Nejasno poročanje o izidih, neustrezne statistične metode in drugo, zato nezanesljiv rezultat (61).
Tang W, BMJ 2020 (6)	RCT, odprta, Kitajska	n = 150 blaga, zmerna ali huda 46 (SD: 15) let 55 % moških	I: 1.–3. dan: HCQ 1200 mg 1/d, PO; ter 4.–21. dan: HCQ 800 mg 1/d, PO; (n = 75) P: SO (n = 75)	Delež bolnikov z NB do 28. dne: 85 % (I) vs. 81 % (P); RD = 4,1 % (95-% IZ: -10,3–18,5) Čas do NB: 8 dni (I) vs. 7 dni (P); p>0,05 progres pljučnice (CT): 33 % vs 47 %; RR = 0,85 (95-% IZ: 0,58–1,23; p = 0,34)	Predčasno zaključena, zato ne poročajo prvotno načrtovanih primarnih izidov in je zanesljivost zaključkov manjša.
VEČJE OPAZOVALNE RAZISKAVE					
Rosenberg ER, JAMA 2020 (10)	retrospektivna kohortna, multicentrična znotraj ZDA	n = 1.438, hospitalizirani s COVID-19	K1*: HCQ+AZT: 61 let, 62 % moških; n = 735 K2*: HCQ: 66 let, 58 % moških; n = 271 K3*: AZT: 62 let, 64 % moških; n = 211 K4: brez HCQ ali AZT: 64 let, 50 % moških; n = 221	Čas do smrti: K1 vs. K4: HR = 1,08 (95-% IZ: 0,76–2,40) K2 vs. K4: HR = 1,08 (95-% IZ: 0,63–1,85) K3 vs. K4: HR = 0,56 (95-% IZ: 0,26–1,21) K2 vs. K3: HR = 1,92 (95-% IZ: 0,99–3,74) Pojavnost srčnega zastoja: K1 vs. K4: OR = 2,13 (95-% IZ: 1,12–4,05) K2 vs. K4: OR = 1,91 (95-% IZ: 0,96–3,81) K3 vs. K4: OR = 0,64 (95-% IZ: 0,27–1,56) K2 vs. K3: OR = 2,97 (95-% IZ: 1,56–5,64)	V celotni skupini 20 % smrtnost, kar nakazuje hud potek bolezni.
Geleris J, NEJM 2020 (11)	retrospektivna, kohortna, en center v ZDA	n = 1.376, hospitalizirani s COVID-19	K1: 1.dan: HCQ 600 mg 2x/d, PO, ter 2.–5. dan: HCQ 400 mg 2x/d, PO; 63 % nad 60 let; 58 % moških; (n = 811) [§] K2: brez HCQ: n = 274 ^{§,§}	Čas do mehanske ventilacije ali smrti*: HR = 1,04 (95-% IZ: 0,82–1,32)	V celotni skupini pri 25 % potrebo po mehanski ventilaciji ali smrt. Uporabili so več statističnih modelov s podobnimi rezultati.

AZT: azitromicin; TT: telesna temperatura; SO: standardna obravnava; SD: standardna deviacija; 95-odstotni IZ: 95 % interval zaupanja; HR: razmerje ogroženosti; OR: razmerje obetov; NB: negativni nosno-žrelni bris; RR: razmerje okrevanja; RD: razlika med deležema.

* 90% bolnikov prejeli d1: 400 mg HCQ 2x/dan, po +/- 500 mg azitro 1x/dan, po/iv; d2-3: 200mg HCQ 2x/dan, po +/- 250 mg azitro 1x/dan, po;

[§] prilagojena za spol, starost (<65 vs. ≥65 let), sladkorna bolezen, kronična pljučna bolezen, srčno-žilna bolezen, spremembe na slikovnih preiskavah pljuč;

^{§§} sočasno lahko prejeli azitro (I: 60 %, P: 37 %), tocilizumab (I: 7,2 %, P: 3,3 %), remdesivir (I: 2,7 %, P: 1,8%);

⁺ prilagojeno za spol, kronična pljučna bolezen, indeks telesne sestave ter dodatno za starost, raso, etnično skupino, zavarovalnim statusom, kadilskim statusom, komorbidnosti, sočasna zdravila, vitalnimi znaki in laboratorijskimi izvidi ob sprejemu;

[§] v eni izmed statističnih modelov so izbrali samo tiste osebe, ki so podobne osebam v kohorti 1, zato je število vključenih manjše od razlike do 1376 oseb.

Tovrstnih metod se poslužujejo tudi regulatorne agencije, pa tudi oblikovalci zdravstvene politike (50–52).

Velike in kvalitetne opazovalne raziskave nam lahko ob pomanjkanju izsledkov kliničnih preskušanj pomagajo tudi pri oceni učinkov klorokina oz. hidroksiklorokina (preglednica 4). Po razmahu epidemije v ZDA smo namreč dočakali objavo velikih, dobro načrtovanih in izvedenih opazovalnih raziskav, v katerih so se avtorji posluževali sofisticiranih statističnih metod za zmanjšanje tveganja za pristranskost zaradi neintervencijske zasnove raziskave (10, 11). Nobena izmed teh dveh raziskav ni opisala boljših izidov bolezni covid-19 ob zdravljenju s klorokinom oz. hidroksiklorokinom, ravno obratno, pri nekaterih raziskavah so zaznali pomembne varnostne signale, ki jih opisujemo v poglavju 6.3. V maju 2020 je bila objavljena velika opazovalna raziskava Mehre s sodelavci (53), ki je zajela skoraj 100.000 ljudi, vendar je bila zaradi neuspešnega zagotavljanja transparentnosti podatkov s strani avtorjev umaknjena iz objave (54).

Rezultatov opazovalnih raziskav seveda ne moremo interpretirati kot dokončen dokaz o neučinkovitosti ali škodljivosti proučevanih intervencij. Ob natančnem proučevanju metod se vselej izkaže, da so hidroksiklorokin dobivali vseplošno – akutno in kronično – bolj bolni bolniki, kar je pričakovano, saj pri teh pričakujemo najslabše izide bolezni. Zelo verjetno je, da so bila začetna poročila pretirano optimistična, zato zaključujemo, da je uporaba hidroksiklorokina (oz. klorokina) izven kliničnega preskušanja nesprejemljiva.

6.3 TOKSIČNOST

Klorokin in hidroksiklorokin ob kronični uporabi za običajne indikacije (prvi kot antimalarik, drugi kot protivnetna učinkovina) ob dolgotrajni uporabi izkazujeta predvsem resno očesno toksičnost, ki se kaže kot retinopatija in se pojavi pri znatnem deležu bolnikov po dolgoletni uporabi, ob kratkotrajni uporabi pa najverjetneje ni problematična (34).

Srčna toksičnost, ki se kaže z upočasnjeno depolarizacijo in povečanjem tveganja za prekatne aritmije, ob kronični uporabi ni zelo pogosta, ob akutni pa lahko postane pomembnejša, saj imamo ob zdravljenju covid-19 opraviti z bolj bolnimi ljudmi z večjo prevalenco strukturnih srčnih bolezni, pa tudi drugih dejavnikov tveganja za aritmije, npr. hipoksemije, elektrolitskih motenj, akutne ledvične odpovedi, ki povzročijo kopičenje obeh zdravil, akutne kardiomiopatije ... (42, 55). Zaradi pogoste sočasne uporabe z makrolidi velja omeniti, da so tudi slednji učinkovine z znanimi aritmogenimi lastnostmi (55).

Večja srčna toksičnost zdravil je pri bolnikih s covid-19 pričakovana in je zato pomemben dejavnik pri zdravljenju covid-19. V raziskavi Rosenberga s sodelavci so srčni zastoj ugotovili pri 15 % bolnikov, ki so prejeli kombinacijo hidroksiklorokina in azitromicina. Opozarjamo, da je bila to skupina zelo bolnih ljudi s 25-odstotno bolnišnično smrtnostjo, ki je bila dvakrat večja kot pri kontrolni skupini (10). To pa pomeni, da vseh srčnih dogodkov z veliko verjetnostjo ne moremo pripisati zgolj zdravilom.

Omenimo še randomizirano klinično raziskavo Borbe s sodelavci iz Brazilije, ki je bila primarno zasnovana za ugotavljanje varnosti klorokina (56). V tej raziskavi so vsi bolniki prejeli klorokin, randomizirali pa so jih v dve roki, v prvi so prejeli velik odmerek klorokina-baze (2 × 600 mg 10 dni), v drugi pa majhen odmerek (2 × 450 mg 1 dan, nato 1 × 450 mg 4 dni). Od prvotno načrtovanega vzorca 440 bolnikov so jih vključili zgolj 81 zaradi predčasne prekinitve raziskave. V roki, ki je prejela velik odmerek, so namreč ugotovili 39-odstotno smrtnost, v roki z manjšim odmerkom pa 15-odstotno. Prevalenca srčnih bolezni je bila v obeh rokah nesimetrično porazdeljena, najverjetneje zaradi predčasnega zaključka in posledično manjšega vzorca. Preiskovanci, ki so prejeli velik odmerek, so imeli več kroničnih bolezni srca (5/41 v roki z velikim odmerkom vs. 0/40 v roki z majhnim) in so bili tudi akutno bolj bolni. Vsi bolniki so prejeli še azitromicin, večina pa jih je prejela tudi oseltamivir. Ponovno lahko zaključimo, da smrtnost ni nujno večja samo zaradi prejetja enega ali več zdravil za zdravljenje covid-19. Navedeni podatki tudi ne pomenijo, da imamo močne dokaze o toksičnosti klorokina oz. hidroksiklorokina, zagotovo pa je opozoril o možni škodljivosti dovolj, da ju ne moremo obravnavati kot zelo varni učinkovini.

7 SKLEP

Izmed zdravil, ki jih obravnavamo v tem članku (remdesivir, lopinavir z ritonavirjem, favipiravir in (hidroksi)klorokin), za zdravljenje covid-19 največ obeta remdesivir. Glede na do sedaj znane podatke o klinični učinkovitosti teh zdravil pa ocenjujemo, da je malo verjetno, da bi katero od teh zdravil pomembno krojilo usodo človeštva v boju z novo boleznijo. Spodbudna je pobuda SZO in njena vloga pri koordiniranju klinične raziskave s kontrolno skupino svetovnih razsežnosti, zaskrbljujoč pa je neracionalen odziv strokovne in

znanstvene skupnosti ter uredniške politike znanstvenih revij, ki smo mu bili priča v zgodbah o hidroksi(klorokinu). Široko uporabo zdravil morajo podpirati izsledki dovolj velikih kliničnih raziskav, to pa mora veljati ne le na papirju in v priporočilih raznih združenj ter organizacij, temveč tudi v vsakodnevni klinični praksi.

8 LITERATURA

1. Freedman B. Equipose and the ethics of clinical research. *NEJM*. 1987;317:141–5.
2. Rome BN, Avorn J. Drug Evaluation during the Covid-19 Pandemic. *N Engl J Med*. 2020 Apr 14;NEJMp2009457.
3. Eichler H, Cavaleri M, Enzmann H, Scotti F, Sepodes B, Sweeney F, et al. Clinical trials for Covid-19: can we better use the short window of opportunity? *Clin Pharmacol Ther*. 2020 May 14;cpt.1891.
4. Kalil AC. Treating COVID-19—Off-Label Drug Use, Compassionate Use, and Randomized Clinical Trials During Pandemics. *JAMA*. 2020 May 19;323(19):1897.
5. Wang Y, Zhang D, Du PG, Du PR, Zhao PJ, Jin PY, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19 : a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2020;6736(20):1–10.
6. Tang W, Cao Z, Han M, Wang Z, Chen J, Sun W, et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. *Bmj*. 2020;(April):m1849.
7. Stockman LJ, Bellamy R, Garner P. SARS: Systematic Review of Treatment Effects. *PLoS Med*. 2006;3(9):e343.
8. Sorbello A, Jones SC, Carter W, Struble K, Boucher R, Truffa M, et al. Emergency Use Authorization for Intravenous Peramivir: Evaluation of Safety in the Treatment of Hospitalized Patients Infected With 2009 H1N1 Influenza A Virus. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul 1;55(1):1–7.
9. Gautret P, Lagier J, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Mar;105949.
10. Rosenberg ES, Dufort EM, Udo T, Wilberschied LA, Kumar J, Tesoriero J, et al. Association of Treatment With Hydroxychloroquine or Azithromycin With In-Hospital Mortality in Patients With COVID-19 in New York State. *Jama*. 2020;12203:1–10.
11. Geleris J, Sun Y, Platt J, Zucker J, Baldwin M, Hripcsak G, et al. Observational Study of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7;NEJMoa2012410.
12. Evropska agencija za zdravila. European Public Assessment Reports. www.ema.europa.eu. Dostop: 22-05-2020.
13. Svetovna, Zdravstvena, Organizacija. Solidarity clinical trial for Covid treatment. www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-n-cov/solidarity-clinical-trial-for-covid-19-treatments. Dostop: 22-05-2020.
14. Bhimraj A, Morgan R, Hirsh Shumaker A, Lavergne V, Baden L, Cheng V et al. Infectious Diseases Society of America guidelines on the treatment and management of patients with COVID-19. www.idsociety.org/COVID19guidelines. Dostop: 22-05-2020.
15. Lian J, Jin X, Hao S, Cai H, Zhang S, Zheng L, et al. Analysis of Epidemiological and Clinical Features in Older Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outside Wuhan. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 25;44(8):085201.
16. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. Solomon CG, editor. *N Engl J Med*. 2020 Apr 24;NEJMcp2009249.
17. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 15;NEJMcp2009575.
18. National Institute of Health. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. <https://covid19treatmentguidelines.nih.gov>. Dostop: 22-05-2020.
19. Jurekovič V. Osnovni principi mehanske ventilacije, konvencionalne oblike. In: Miha Mežnar, Primož Gradišek GM, editor. ŠOLA intenzivne medicine 2017 : 1 letnik : mehanska ventilacija in hemodinamska nestabilnost. Ljubljana, Slovenija: Slovensko združenje za intenzivno medicino: Katedra za anesteziologijo in reanimatologijo, Medicinska fakulteta; 2017.
20. Gaborit BJ, Bergmann J-F, Mussini C, Arribas JR, Behrens G, Walmsley S, et al. Plea for multitargeted interventions for severe COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr;(January):19–20.
21. Mulangu S, Dodd LE, Davey RT, Tshiani Mbaya O, Proschan M, Mukadi D, et al. A Randomized, Controlled Trial of Ebola Virus Disease Therapeutics. *N Engl J Med*. 2019 Dec 12;381(24):2293–303.
22. Zdravila E agencija za. EMA recommends expanding remdesivir compassionate use to patients not on mechanical ventilation. www.ema.europa.eu. Dostop: 22-05-2020.
23. Grein J, Ohmagari N, Shin D, Diaz G, Asperges E, Castagna A, et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Apr 10;NEJMoa2007016.
24. Clinical trials: COVID-19. www.clinicaltrials.gov. Dostop: 22-05-2020.
25. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kail AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020;1–12.
26. Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, Marks KM, Bruno R, Montejano R, et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 27;NEJMoa2015301.
27. Evropska agencija za zdravila. EMA receives application for conditional authorisation of first COVID-19 treatment in the EU. www.ema.europa.eu. Dostop: 10-06-2020.
28. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7;382(19):1787–99.
29. K K. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 21;382(21):e68.
30. Dalerba P, Levin B, Thompson J. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 21;382(21):e68.
31. Hung IF, Lung K-C, Tso EY, Liu R, Chung TW, Chu M-Y, et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2020 May;6736(20):1–10.



32. Cai Q, Yang M, Liu D, Chen J, Shu D, Xia J, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering*. 2020 Mar;doi: 10.1016/j.eng.2020.03.007.
33. Chen C, Huang J, Cheng Z, Wu J, Chen S, Zhang Y, et al. Favipiravir versus Arbidol for COVID-19 : A Randomized Clinical. *medRxiv*. 2020;doi.org/10.1101/2020.03.17.20037432.
34. Zhou D, Dai SM, Tong Q. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *J Antimicrob Chemother*. 2020;(February):4–7.
35. Hashem AM, Alghamdi BS, Algaissi AA, Alshehri FS, Bukhari A, Alfaleh MA, et al. Therapeutic use of chloroquine and hydroxychloroquine in COVID-19 and other viral infections: A narrative review. *Travel Med Infect Dis*. 2020;101735.
36. Paton NI, Lee L, Xu Y, Ooi EE, Cheung YB, Archuleta S, et al. Chloroquine for influenza prevention: A randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(9):677–83.
37. Tricou V, Minh NN, van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, et al. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in vietnamese adults. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8).
38. Seth P, Mani H, Singh AK, Banaudha KK, Madhavan S, Sidhu GS, et al. Acceleration of viral replication and up-regulation of cytokine levels by antimalarials: Implications in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(2):180–6.
39. Roques P, Thiberville SD, Dupuis-Maguiraga L, Lum FM, Labadie K, Martinon F, et al. Paradoxical effect of chloroquine treatment in enhancing chikungunya virus infection. *Viruses*. 2018;10(5):1–18.
40. Guastalegname M, Vallone A. Could Chloroquine /Hydroxychloroquine Be Harmful in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment? *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 24;doi: 10.1093/cid/ciaa321.
41. Sharma A. Chloroquine paradox may cause more damage than help fight COVID-19. *Microbes Infect*. 2020 Apr;doi: 10.1016/j.micinf.2020.04.004.
42. Touret F, de Lamballerie X. Of chloroquine and COVID-19. *Antiviral Res*. 2020;177(February):104762.
43. Fung K, Chan P. Comment on: COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *J Antimicrob Chemother*. 2020;8–9.
44. Retraction Watch. Hydroxychloroquine-COVID-19 study did not meet publishing society's "expected standard". <https://retractionwatch.com/>. Dostop: 22-05-2020.
45. Bik E. Thoughts on the Gautret et al. paper about Hydroxychloroquine and Azithromycin treatment of COVID-19 infections. *Sci Integr Dig*. 2020;1–17.
46. Uradni list RS. Odlok o omejitvi predpisovanja in izdaje zdravil z učinkovino klorokin, hidroksiklorokin ali azitromicin. 2020. št. 43/20.
47. Molina JM, Delaugerre C, Goff J Le, Ponscarne D, Goldwirt L, Castro N De. No evidence of rapid antiviral clearance or clinical benefit with the combination of hydroxychloroquine and azithromycin in patients with severe COVID-19 infection. *Med Mal Infect*. 2020;2–3.
48. Chen J, Liu D, Liu L, Liu P, Xu Q, XIA L, et al. A pilot study of hydroxychloroquine in treatment of patients with common coronavirus disease-19 (COVID-19). 2020;(March):3–8.
49. Chen Z et al. Efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial. *medRxiv*. 2020;doi: 10.1101/2020.03.22.20040758.
50. Evropska agencija za zdravila. Real world evidence- an introduction; how is it relevant for the medicines regulatory system? www.ema.europa.eu. Dostop: 22-05-2020.
51. Ameriška agencija za zdravila in hrano. Real-World Evidence are playing an increasing role in health care decisions. www.fda.gov. Dostop: 22-05-2020.
52. NICE. The use of real world data for the estimation of treatment effects in NICE decision making. <http://nicedsu.org.uk>. Dostop: 22-05-2020.
53. Mehra MR, Desai SS, Ruschitzka F, Patel AN. Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. *Lancet*. 2020;6736(20):1–10.
54. Mehra MR, Ruschitzka F, Patel AN. Retraction— Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. *Lancet*. 2020 Jun;doi:10.1016/S0140-6736(20)31324-6.
55. CredibleMeds. Clinical Factors Associated with Prolonged QTc and / or TdP. www.QTFactors.org. Dostop: 22-05-2020.
56. Borba MGS, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Brito M, et al. 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. *JAMA Netw Open*. 2020;3(4.23):e208857.
57. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA*. 2020 Apr 13;2019:1–13.
58. Li Y, Xie Z, Lin W, Cai W, Wen C, Guan Y, et al. Efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol in adult patients with mild/moderate COVID-19: an exploratory randomized controlled trial. *Cell Press*. 2020 May;doi: 10.1016/j.medj.2020.04.001 (preproof).
59. Huang M et al, Tang T, Pang P, Li M, Ma R, Lu J, et al. Treating COVID-19 with Chloroquine. *J Mol Cell Biol*. 2020;12:322–5.
60. Yap C. Statistical review of Efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial Study Summary. 2020. doi: 10.5281/zenodo.3739134.

PROTIVIRUSNE UČINKOVINE PROTI SARS-COV-2 ZA ZDRAVLJENJE BOLEZNI COVID-19

ANTIVIRAL DRUGS AGAINST SARS-COV-2 FOR THE TREATMENT OF COVID-19

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.
Izr. prof. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.
Prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: tihomir.tomasic@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Novi koronavirus sodi med betakoronaviruse, ki vsebujejo enojno verigo RNA, obdano z nukleokapsido in ovito s fosfolipidno membransko ovojnico (1). Virus membrano pridobi z brstenjem iz človeških celic, zato je po strukturi zelo podobna membrani človeških celic. V membrano so

POVZETEK

Bolezen covid-19, ki jo povzroča novi koronavirus, je lahko tudi smrtna, zato je razvoj novih protivirusnih učinkovin z delovanjem proti SARS-CoV-2 izrednega pomena. V preglednem članku bomo predstavili makromolekulska prijemališča virusa SARS-CoV-2 kot potencialne tarče za razvoj zdravilnih učinkovin ter učinkovine ali kandidate za učinkovine, ki delujejo protivirusno in kažejo obetavne učinke v terapiji covid-19.

KLJUČNE BESEDE:

covid-19, koronavirus, protivirusne učinkovine, SARS-CoV-2

ABSTRACT

The covid-19 disease, which is caused by SARS-CoV-2, can be fatal. Therefore, there is an urgent need for the development of novel antiviral drugs against SARS-CoV-2. In this review article, we describe macromolecular structures of SARS-CoV-2 as potential targets for antiviral drugs. Furthermore, we present drugs or drug candidates with antiviral mode of action and promising effects in covid-19 therapy.

KEY WORDS:

antiviral drugs, coronavirus, covid-19, SARS-CoV-2

vgnezdeni strukturni glikoproteini, med katerimi so najbolj znani proteini S v obliki bodic (ali t. i. *spike proteins*) (1). Protein S se veže na encim angiotenzin konvertazo tipa 2 (ACE2), ki je prisoten na površini membrane pljučnih epitelijskih celic gostitelja (2). Poleg tega pomembnega strukturnega proteina S pa SARS-CoV-2 vsebuje še druge strukturne proteine, kot so proteini N (nukleokapsida, *nucleocapsid*), E (ovojnica, *envelope*) in M (membrana, *membrane*).

Virus SARS-CoV-2 vsebuje še šestnajst nestrukturnih proteinov, od katerih imajo nekateri encimsko funkcijo, kot so: od RNA odvisna RNA-polimeraza (RdRp), glavna cisteinska proteaza 3CLpro in papainu podobna proteaza PLpro (2, 3). Vse te makromolekulske tarče ponujajo odlično osnovo za načrtovanje zdravilnih učinkovin z delovanjem proti virusu SARS-CoV-2. Raziskave najintenzivnejše potekajo v smeri razvoja zaviralcev proteaze 3CLpro in RNA-polimeraze RdRp, za katere poznamo tudi kristalne strukture, ki omogočajo strukturno podprto načrtovanje (4).



Hiter razvoj potencialnih protivirusnih učinkovin omogoča velika podobnost virusa SARS-CoV-2 z že predhodno poznanimi virusoma SARS-CoV in MERS-CoV (5). Ta podobnost nam omogoča, da lahko v kratkem času testiramo veliko število znanih spojin z dokazanim delovanjem na SARS-CoV in MERS-CoV, s pomočjo česar so že identificirali potencialne protivirusne učinkovine, ki so v predkliničnih in kliničnih fazah razvoja (6). Za odkrivanje protivirusnih učinkovin in cepiv je ključnega pomena tudi interakcija med proteinom S in ACE2, saj je to začetni stik, ki omogoči vstop virusa v gostiteljsko celico (1). Hiter potek raziskav in pospešeno vrednotenje obetavnih spojin v kliničnih preskušanjih nam dajeta upanje, da bo kmalu na voljo varno in učinkovito zdravilo in/ali cepivo proti bolezni covid-19. V nadaljevanju bomo predstavili ključne spojine s protivirusnim delovanjem, predvsem njihov mehanizem delovanja, medtem ko so rezultati kliničnih preskušanj najobetavnějšíh spojin predstavljeni v članku *Z dokazi podprto zdravljenje covid-19 z zdravili v tej številki Farmaceutskega vestnika*.

2 PROTIVIRUSNE UČINKOVINE

Zaradi pandemičnih razsežnosti okužb z virusom SARS-CoV-2 raziskave v smeri razvoja protivirusnih učinkovin za zdravljenje covid-19 potekajo zelo intenzivno. Ker je razvoj zdravilne učinkovine dolgotrajen proces, ki lahko traja tudi več kot deset let, je v trenutnem položaju ključno, da identificiramo in v kliničnih preskušanjih najprej vrednotimo predvsem zdravilne učinkovine ali kandidate, ki so ali so že bili v kliničnih preskušanjih. Za te spojine poznamo številne podatke o varnosti, profil neželenih učinkov in tako lahko vrednotimo varnost in učinkovitost pri zdravljenju bolnikov s covid-19. Ta postopek odkrivanja zdravilnih učinkovin v angleščini imenujemo *drug repurposing* ali *drug repositioning* (7), ki pomeni, da znani učinkovini v novih kliničnih preskušanjih dokažemo varnost in učinkovitost za drugo indikacijo kot je ta, za katero je bila predhodno registrirana. Seveda obstaja bojazen, da nobena od že znanih učinkovin ne bo uspešna v kliničnih preskušanjih za zdravljenje covid-19, zato sta ključna tudi odkrivanje in razvoj novih spojin, od katerih želimo v članku izpostaviti predvsem spojino EIDD 2801. Prijemališča spojin s protivirusnim delovanjem so prikazana na sliki 1, iz katere je razvidno, da se lahko z majhnimi molekulami

vpletamo v različne faze življenjskega cikla virusa SARS-CoV-2.

2.1 UČINKOVINE, KI PREPREČUJEJO VSTOP VIRUSA V GOSTITELJSKO CELICO

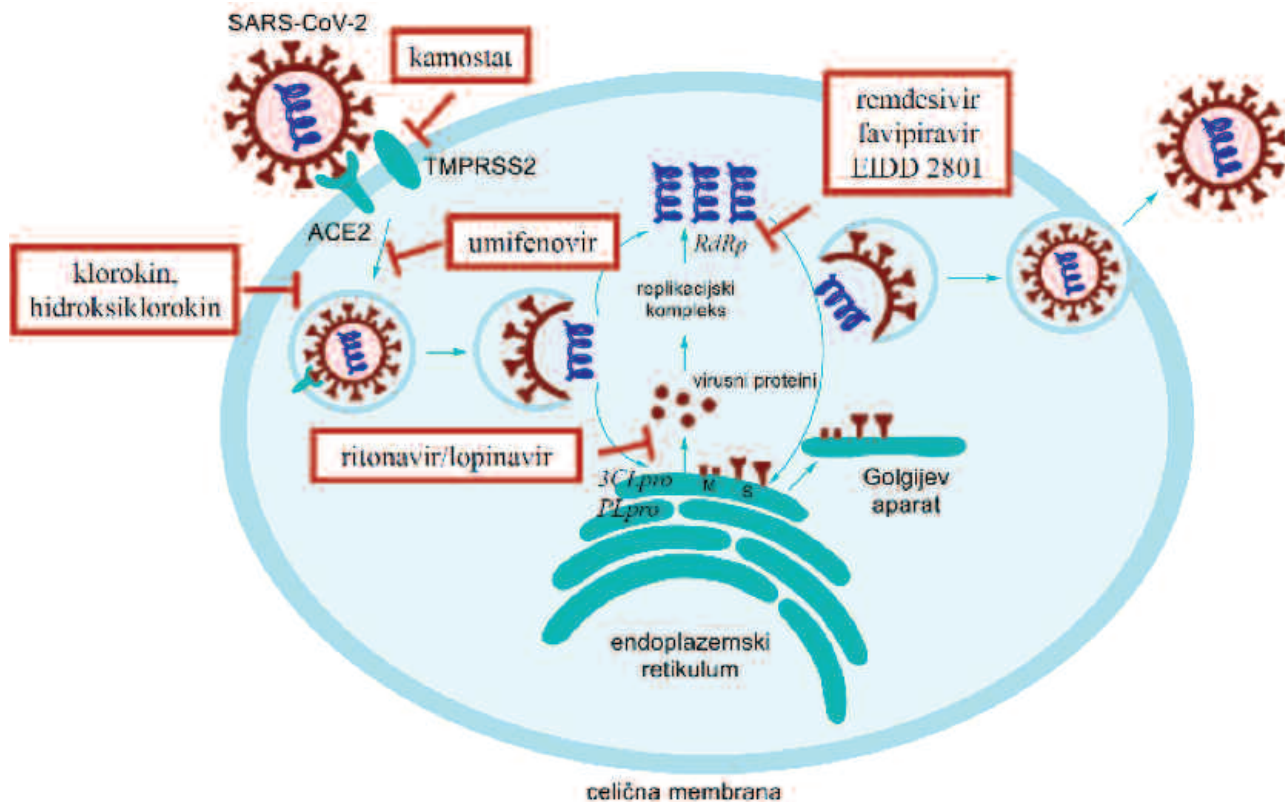
Pri preprečevanju vstopa virusa v celico lahko delujemo tako na virusne proteine kot tudi na proteine gostiteljske celice ali pa s spremembo pH v endosomih vplivamo na endocitozo.

2.1.1 Kamostat

Kamostat (slika 2) deluje kot zaviralec serin proteaz in je od leta 2006 registriran na Japonskem za zdravljenje kroničnega pankreatitisa. Deluje tudi kot zaviralec transmembranske serin proteaze 2 (TMPRSS2) na membrani gostiteljske celice, ki ima ključno vlogo pri vstopu SARS-CoV-2 v celico. Encim TMPRSS2 je namreč odgovoren za cepitev in aktivacijo proteina S SARS-CoV-2, ki se veže na receptor ACE2 gostiteljske celice. Na celični liniji Calu-3 so pokazali, da lahko z zaviranjem TMPRSS2 s kamostatom preprečimo vstop različnim koronavirusom, kot so SARS-CoV, MERS-CoV in SARS-CoV-2, in dosežemo tudi zmanjšanje okužbe celic s SARS-CoV-2 (2). Na osnovi te raziskave so predlagali kamostat kot potencialno učinkovino za zdravljenje covid-19, vendar rezultati kliničnih raziskav še niso znani.

2.1.2 Umifenovir

Umifenovir (slika 2), poznan tudi kot arbidol, je širokospektralna protivirusna spojina, ki je v Rusiji in na Kitajskem v uporabi za zdravljenje gripe. Mehanizem delovanja umifenovirja je večplasten, saj opisujejo tako neposredno virucidno delovanje kot tudi vpliv v različnih stopnjah virusnega cikla, kot sta vstop virusa v gostiteljsko celico in replikacija. Umifenovir je hidrofobna, šibko bazična spojina, ki se zaradi svoje planarne strukture vgrajuje v membrane. Neposredno protivirusno delovanje tako povezujejo z interakcijo z aromatskimi aminokislinskimi ostanki strukturnih virusnih glikoproteinov in/ali z virusno lipidno ovojnico (8). Z rentgensko kristalografijo so pokazali tudi, da se umifenovir veže na hemaglutinin virusa gripe in na ta način prepreči njegovo konformacijsko spremembo, ki je potrebna za zlitje membran in s tem vstop virusa v gostiteljsko celico (9). Ker so na Kitajskem v zgodnjih fazah poteka bolezni covid-19 uporabljali tudi nekatere učinkovine za zdravljenje gripe, so raziskali protivirusno delovanje umifenovirja, baloksavirja,



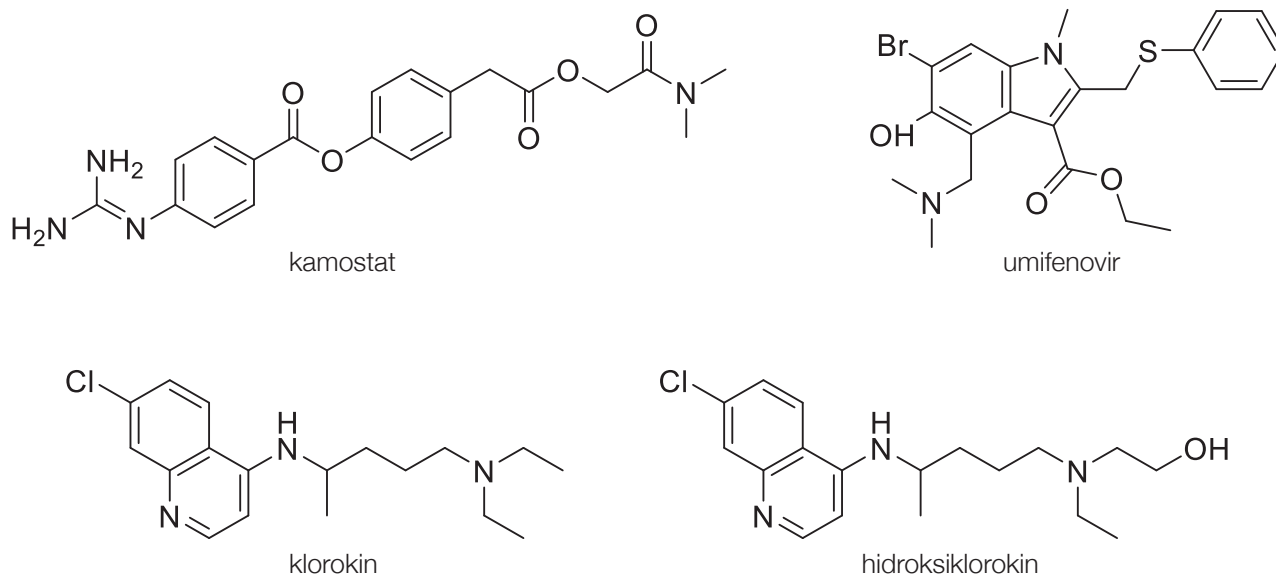
Slika 1: Prijemališča učinkovin s protivirusnim delovanjem proti SARS-CoV-2.
 Figure 1: Targets of drugs displaying antiviral activity against SARS-CoV-2.

laninamivirja, oseltamivirja, peramivirja in zanamivirja proti SARS-CoV-2 *in vitro*. Med temi učinkovinami je najmočnejše delovanje izkazoval umifenovir, za katerega so ugotovili, da preprečuje vezavo SARS-CoV-2 na gostiteljsko celico in vpliva tudi na sproščanje virusa iz znotrajceličnih veziklov, ki nastanejo po vstopu virusa v celico (10). Rezultati manjše klinične raziskave, ki je vključevala 86 bolnikov z blažjo do zmerno obliko covid-19, od katerih jih je 34 prejelo kombinacijo lopinavir/ritonavir, 35 umifenovir, 17 pa nobene protivirusne terapije, so pokazali, da monoterapija z umifenovirjem nima pomembnega učinka na potek bolezni (11).

2.1.3 Klorokin in hidroksiklorokin

Klorokin in hidroksiklorokin (slika 2) sta peroralno uporabni zdravilni učinkovini, ki ju že vrsto let uporabljamo v profilaksi in za zdravljenje malarije. Hidroksiklorokin izkazuje tudi imunomodulatorno delovanje in je pridobil dovoljenje za promet za zdravljenje revmatoidnega artritisa, porfirije in generaliziranega lupusa eritematozusa. Za obe učinkovini

je znano tudi, da delujeta proti nekaterim RNA-virusom, pri čemer ima hidroksiklorokin močnejše protivirusno delovanje proti SARS-CoV-2 (12). Mehanizem delovanja teh dveh učinkovin poteka na več nivojih. Znano je, da klorokin in hidroksiklorokin zaradi bazičnih lastnosti zvišata pH v znotrajceličnih organelih, kot so endosomi in lizosomi. Ker je kisel pH v endosomih predpogoj za zlitje virusne membrane z membrano lizosoma, na ta način preprečita vstop SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico. Klorokin lahko dodatno prepreči vstop virusa v celico tudi preko vpliva na posttranslacijsko glikozilacijo receptorja ACE2 in proteina S SARS-CoV-2. Klorokin deluje tudi kot ionofor za cinkove ione, ki pri večji znotrajcelični koncentraciji zmanjšajo biosintezo virusne od RNA odvisne RNA-polimeraze. Predvsem hidroksiklorokin dodatno deluje tudi protivnetno, in sicer preko zmanjšanja izražanja TNF α , interleukina 1 β , interleukina 6 in zmanjšanja aktivacije signalne poti MAPK-kinaze, kar bi lahko imelo ugoden vpliv na potek bolezni covid-19 v drugi fazi, preden pride do pojava citokinske nevihte (13).



Slika 2: Učinkovine, ki preprečujejo vstop virusa SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico.

Figure 2: SARS-CoV-2 host cell entry inhibitors.

2.2 ZAVIRALCI OD RNA ODVISNE RNA-POLIMERAZE SARS-COV-2

RdRp ima ključno vlogo pri replikaciji virusa SARS-CoV-2, zato je pomembna tarča za odkrivanje protivirusnih učinkovin. RdRp SARS-CoV-2 in SARS-CoV imata več kot 95-odstotno podobnost aminokislinskega zaporedja, kar je omogočilo hitro testiranje velikega nabora spojin, ki so predhodno že izkazovale delovanje proti SARS-CoV, pa tudi ostalim virusom z RNA (14, 15).

2.2.1 Favipiravir

Favipiravir (T-705, slika 3) je protivirusna učinkovina, ki so jo odkrili z rešetanjem kemijskih knjižnic. Deluje tako, da selektivno zavira RdRp. Natančnejši mehanizem delovanja razkriva, da gre za predzdravilo, saj se favipiravir šele znotraj celice s celičnimi encimi fosforibozilira do aktivne oblike, favipiravir ribofuranozil-5'-trifosfata, tega pa nato kot substrat (lažni purinski nukleotid) prepozna RdRp, kar vodi v zaviranje RNA-polimerazne aktivnosti (16, 17). Vključitev lažnih nukleotidov v virusno RNA povzroči njeno visoko stopnjo mutacij, ki ustvarjajo neživi virusni fenotip (18). Ker je katalitična domena RdRp ohranjena med številnimi tipi virusov RNA, ima favipiravir širokospektralno protivirusno delovanje (16). Učinkovit je ne le proti številnim tipom in podtipom virusa gripe, vključno s podtipom ptičje gripe, temveč tudi ostalim virusom RNA, kot so arenavirusi, han-

tavirusi, bunjavirusi, norovirusi in filovirusi, ki povzročajo hemoragično mrzlico (16, 18, 19). Zaradi edinstvenega mehanizma delovanja favipiravir predstavlja tudi obetavno zdravilno učinkovino v boju proti ostalim virusom RNA, kot je SARS-CoV-2.

Zdravilo favipiravir je od leta 2014 registrirano na Japonskem za zdravljenje gripe, vendar le za posamezne podtipove virusa in v posebnih okoliščinah bolezni, proučevali so ga tudi pri zdravljenju ebole (19). Favipiravir je teratogen, kar zahteva dodatno previdnost pri uporabi. Sicer pa ima v dosedanjih kliničnih raziskavah ugoden profil neželenih učinkov z blagimi gastrointestinalnimi težavami in asimptomatskimi dvigi sečne kisline, možnost peroralnega zdravljenja in relativno majhno tveganje za interakcije z zdravili pa predstavljajo dodatne prednosti zdravila (20). Trenutno poteka več kliničnih raziskav, ki proučujejo učinkovitost favipiravirja kot samostojno ali kombinirano zdravljenje covid-19.

2.2.2 Remdesivir

Remdesivir (GS-5734, slika 4) so razvili za zdravljenje okužb z virusom ebola, a še nima dovoljenja za promet (21, 22). Učinkovina je fosforamidatno predzdravilo adenozin C-nukleozida, ki se po mehanizmu podobnega predzdravila sofosbuvirja v jetrih z esterazami pretvori do ustreznega fosforamidata, nato pa s tkivnimi fosforamidazami do 5'-monofosfata. Slednji se v celicah pretvori do trifosfata (slika 4) in zavira delovanje virusne

RdRp – upočasnjuje sintezo virusne RNA, kot nadomestni substrat tekmuje z adenozin trifosfatom za vgradnjo v RNA in ovira kontrolno branje (vnaša mutacije v virusni genom). Tako upočasnjuje ali zavira sintezo virusne RNA (23, 24). Omenjeni mehanizem delovanja nakazuje na možnost delovanja proti širokemu spektru virusov RNA. V raziskavah na človeških celicah *in vitro* je remdesivir izkazal učinkovitost proti različnim virusom RNA, vključno s SARS-CoV, MERS-CoV in SARS-CoV-2. V raziskavah na poskusnih živalih je ob zgodnjem začetku zdravljenja okužbe zavrl replikacijo virusa ebola v opicah rezus ter virusa SARS-CoV v miših. Remdesivir je glede na rezultate manjših kliničnih raziskav ena od najbolj obetavnih spojin za zdravljenje covid-19 in je na voljo za sočutno uporabo pri bolnikih, ki nimajo možnosti vključitve v klinična preskušanja. Na osnovi dosedanjih podatkov o varnosti in učinkovitosti pri zdravljenju covid-19 je na Japonskem pridobil dovoljenje za promet.

2.2.3 EIDD 2801

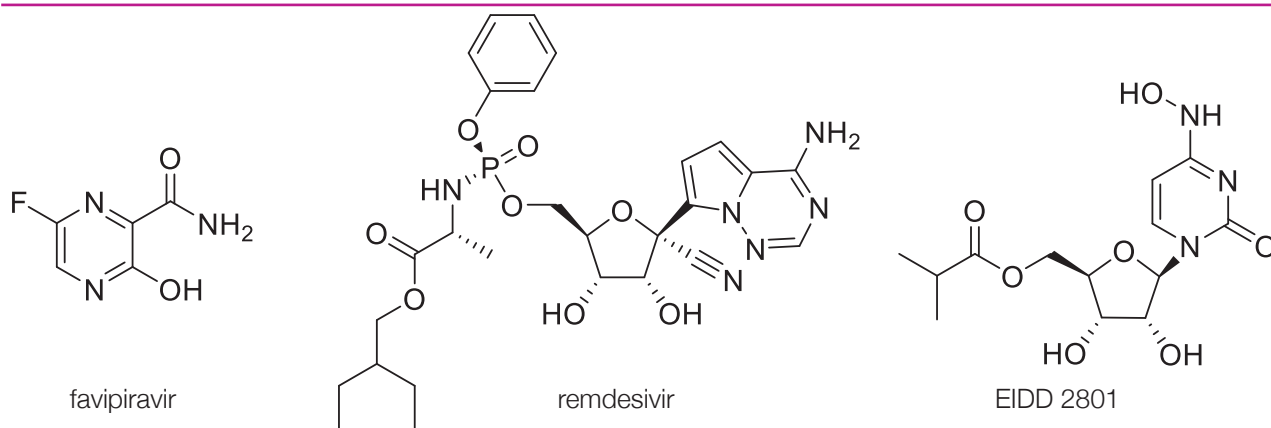
EIDD 2801 (slika 3) je peroralno uporabno predzdravilo z ugodnimi farmakokinetičnimi lastnostmi, ki je v predklinični fazi razvoja in ima širok spekter delovanja proti virusom RNA (25). Izopropilni ester EIDD 2801 se po zaužitju hidrolizira do β -D- N^4 -hidroksicitidina, ki se nato pretvori v ustrezeni *N*-hidroksicitidintrifosfat, ki zavira RdRp koronavirusov, vključno s SARS-CoV-2, pri replikaciji pa ga ta encim vgradi v nastajajočo verigo virusne RNA. Po vgradnji v RNA ne deluje kot prekinjevalec verige, temveč sproži nastanek zelo velikega števila mutacij virusne RNA, kar pri translaciji vodi do okvarjenih,

nefunkcionalnih virusnih proteinov, s čimer je doseženo protivirusno delovanje. Potencial za razvoj rezistence proti EIDD 2801 je zelo nizek (26). Ena od pomembnih lastnosti EIDD 2801 je tudi, da v primeru MERS-CoV deluje na proti remdesivirju odporen MERS-CoV. Ker sta mutirani aminokislini (F480L in/ali V557L) ohranjeni v RdRp večine koronavirusov, predstavljata potencial za razvoj rezistence proti remdesivirju tudi pri SARS-CoV-2 (26). Delovanje EIDD 2801 je tako obetavno za nadaljnji razvoj in možnost kombinirane terapije z remdesivirjem v primeru klinično pomembnega razvoja rezistence SARS-CoV-2 proti remdesivirju. Obetavno protivirusno delovanje EIDD 2801 *in vitro* in *in vivo* nakazuje velik potencial te spojine za zdravljenje covid-19, vendar bo treba počakati na rezultate načrtovanih kliničnih raziskav, ki bodo dokazale tako varnost kot učinkovitost te spojine.

2.3 ZAVIRALCI VIRUSNE PROTEAZE 3CLPRO

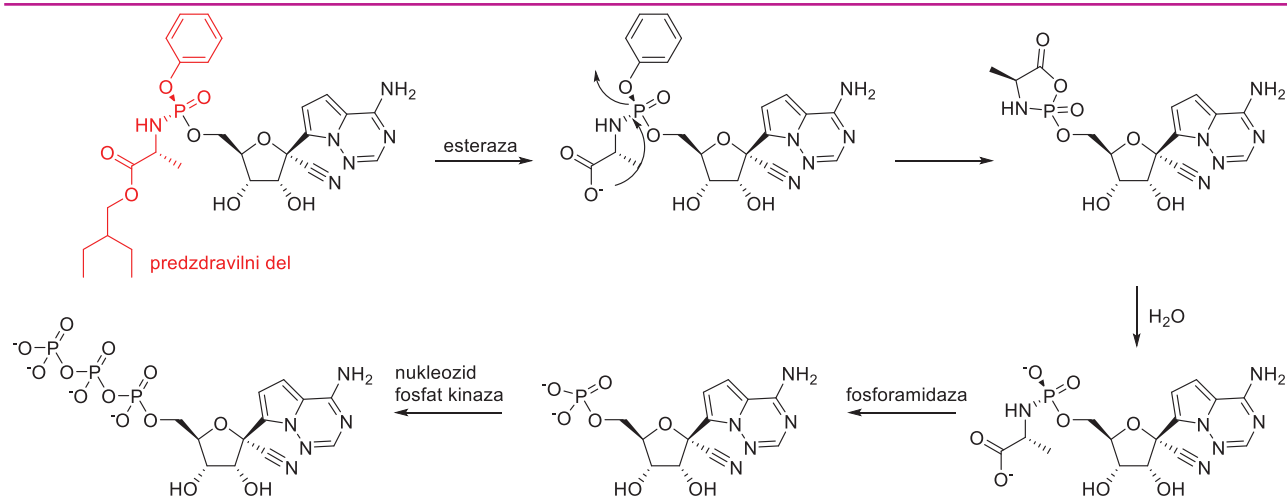
Lopinavir/ritonavir

Učinkovini lopinavir in ritonavir (slika 5) sta zaviralca aspartat proteaze virusa HIV-1 in ju uporabljamo v terapiji okužb z virusom HIV. Lopinavir so razvili kot optimiziran analog ritonavirja z delovanjem na proti ritonavirju odpornemu HIV-1. Učinkovini uporabljamo v kombinaciji, saj ritonavir deluje kot zaviralec citokromov P450, s čimer dosežemo višjo plazemsko koncentracijo lopinavirja (27). Pri SARS-CoV-2 predpostavljajo, da učinkovini zavirata cistein proteazo 3CLpro, s čimer preprečita cepitev virusnega poliproteina



Slika 3: Zaviralci od RNA odvisne RNA-polimeraze z delovanjem proti SARS-CoV-2.

Figure 3: RNA-dependent RNA polymerase inhibitors with antiviral activity against SARS-CoV-2.



trifosfonukleotidna oblika remdesivirja - lažni substrat za od RNA odvisno RNA polimerazo

Slika 4: Shema bioaktivacije remdesivirja.

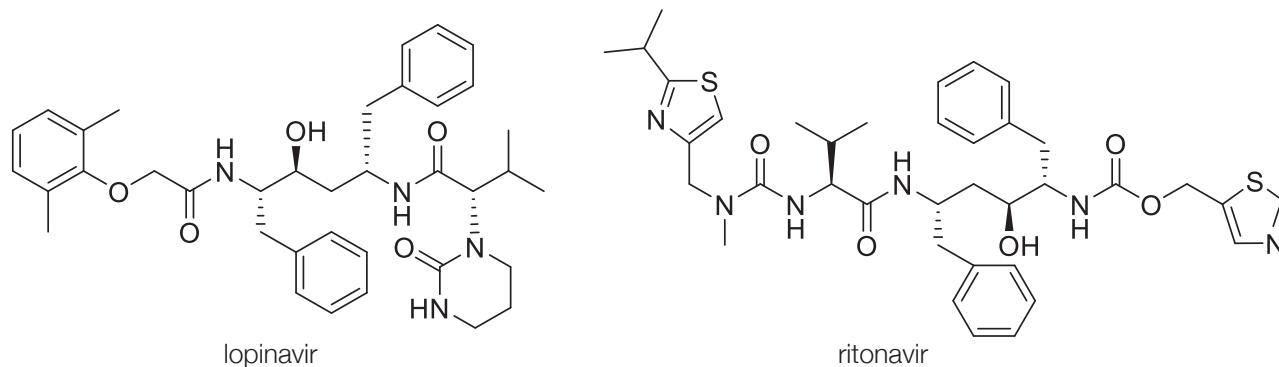
Figure 4: Bioactivation of remdesivir.

na funkcionalne proteine in s tem dosežeta protivirusno delovanje.

2.4 INTERFERONI

Interferoni so skupina citokinov, ki jih izločajo številne vrste gostiteljskih celic kot odziv na vdor patogenov, tudi virusa SARS-CoV-2, in na ta način uravnavajo odziv imunskega sistema. Sproščeni interferoni ščitijo celice, iz katerih se sproščajo, kot tudi celice v njihovi neposredni bližini pred napadom virusov. Pri virusnih okužbah imajo pomembno vlogo predvsem interferoni α in β , ki jih uvrščamo med interferone tipa I. Delujejo

tako, da inducirajo nastanek protein kinaze R, ki nespecifično zavira sintezo proteinov, in RNaze L, ki razgradi celično in virusno RNA. Posledica tega je zmanjševanje nastajanja novih kopij virusa. Interferoni spodbujajo tudi izražanje poglobitnega histokompatibilnega kompleksa tipa I, s čimer stimulirajo delovanje citotoksičnih limfocitov T CD8+, aktivirajo naravne celice ubijalke in izzovejo zorenje dendritičnih celic. Ker koronavirusi, tudi SARS-CoV-2, nosijo genski zapis za proteine, ki posredno zavirajo nastajanje interferonov tipa I in tako delujejo imunosupresivno, interferoni tipa I predstavljajo obetavne kandidate za zdravljenje bolezni covid-19 (28, 29).



Slika 5: Zaviralca cistein proteaze 3CLpro virusa SARS-CoV-2.

Figure 5: SARS-CoV-2 cysteine protease 3CLpro inhibitors.

3 SKLEP

Odkrivanje potencialnih kandidatov za zdravljenje covid-19 poteka zelo intenzivno tako v predkliničnih kot tudi v kliničnih fazah razvoja s ciljanjem različnih stopenj življenjskega cikla virusa SARS-CoV-2. Pravi potencial predstavljenih učinkovin za zdravljenje covid-19 bo znan šele po rezultatih randomiziranih kliničnih raziskav, ki trenutno potekajo na velikem številu bolnikov. Nenazadnje pa je zelo pomemben tudi predklinični razvoj novih strukturnih tipov spojin in spojin z novimi mehanizmi delovanja za uspešen boj s koronavirusi, ne samo SARS-CoV-2, tudi v prihodnosti.

4 LITERATURA

1. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020 Mar;367(6485):1444–8.
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr;181(2):271–280.e8.
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):265–9.
4. Ghosh AK, Brindisi M, Shahabi D, Chapman ME, Mesecar AD. Drug Development and Medicinal Chemistry Efforts toward SARS-Coronavirus and Covid-19 Therapeutics. *ChemMedChem*. 2020 Apr; doi: 10.1002/cmdc.202000223.
5. Morse JS, Lalonde T, Xu S, Liu WR. Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *ChemBioChem*. 2020 Mar;21(5):730–8.
6. Zhang J, Xie B, Hashimoto K. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis. *Brain Behav Immun*. 2020 Apr; <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.046>.
7. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):41–58.
8. Blaising J, Polyak SJ, Pécheur E-I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res*. 2014 Jul;107:84–94.
9. Kadam RU, Wilson IA. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 Jan;114(2):206–14.
10. Wang X, Cao R, Zhang H, Liu J, Xu M, Hu H, et al. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov*. 2020 May;6(1):1–5.
11. Li Y, Xie Z, Lin W, Cai W, Wen C, Guan Y, et al. Efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol in adult patients with mild/moderate COVID-19: an exploratory randomized controlled trial. *Med*. 2020 May; <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.04.001>
12. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov*. 2020 Dec;6(1):16.
13. Zhou D, Dai S-M, Tong Q. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Mar; dkaa169.
14. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan;9(1):221–36.
15. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 Feb;395(10224):565–74.
16. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(7):449–63.
17. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*. 2013 Nov;100(2):446–54.
18. Baranovich T, Wong S-S, Armstrong J, Marjuki H, Webby RJ, Webster RG, et al. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J Virol*. 2013 Apr;87(7):3741–51.
19. Sissoko D, Laouenan C, Folkesson E, M'Lebing A-B, Beavogui A-H, Baize S, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med*. 2016 Mar;13(3):e1001967.
20. Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare Japan. Report on the Deliberation results: Avigan Tablet 200 mg 4 March 2014 [Internet]. [cited 2020 May 24]. Available from: <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf>.
21. Ferner RE, Aronson JK. Remdesivir in COVID-19. *BMJ*. 2020 Apr;369:m1610.
22. Scavone C, Brusco S, Bertini M, Sportiello L, Rafaniello C, Zoccoli A, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *Br J Pharmacol*. 2020 Apr;
23. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*. 2020 May;395(10236):1569–78.
24. Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, Simeonov A, Shen M, Patnaik S, et al. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent Sci*. 2020 May;6(5):672–683.
25. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med*. 2020 Apr; 12(541):eabb5883.



26. Agostini ML, Pruijssers AJ, Chappell JD, Gribble J, Lu X, Andres EL, et al. Small-Molecule Antiviral β -d-N4-Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance. *J Virol* 2019 Nov;93(24):e01348-19.
27. Kaletra SmPC [Internet]. [cited 2020 May 24]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kaletra-epar-product-information_en.pdf.
28. Shalhoub S. Interferon beta-1b for COVID-19. *The Lancet*. 2020 May;S0140673620311016.
29. Lokugamage KG, Hage A, Schindewolf C, Rajsbaum R, Menachery VD. SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv preprint*; <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.07.982264>.

PODPORNO ZDRAVLJENJE COVID-19 IN PREPREČEVANJE OKUŽBE S SARS-COV-2

SUPPORTIVE THERAPY FOR COVID-19 AND PREVENTING SARS-COV-2 INFECTION

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.
Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.
Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: mojca.lunder@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

V obdobjih, ko so virusne okužbe pogostejše, posegamo po različnih pripravkih in prehranskih dopolnilih, s katerimi

POVZETEK

Ob pojavu pandemije bolezni covid-19 se je povečalo zanimanje za nekatera prehranska dopolnila, zdravila iz skupine nesteroidnih antirevmatikov, razkužila in obrazne maske. Ob številnih nasprotujočih si informacijah je vloga farmacevta pri svetovanju izjemno pomembna. Prehranska dopolnila, kot so vitamin C, vitamin D in cinkove soli, lahko pomembno prispevajo k splošnemu zdravstvenemu stanju pri pomanjkljivi prehrani in v zimskem obdobju, a dokazov o njihovi zaščitni vlogi pri preprečevanju ali zdravljenju covid-19 ni. Znanstvene raziskave so se poglobile v ugotavljanje, ali lahko jemanje nekaterih učinkovin, med katere sodi tudi ibuprofen, poslabša potek te bolezni. Do sedaj zbrani podatki ne kličejo po posebnih opozorilih in prenehanju jemanja. V smislu preventive bodo razkužila in obrazne maske še nekaj časa aktualni, zato sta pomembni njihova pravilna in varna raba.

KLJUČNE BESEDE:

covid-19, NSAR, obrazne maske, prehranska dopolnila, razkužila

ABSTRACT

With the onset of the covid-19 pandemic, there has been an increased interest in certain dietary supplements, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disinfectants and face masks. With a lot of contradictory information, the role of a pharmacist in counseling is extremely important. Dietary supplements such as vitamin C, vitamin D and zinc salts can make an important contribution to overall health in malnutrition and during winter season, however, there is no evidence for their protective role in prevention or treatment of covid-19. Scientific research has been committed to determine whether taking certain medicines, including ibuprofen, can worsen the course of covid-19. Data collected thus far does not call for special warnings and interruption of their usage. In terms of prevention, disinfectants and face masks will remain relevant for some time, so their correct and safe use is important.

KEY WORDS:

covid-19, dietary supplements, disinfectants, face masks, NSAID



želimo okrepiti imunski sistem, kot so vitamini, cinkove soli, esencialne aminokisliline in različni rastlinski pripravki. Ko se simptomi okužbe že pojavijo, pa jih najpogosteje lajšamo z analgetiki in antipiretiki, med katere sodi tudi skupina nesteroidnih antirevmatikov (NSAR). V času pandemije koronavirusne bolezni 2019 (covid-19) se je zanimanje za ta prehranska dopolnila in zdravila močno povečalo. Pojavila so se tudi vprašanja o smiselnosti in predvsem varnosti njihove uporabe. Ob številnih nasprotujočih si informacijah je vloga farmacevta v lekarni izjemno pomembna.

Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) je med priporočili za preprečevanje okužbe svetoval tudi uporabo obraznih mask in razkužil za roke in površine. Strokovne skupine vlad po svetu so tudi pozivale pristojne službe in prebivalstvo k razkuževanju javnih površin in skupnih prostorov v večstanovanjskih objektih. Skladno s tem se je v lekarnah in specializiranih trgovinah povečalo povpraševanje po razkužilih in zaščitni opremi in porajajo se vprašanja, povezana z izbiro in ustrezno rabo teh pripomočkov.

V prispevku želimo predstaviti znanstvene osnove, povezane z uporabo prehranskih dopolnil, zdravil iz skupine NSAR, razkužil in obraznih mask, ki so ob pojavu pandemije predmet velikega zanimanja.

2 PREHRANSKA DOPOLNILA

2.1 VITAMIN C

V času pandemije je poraslo zanimanje po večjih odmerkih vitamina C (od 200 mg do 2 g dnevno). Vitamin C (askorbinska kislina) je nujno potreben v različnih fizioloških procesih v telesu. Uživanje vitamina C v obliki tablet, kapsul, praškov ali tekočine v odmerkih do 200 mg dnevno je smiselno predvsem pri pomanjkljivi prehrani in je razširjeno zlasti v zimskem času kot preventiva pred običajnimi prehladnimi obolenji. Vitamin C je povezan predvsem s krvžilnim sistemom in krepijo imunski sistem ter naj bi zmanjšal čas in resnost bolezenskih znakov pri običajnem prehladu in gripi (1). Takšno delovanje obetajo predvsem nekateri učinki, ugotovljeni v raziskavah *in vitro*, kot so antioksidativno delovanje, vpliv na znižano izražanje genov za vnetne citokine in vpliv na povečano protimikrobno delovanje nekaterih imunskih celic (2). Številne klinične raziskave pa ne dajejo enoznačnih rezultatov glede vloge vita-

mina C pri prehladnih obolenjih. V metaanalizi, objavljeni leta 2013, so primerjali rezultate 29 kliničnih raziskav, ki so zajele skupno 11.000 prostovoljcev. Ugotovili so, da vsakodnevno preventivno uživanje 200 mg ali več vitamina C zmanjša pojavnost prehladnih obolenj za zgolj 3 % v primerjavi s placebom. Po drugi strani pa so ugotovili, da je bilo trajanje prehlada pri ljudeh, ki so ob začetku obolenja že jemali vitamin C, krajše kot pri ljudeh, ki so ob začetku obolenja jemali placebo. Pri odraslih se je trajanje prehlada skrajšalo za 8 %, pri otrocih pa za 14 % (3). Prehladna obolenja povzročajo tudi humani koronavirusi. Ker pa covid-19 povzroča novi koronavirus z drugačnim genskim zapisom (4), rezultatov teh metaanaliz ne moremo enostavno posploševati na covid-19.

Nekatere značilnosti težjega poteka okužbe z novim koronavirusom SARS-CoV-2 vključujejo razvoj sindroma akutne dihalne stiske, sekundarne okužbe (npr. bakterijska pljučnica) in hude sepse (4). Nedavno so objavili rezultate kliničnih preskušanj, v katerih so proučevali uporabo vitamina C kot del strategije zdravljenja sindroma akutne dihalne stiske (5) in septičnega šoka (1). Pri bolnikih s sepsom in sindromom akutne dihalne stiske intravensko dajanje vitamina C (50 mg/kg) vsakih 6 ur v 96 urah ni bistveno spremenilo ocene resnosti, ravni C-reaktivnega proteina ali ravni trombomodulina v primerjavi s placebom, čeprav se je ob uporabi vitamina C statistično značilno znižala smrtnost v 28 dneh (ne glede na vzrok) in skrajšal čas na oddelku za intenzivno nego (5). Pri drugi raziskavi intravenska aplikacija vitamina C, hidrokortizona in tiamina (vitamin B1) ni spremenila poteka septičnega šoka v primerjavi z uporabo hidrokortizona (1).

Kitajski zdravniki so v različnih medijih navajali, da so uspešno zdravili bolnike s covid-19 z visokimi odmerki intravensko apliciranega vitamina C. To naj bi privedlo do krajšega povprečnega časa hospitalizacije in zmanjšanja smrtnosti (6). Obširno klinično raziskavo so pričeli 14. februarja 2020 v bolnišnici Zongnan (Vuhan). Vključili so 140 bolnikov, ki so jim diagnosticirali pljučnico, povezano z okužbo s SARS-CoV-2. Bolnikom so intravensko aplicirali zelo visoke odmerke vitamina C (24 g dnevno). Končni rezultati raziskave še niso objavljeni, a predhodni rezultati niso pokazali bistvenih razlik med skupino bolnikov, ki je prejela vitamin C, in skupino, ki je dobila placebo (NCT 04264533).

Še vedno potekajo številna klinična preskušanja, kjer preiskujejo vitamin C kot monoterapijo za zdravljenje covid-19 (NCT04264533, NCT04344184, NCT03680274, NCT04357782), v kombinaciji s hidroksiklorokinom za zdravljenje (NCT04328961) ali preprečevanje

(NCT04326725, NCT04335084) in v kombinaciji z drugimi prehranskimi dopolnili za preprečevanje okužbe (NCT04342728).

Dnevni odmerek vitamina C se v teh preskušanih zelo razlikuje, od 250 do 500 mg peroralno do 24 g intravensko. Visoki odmerki, kot so jih uporabili pri intravenskih aplikacijah, uporabniku v lekarnah niso na voljo in jemanje odmerkov, večjih od 1000 mg dnevno, odsvetujemo. Visoki odmerki vitamina C (nad 1000 mg) lahko delujejo prooksidativno in se jim morajo še posebej izogibati bolniki z uratnimi ledvičnimi kamni, bolniki s kronično slabšim delovanjem ledvic, predvsem tisti, ki so na hemodializi, in posamezniki, ki imajo šibkejšo delovanje encima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza. Zaradi močnega antioksidativnega delovanja vitamina C je potrebna previdnost pri bolnikih z rakom, ki se zdravijo s kemoterapijo ali obsevanjem, kjer je mehanizem protitumornega delovanja povezan z nastankom reaktivnih spojin (7). Pomembno pa je poudariti tudi pomanjkanje dokazov v prid jemanju vitamina C za preprečevanje ali zdravljenje covid-19.

2.2 VITAMIN D

Vitamin D je v maščobah topen vitamin, ki se v prehranskih dopolnilih nahaja kot vitamin D2 (ergokalciferol) in D3 (holkaliferol). Obe obliki se v jetrih pretvorita v aktivno obliko kalcitriol. Iz epidemioloških podatkov, povezanih z virusom influence, predpostavljajo, da je pomanjkanje vitamina D pomemben dejavnik sezonskega pojavljanja epidemij (8). Po tej predpostavki je v zimskih obdobjih zaradi zmanjšane izpostavljenosti soncu in posledično zmanjšane sinteze nižja koncentracija vitamina D v serumu, kar vpliva na delovanje imunskega sistema (8). Vitamin D se v delovanje imunskega sistema vpleta na različne načine in ti mehanizmi so predmet številnih raziskav (9). Opazovalne raziskave dosledno povezujejo nizko raven vitamina D z akutnimi okužbami dihal (10). To se je pokazalo tudi v nedavni opazovalni raziskavi, kjer so primerjali povprečno koncentracijo vitamina D populacij iz 20 evropskih držav z resnostjo poteka bolezni covid-19 (11). Klinične raziskave dajo manj konsistentne podatke, verjetno zaradi heterogenosti izhodiščnih ravni vitamina D pri udeležencih raziskave. V največji metaanalizi do sedaj, ki je vključila več kot 10.000 posameznikov iz 25 kakovostno izvedenih kliničnih preskušanj, so zaključili, da peroralna prehranska dopolnila vitamina D nekoliko zmanjšajo tveganje za akutne okužbe dihal (ocena učinkovitosti NNT (*number needed to treat*) = 33). Učinki so bili najbolj izraziti pri tistih, ki so vitamin D jemali v dnevni (400 do 4000 IE/dan) ali teden-

skih odmerkih, brez dodatnih bolusov (NNT = 20), znotraj te skupine pa je bil zaščitni učinek vitamina D najbolj izražen pri skupini s hujšim začetnim pomanjkanjem vitamina D (NNT = 4).

Ti podatki predstavljajo podlago za objave in predpostavke o zaščitni vlogi vitamina D pri pandemiji covid-19. Vendar bodo šele raziskave, ki so v teku in bodo ocenile vpliv ravni vitamina D na napoved pri bolnikih s covid-19 in učinkovitost dodajanja vitamina D kot del zdravljenja, dale bolj jasen odgovor (12).

Zaradi splošnega zdravstvenega stanja in razširjenosti pomanjkanja vitamina D v populaciji predvsem v zimskem obdobju je dodatek vitamina D v količini do 100 µg (4000 IE) na dan varen. Dokler o vlogi vitamina D pri preprečevanju ali zdravljenju okužbe s SARS-CoV-2 ni jasnih dokazov, je potrebno uporabnike opozoriti pred prevelikimi vnosi, saj dolgotrajno uporabo visokih odmerkov povezujejo s pojavom hiperkalcemije (13).

2.3 CINKOVE SOLI

Cink je mineral v sledovih, ki po nekaterih raziskavah sodeč zavira razmnoževanje virusov in njihovo pritrjevanje na nosno-žrelno sluznico ter naj bi po teh mehanizmi vplival na potek prehladnih obolenj (14). Raziskave *in vitro* kažejo, da cinkovi ioni zavirajo virusne RNA-polimeraze in tako zmanjšajo replikacijo virusov (tudi koronavirusov) v celicah (15). Prav tako raziskovalci proučujejo verjetnost zaviranja delovanja encima angiotenzin konvertaze tipa 2 (ACE2) kot tudi njegovo vlogo pri povečanju izražanja protivirusnega interferona α . Ker cinkovi ioni zavirajo znotrajcelično signalno pot transkripcijskega jedrnega dejavnika- κ B (NF- κ B), bi lahko delovali protivnetno. Prav tako večja koncentracija cinkovih ionov zmanjšuje pojav sekundarne bakterijske okužbe (16). Klinične raziskave, ki so ugotovljale vpliv dodajanja cinkovih ionov na potek prehladnih obolenj, so metodološko šibke in dajejo nasprotujoče rezultate. Razlikujejo se tudi zaključki metaanaliz. V obširnejši metaanalizi so zaključili, da dodajanje cinkovih ionov lahko zmanjša trajanje prehlada za 1,65 dni. Zaradi velike heterogenosti podatkov, ki so delno tudi posledica razlik v starosti udeležencev, uporabljenem odmerku in vrsti cinkove soli, avtorji poudarjajo, da ni dovolj dokazov za klinična priporočila (17).

Novice, povezane s trditvami o delovanju cinkovih ionov pri okužbi s covid-19, so zbudile zanimanje uporabnikov. Za vpliv samih cinkovih ionov na potek bolezni covid-19 kliničnih dokazov ni. Poteka pa nekaj kliničnih preskušanj, v katere je kot del režima za zdravljenje covid-19 vključen tudi cink (predvsem v kombinaciji s hidroksiklorokinom, ki



je znan cinkov ionofor in tudi sam deluje protivirusno in imunomodulatorno) (18).

Priporočen dnevni vnos cinka je 10 mg/dan (NIJZ, referenčne vrednosti). Raziskave toksičnosti ponavljajočih se odmerkov so pokazale, da je raven, pri kateri ni opaznega učinka (NOEL), okrog 95 mg/kg telesne mase. Uporabnike je potrebno opozoriti na možne neželene učinke, ki so jih zaznali tudi v kliničnih raziskavah, kot so neprijeten okus v ustih, slabost, abdominalne bolečine in prebavne motnje (17).

3 NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI

Za zniževanje vročine in lajšanje bolečin v mišicah in glavobola pri prehladnih obolenjih pogosto uporabljamo NSAR, ki so na voljo tudi brez recepta in zato uporabniku enostavno dostopni. Zniževanje povišane telesne temperature in lajšanje blažjih bolečin je smiselno tudi pri bolezni covid-19. Na spletu smo od pričetka pandemije zasledili številne objave, da naj bi uporaba NSAR, predvsem ibuprofena, poslabšala potek te bolezni. Podobne objave so se pojavljale tudi za učinkovine iz skupine zaviralcev ACE in antagonistov angiotenzinskih receptorjev, ki jih pogosto uporabljamo za zdravljenje bolnikov s hipertenzijo, srčnim popuščanjem ali ledvičnimi zapleti pri diabetesu. Te objave temeljijo na predpostavki, da omenjene učinkovine povečajo izražanje membranskega encima ACE2, ki predstavlja prijemališče, preko katerega virus SARS-CoV-2 vstopa v celice na površini dihal in drugje. Več prijemališč za virus pa naj bi posledično povečalo tveganje za okužbo (19).

Trenutni dokazi kažejo, da ACE2 služi kot vstopni receptor za SARS-CoV-2 (20), a ima tudi zaščitno vlogo pri poškodbah pljuč (21), do katerih lahko pride tudi pri covid-19. Zanimivo je, da lahko človeški rekombinantni topni ACE2, ki so ga klinično preskušali v prvi in drugi fazi za zdravljenje akutne pljučne poškodbe in pljučne hipertenzije, pomembno prepreči zgodnje faze okužbe s SARS-CoV-2 *in vitro* (22). Zato se je v Evropi nedavno začelo klinično preskušanje rekombinantnega ACE2 za zdravljenje covid-19 (EudraCT: 2020-001172-15).

Znanje o regulaciji ACE2 kot odzivu na zdravila večinoma temelji na poskusih na živalih. Čeprav rezultati teh raziskav kažejo, da lahko učinkovine, kot so zaviralci ACE, antagonist angiotenzinskih receptorjev ali ibuprofen, povišajo iz-

ražanje ACE2 na membranah celic v srčni mišici ali ledvičnem tkivu, pa dokazi iz poskusov na živalih niso povsem skladni in še vedno ni jasno, ali so prenosljivi na ljudi. Poleg tega so glavna tarča SARS-CoV-2 alveolarne celice tipa II, podatkov o vplivu omenjenih zdravilnih učinkovin na izražanje ACE2 na teh celicah pa nimamo. Pri ljudeh sicer obstajajo dokazi, da imajo lahko bolezenska stanja pomembne učinke na izražanje ACE2 (23), vendar je težko oceniti skupni učinek bolezni in zdravil na izražanje ACE2. Manjka pa tudi dokaz, da povečanje izražanja ACE2, ki ga potencialno povzroči zdravilna učinkovina, omogoča lažji vstop SARS-CoV-2 v celice (24).

NSAR zavirajo aktivnost ciklooksigenaze (COX1 in COX2) in s tem blokirajo proizvodnjo prostaglandinov, ki sodelujejo pri kemotaksi in aktivaciji efektorskih celic. Encim COX2 ima ključno vlogo tudi pri zaviranju vnetja, s čimer preprečuje škodo zaradi prekomernega imunskega odziva (25). Glede na to dvojno vlogo COX2 pri vnetnem odzivu, na primer vpliv na ojačanje začetne, akutne faze in nato zaviranje pretiranega imunskega odziva, se postavlja vprašanje, ali bi lahko jemanje NSAR med okužbo s SARS-CoV-2 izboljšalo ali zapletlo potek bolezni.

Opazovalne raziskave kažejo na povezavo med predbolnišnično uporabo NSAR in dolgotrajnim in zapletenim potekom pljučnice (26). Dodatno je raziskava francoske nacionalne agencije za zdravila (ANSM) pokazala, da lahko ibuprofen in ketoprofen iz skupine NSAR poslabšata potek okužb, ki jih povzročajo virus varicella zoster (norice) in nekatere bakterije (27). Na podlagi tega poročila je Odbor za oceno tveganja na področju farmakovigilance Evropske agencije za zdravila (EMA) pred kratkim sprožil pregled teh zdravil. Mehanizmi, na osnovi katerih lahko uporaba NSAR vodi v zapleten potek pljučnice, še niso pojasnjeni. Domnevajo, da vnos NSAR prikrije glavne simptome vnetja, kot sta vročina in bolečina, in posledično oteži pravočasno odkrivanje pljučnice in začetek ustreznega zdravljenja (26). V skladu s tem informacije o zdravilu za mnoga NSAR že vključujejo opozorilo, da lahko prikrijejo simptome poslabšanja okužbe. Drugi možni mehanizem bi lahko bil povezan z učinkom NSAR, da preko zaviranja COX2 posredno preprečujejo oslabitev vnetja in imunskega odziva v kasnejših fazah (26).

Trenutno ni znanstvenih dokazov, ki bi kazali, da uporaba ibuprofena poslabša potek bolezni covid-19. EMA in Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) navajata, da trenutno ni razloga, da bi bolniki, ki jemljejo ibuprofen ali druga NSAR, predvsem za zdravljenje kroničnih bolezni, prenehali z jemanjem zdravila (28, 29). Ob že dobro poznanih neželenih učinkih NSAR te

uporabljamo le, ko je to nujno potrebno, v najnižjem učinkovitem odmerku in v najkrajšem možnem časovnem obdobju. Smernice za zdravljenje v večini primerov, tudi v tej situaciji, priporočajo lajšanje bolečin in zniževanje povišane telesne temperature s paracetamolom.

4 RAZKUŽILA

Najnovejše raziskave so pokazale, da ostane virus SARS-CoV-2 v obliki aerosola v zraku infektiven do tri ure in da je po nanosu na površine infektiven do 72 ur, bolj stabilen pa je na plastiki in nerjavečem jeklu kot na bakru in kartonu (30). Z uporabo ustreznih dezinfekcijskih sredstev, kot so 62–71-odstotni etanol, 0,5-odstotna vodna raztopina vodikovega peroksida ali 0,1-odstotna vodna raztopina natrijevega hipoklorita, ga lahko učinkovito inaktiviramo že v 1 do 2 minutah (31). Po nanosu teh razkužil površin ni potrebno spirati. Etanol v enakem volumskem deležu lahko zamenjamo tudi z izopropanolom ali n-propanolom, torej z alkoholi, ki imajo enak razkuževalni učinek kot etanol. Za površine lahko uporabimo tudi enoodstotno raztopino kalijevega peroksimonosulfata, ki mora na površini delovati vsaj 15 minut, nato pa je površino potrebno sprati še z vodo. S koncentriranimi raztopinami ali prahom kalijevega peroksimonosulfata je potrebno ravnati pazljivo in pri redčenju do delovne koncentracije uporabiti zaščitno opremo. Podrobneje so razkužila v lekarniški praksi že opisana v preglednem članku (32).

Za razkuževanje rok je za zaščito pred okužbo s SARS-CoV-2 primeren 62–71-odstotni alkohol (predvsem etanol in izopropanol). Uporabiti moramo etanol brez dodatkov, ki bi bili po nanosu na kožo zdravju škodljivi. Upoštevati je potrebno, da razkužila za roke vtremo v kožo in pustimo, da se roke posušijo (ni predvideno, da si roke potem umijemo), zato se te snovi zadržijo na rokah in jih lahko prenesemo v usta ali na hrano, ki jo potem zaužijemo. Denaturiran etanol ni namenjen uživanju in je izključen iz plačila trošarine. V ta namen mu dodajo različne dodatke, da postane strupen ali zaradi vonja in okusa nepiten, kar preprečuje morebitno zaužitje. Bolj znani dodatki so metanol, izopropanol, aceton in denatonijev benzoat. Od namena uporabe je odvisno, katere dodatke dodajo. FDA navaja, da lahko za pripravo razkužil za roke uporabimo etanol, denaturiran z denatonijevim benzoatom, t-butanolom, oktaacetatnim estrom saharoze ali izopropanolom (33).

5 OBRAZNE MASKE

Obrazne maske, ki jih najpogosteje uporabljajo zdravstveni delavci in širša javnost, so kirurške maske. Kirurške maske so na splošno namenjene zaščiti ogroženih posameznikov pred okužbami (nosečnice, bolniki na kemoterapiji, posamezniki po presaditvi organov, bolniki na imunosupresivni terapiji, bolniki s kronično pljučno boleznijo, bolniki s težjimi kroničnimi boleznimi ...). Uporabnika maska ščiti pred večjimi kapljicami in aerosoli. Čeprav te maske v javnosti pogosto uporabljamo, ni dokazov, da zaščitijo pred okužbo s SARS-CoV-2. Zmanjšajo pa širjenje virusa iz okuženega bolnika in filtrirajo 80 % delcev velikosti 300 nm (34). Ocenjujejo, da je velikost koronavirusa približno 125 nm (od 60 do 140 nm) (35). Masko N95 je vrsta respiratorja, ki filtrira vsaj 95 % zelo majhnih delcev (300 nm). Maske so namenjene zdravstvenim delavcem, ki so v neposrednem stiku z bolniki na oddelkih za respiratorne bolezni, da se zaščitijo pred tveganji zaradi izpostavljenosti nalezljivim boleznim dihal. Masko FFP2 je vrsta respiratorja, ki filtrira vsaj 94 % zelo majhnih delcev (300 nm). Skupaj z N95 predstavlja zlati standard za zaščito pred zelo majhnimi delci (36). Respiratorja FFP3 in N100 filtrirata več kot 99,9 % delcev (300 nm) in sta namenjena zdravstvenim delavcem med posegi, pri katerih nastajajo infektivni aerosoli (npr. bronhoskopija, endotrahealna intubacija ali kardiopulmonalno oživljanje) (37).

Kljub soglasju, da je pri simptomatskih bolnikih, ogroženih skupinah in osebu v medicinskih centrih uporaba maske smiselna, ostaja odprto vprašanje, ali je to smiselno tudi pri splošni populaciji (38). Dokazov, da je uporaba zaščitnih mask učinkovita pri preprečevanju okužb v splošni populaciji, še nimamo. Trenutno Svetovna zdravstvena organizacija v splošni populaciji priporoča uporabo maske pri ljudeh s simptomi respiratorne okužbe in pri zdravih ljudeh, ki so v stiku z njimi (39).

4 SKLEP

Prehranska dopolnila, kot so vitamin C, vitamin D in cinkove soli, lahko pomembno prispevajo k splošnem zdravstvenem stanju pri pomanjkljivi prehrani in predvsem med se-



zono prehladnih obolenj. Dokazov o njihovi učinkovitosti pri preprečevanju ali zdravljenju okužbe z virusom SARS-CoV-2 ni, uporabnike pa je potrebno opozoriti pred prevelikimi odmerki, ki lahko povzročijo neželene učinke. Trenutno tudi ni znanstvenih dokazov, da bi zdravilne učinkovine (tudi ibuprofen), ki potencialno vplivajo na izražanje ACE2, vplivale na potek bolezni covid-19. V skladu z načinom delovanja NSAR informacije o zdravlilu že vključujejo opozorila, da jih uporabljamo le, ko je to nujno potrebno, v najnižjem učinkovitem odmerku in v najkrajšem možnem časovnem obdobju, za mnoge NSAR pa tudi opozorilo, da lahko prikrijejo simptome poslabšanja okužbe. Smernice priporočajo paracetamol kot prvo izbiro za lajšanje bolečine in zniževanje povišane telesne temperature. Znanstvene podlage, zaradi katere bi bilo potrebno, da bolniki prenehajo jemati ibuprofen ali druga NSAR za zdravljenje kroničnih bolezni, ni.

Pri pripravi sredstev za razkuževanje rok je potrebna posebna pozornost, da uporabimo izhodne surovine primerne kakovosti, predvsem etanol z ustreznimi količinami dovoljenih denaturantov. Pri uporabi mask je potrebno upoštevati vsaj minimalno priporočilo, ki predvideva uporabo maske pri ljudeh s simptomi respiratorne okužbe in pri zdravih ljudeh, ki so v stiku z njimi .

5 LITERATURA

- Fujii T, Luethi N, Young PJ, et al. Effect of Vitamin C, Hydrocortisone, and Thiamine vs Hydrocortisone Alone on Time Alive and Free of Vasopressor Support Among Patients With Septic Shock: The VITAMINS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;323(5):423-31.
- Colunga Biancatelli RML, Berrill M, Marik PE. The antiviral properties of vitamin C. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(2):99-101.
- Hemilä H, Chalker E. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(1):CD000980.
- Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;105948.
- Fowler AA 3rd, Truwit JD, Hite RD, et al. Effect of Vitamin C Infusion on Organ Failure and Biomarkers of Inflammation and Vascular Injury in Patients With Sepsis and Severe Acute Respiratory Failure: The CITRIS-ALI Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019;322(13):1261-70.
- Cheng R. Hospital treatment of serious and critical COVID-19 infection with high-dose Vitamin C. *Cheng Integrative Healthcenter Blog [Internet]*. [cited 2020 May 22]. Available from: <http://www.drnlc.com/blog/2020/03/18/hospital-treatment-of-serious-and-critical-covid-19-infection-with-high-dose-vitamin-c/>
- Carr AC, Cook J. Intravenous Vitamin C for Cancer Therapy - Identifying the Current Gaps in Our Knowledge. *Front Physiol*. 2018;9:1182.
- Fleming DM, Elliot AJ. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect*. 2007;135(7):1091-5.
- Martens PJ, Gysemans C, Verstuyf A, et al. Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients*. 2020;12(5):E1248.
- Jolliffe DA, Griffiths CJ, Martineau AR. Vitamin D in the prevention of acute respiratory infection: systematic review of clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;136:321-9.
- Ilie PC, Stefanescu S, Smith L. The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality. *Aging Clin Exp Res*. 2020;1-4.
- ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 May 22]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&intr=%22Calciferol%22>
- Pludowski P, Holick MF, Grant WB, et al. Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;175:125-35.
- Caruso TJ, Prober CG, Gwaltney JM Jr. Treatment of naturally acquired common colds with zinc: a structured review. *Clin Infect Dis*. 2007;45(5):569-74.
- te Velthuis AJ, van den Worm SH, Sims AC, et al. Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001176.
- Skalny AV, Rink L, Ajsuvakova OP, et al. Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19 . *Int J Mol Med*. 2020;10.3892/ijmm.2020.4575.
- Science M, Johnstone J, Roth DE, et al. Zinc for the treatment of the common cold: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ*. 2012;184(10):E551-61.
- ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 May 22]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&intr=%22Zinc%22>
- Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(5):259-60.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80.e8.
- Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005;436(7047):112-6.
- Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):905-13.e7.
- Zisman LS, Keller RS, Weaver B, et al. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation*. 2003;108(14):1707-12.
- Zolk O, Hafner S, Schmidt CQ; German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). COVID-19 pandemic and therapy with ibuprofen or renin-angiotensin system blockers: no need for interruptions or changes in ongoing chronic treatments. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;1-5.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*. 2001;2(7):612-9.
- Voiriot G, Philippon Q, Elabadi A, et al. Risks Related to the Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Community-Acquired Pneumonia in Adult and Pediatric Patients. *J Clin Med*. 2019;8(6):786.

27. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé - ANSM [Internet]. [cited 2020 May 20]. <https://www.ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Anti-inflammatoires-non-steroidiens-AINS-et-complications-infectieuses-graves-Point-d-Information-actualise-le-20-05-2020>
28. European Medicines Agency – EMA [Internet]. [cited 2020 May 20]. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-gives-advice-use-non-steroidal-anti-inflammatories-covid-19>
29. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke – JAZMP [Internet]. [cited 2020 May 20]. <https://www.jazmp.si/obvestilo/news/detail/News/uporaba-nesteroidnih-protivnetnih-zdravil-nsaid-in-zaviralcev-angiotenzins-ke-konvertaze-zaviralce/>
30. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020;382(16):1564-7.
31. Rabenau HF, Kampf G, Cinatl J, et al. Efficacy of various disinfectants against SARS coronavirus. *J Hosp Infect.* 2005;61(2):107-11.
32. Kumperščak Duh, M. Antiseptiki in razkužila v lekarniški praksi. *Farmacevtski vestnik.* 2018; 69(2): 139-47.
33. Food and Drug Administration – FDA.gov [Internet]. [cited 2020 May 20] <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/policy-temporary-compounding-certain-alcohol-based-hand-sanitizer-products-during-public-health>
34. Xiao Y, Torok ME. Taking the right measures to control COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):523-4.
35. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-33.
36. Radonovich LJ Jr, Simberkoff MS, Bessesen MT, et al. N95 Respirators vs Medical Masks for Preventing Influenza Among Health Care Personnel: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2019;322(9):824-33.
37. Coia JE, Ritchie L, Adisesh A, et al. Guidance on the use of respiratory and facial protection equipment. *J Hosp Infect.* 2013;85(3):170-82.
38. Feng S, Shen C, Xia N, et al. Rational use of face masks in the COVID-19 pandemic. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):434-6.
39. Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization) – WHO [Internet]. [cited 2020 May 20] <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public/when-and-how-to-use-masks>



ŠKRLATNI AMERIŠKI SLAMNIK (*ECHINACEA PURPUREA*) ZA ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE BOLEZNI COVID-19

ECHINACEA PURPUREA IN THE TREATMENT AND PREVENTION OF COVID-19

AVTOR / AUTHOR:

Prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za Farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: samo.kreft@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Aktualni izbruh virusa SARS-CoV-2 je sprožil intenzivno iskanje učinkovitih metod zdravljenja in preprečevanja okužbe z najrazličnejšimi pristopi. Trenutno uporabljamo eksperimentalno in v okviru »sočutne uporabe« nekatera zdravila oziroma zdravilne učinkovine sinteznega ali bio-

POVZETEK

Izbruh virusa SARS-CoV-2, ki povzroča bolezen covid-19, je sprožil intenzivno iskanje učinkovitih metod zdravljenja in preprečevanja te okužbe. Kljub omejenim dokazom podatki *in vitro* raziskav in kliničnih raziskav kažejo, da lahko zdravila s škrlatnim ameriškim slamnikom (*Echinacea purpurea*) učinkovito zaščitijo pred okužbami z različnimi respiratornimi virusi, vključno s koronavirusi. Ker to protivirusno delovanje ni specifično in obsega širok spekter virusov, zelo verjetno deluje tudi na novi koronavirus SARS-CoV-2. Zdravila rastlinskega izvora s škrlatnim ameriškim slamnikom imajo odličen varnostni profil.

KLJUČNE BESEDE:

ameriški slamnik, covid-19, *Echinacea purpurea*, protivirusno delovanje

ABSTRACT

The outbreak of the SARS-CoV-2 virus, which causes covid-19 disease, triggered a broad search for effective methods to treat and prevent this infection. Despite limited evidence, data from *in vitro* and clinical studies suggest that medicines containing *Echinacea purpurea* can effectively protect against infections with a variety of respiratory viruses, including coronaviruses. Because this antiviral activity is not specific and encompasses a wide range of viruses, it is very likely that *Echinacea purpurea* inhibits the new SARS-CoV-2 coronavirus as well. These herbal medicinal products have an excellent safety profile.

KEY WORDS:

antiviral activity, covid-19, *Echinacea purpurea*

tehnološkega izvora, ki seveda še nimajo v dovoljenju za promet odobrene indikacije za zdravljenje bolezn covid-19. Tak primer so protitelesa proti interleukinoma 1 in 6, remdesivir, favipiravir ter klorokin in hidroksiklorokin (1). Cepiva za zdaj še niso na voljo, jih pa intenzivno razvijajo. Množično uporabljamo za preprečevanje okužbe z virusom SARS-CoV-2 tudi preventivne ukrepe, kot so uporaba razkužil, nošenje mask za obraz in samoizolacija, katerih učinkovitost temelji na strokovnih ocenah, seveda pa ti ukrepi prav tako niso testirani v prospektivnih randomiziranih raziskavah.

Ena od možnih metod zdravljenja in preprečevanja okužbe s tem virusom so tudi zdravila rastlinskega izvora, predvsem tista, katerih varnost je bila že v preteklosti ugotovljena, njihovo učinkovitost pa lahko utemeljimo s strokovnimi argumenti. V tem članku bomo podali kritičen pregled raziskav, ki kažejo na učinkovitost škrlatnega ameriškega slavnika (*Echinacea purpurea*) za zdravljenje in preprečevanje okužb z virusom SARS-CoV-2.

2 ZDRAVILA ZA ZDRAVLJENJE ALI PREPREČEVANJE RESPIRATORNIH VIRUSNIH INFEKCIJ

Virus SARS-CoV-2 spada med koronavirusne, med katere uvrščamo tudi 30 % povzročiteljev prehladov (HCoV-229E, OC43, NL63 ali HKU1) (2). Nekateri od povzročiteljev prehladov uporabljajo isti receptor na tarčni celici (ACE2) za okužbo gostitelja kot virus SARS-CoV-2 (3, 4). Tako kot virusi HCoV-229E, SARS-CoV in MERS-CoV se je tudi SARS-CoV-2 na človeka prenesel zoonozno (z živali) (5). Koronavirusi širše spadajo v skupino virusov z lipidno ovojnico, kamor spada tudi virus gripe.

Pri iskanju zdravil proti bolezni covid-19 lahko izhajamo iz obstoječih zdravil proti podobnim boleznim. Osetamivir je kemijsko definirana učinkovina, ki ima indikacijo za zdravljenje ali preprečevanje virusnih okužb zgornjih dihalnih poti. Indiciran je za zdravljenje in preprečevanje gripe (6). Kot izhaja iz prejšnjega odstavka, je virus gripe manj soroden virusu SARS-CoV-2, kot pa so temu virusu podobni virusni povzročitelji prehlada. Glede na mehanizem delovanja osetamivirja (inhibicija virusnega encima nevraminidaze), pa ni pričakovati, da bi deloval tudi na koronavirusne.

Med zdravili rastlinskega izvora imajo odobreno indikacijo za zdravljenje ali preprečevanje virusnih okužb zgornjih dihalnih poti zdravila, ki vsebujejo pripravke iz ameriškega slavnika. Indikacija za ta zdravila, ki jo v monografiji navaja Evropska agencija za zdravila (EMA), je »kratkotrajna preventiva in zdravljenje prehlada« (7). Zdravila z ameriškim slamnikom imajo v nekaterih evropskih državah tudi širše indikacije. V Nemčiji na primer sta to »podporno zdravljenje ponavljajoče se okužbe dihal« (8) in »podporna terapija pri virusnih prehladih« (9) ter na Nizozemskem »pri nezadostni odpornosti, proti gripi in prehladu« in »za simptomatsko lajšanje prehlada in gripe in podobnih stanj zgornjih dihal« (10).

Prehlad je definiran kot okužba zgornjih dihalnih poti, ki prizadene pretežno nosno votlino, pa tudi žrelo, sinuse in sapnik. Posamezniki, ki imajo druge zdravstvene težave, lahko razvijejo tudi pljučnico (11, 12). Glede na zgornjo definicijo in različne odobrene indikacije bi lahko rekli, da so zdravila s škrlatnim ameriškim slamnikom uradno vsaj v nekaterih državah že indicirana za bolezen covid-19. Čeprav SARS-CoV-2 predstavlja nov respiratorni virus, zdravljenje in preprečevanje covid-19 tako že sodi v odobreno indikacijo zdravil z ameriškim slamnikom. Pri tem ne zanikamo dejstva, da je po resnosti problema bolezen covid-19 vse prej kot običajen prehlad.

Bolj kot uradne definicije pa nas zanimajo strokovni argumenti o možni učinkovitosti zdravil rastlinskega izvora z ameriškim slamnikom, ki jih bomo pogledali v nadaljnjih poglavjih.

3 IN VITRO UČINKI NA RESPIRATORNE VIRUSE Z LIPIDNO OVOJNICO

V *in vitro* poskusih so izvlečki škrlatnega ameriškega slavnika v fiziološko dosegljivih koncentracijah inaktivirali različne viruse z lipidno ovojnico, ki povzročajo respiratorne okužbe (13–15). Najverjetneje so za ta neposredni protivirusni učinek zaslužni alkaloidi, torej iste snovi, ki so najverjetneje zaslužne tudi za imunomodulatorni učinek ameriškega slavnika. Rezultati poskusa so pokazali, da sta bila virus gripe H3N2 in virus herpes simpleks HSV-1 zelo občutljiva. Koncentracije izvlečka, pri katerih je bila dosežena stodontna inhibicija (MIC_{100}), je bila manjša od 1,0 µg/mL. Respiratorni sincicijski virus je bil tudi občutljiv, vendar nekoliko manj (MIC 2,5 µg/mL), medtem ko so bili virusi brez lipidne ovojnice, rinovirusi tipov 1A in 14, adenovirusi 3 in 11, mačji kalicivirus in poliovirus, odporni na najvišjo testirano koncentracijo (800 µg/mL), vendar pa so imeli rinovirusi pri tej koncentraciji delno zmanjšan citopatogeni efekt (CPE). V alternativnih poskusih, pri katerih so dodali izvleček škrlatnega ameriškega slavnika celicam pred okužbo celic z virusom, so bile inhibicije okužb dosežene šele pri približno za dva reda višji koncentraciji, kar kaže, da je imel ameriški slanin neposreden virucidni učinek.

Izvleček ameriškega slavnika zavira tudi z virusi inducirano izločanje provnetnih citokinov, vključno z interlevkinoma 6 in 8 v epiteljskih celicah. Učinke so opazili pri vseh vrstah virusov, vključno s koronavirusi (13, 14). Poleg preprečevanja okužbe ameriški slanin s protivnetnim delovanjem



zmanjša še posledice okužbe (vnetje), kar je prav tako lahko koristno za milejši potek bolezni covid-19.

4 IN VITRO UČINKI NA KORONAVIRUSE

V letos objavljeni raziskavi so ugotovili, da izvlečki škrlatnega ameriškega slamnika *in vitro* zavirajo infektivnost različnih koronavirusov, tako HCoV-229E, ki je eden od povzročiteljev prehlada, kot tudi SARS-CoV in MERS-CoV, ki sta visokoinfektivna virusa. Virus SARS-CoV-2 je še najbolj podoben SARS-CoV, na osnovi česar predvidevamo, da bi izvleček lahko deloval tudi na SARS-CoV-2. Do inhibicije je prišlo v koncentracijah, manjših od 10 µg/mL (16). Te koncentracije so fiziološko dosegljive in relevantne. Do uspešne inhibicije okužb je prišlo, ko je bil virus v stiku z izvlečkom. Predobdelava celičnih linij pred dodatkom virusa ni zavrla okužbe, tretiranje po okužbi pa je imelo učinek šele pri koncentraciji 50 µg/mL. Preprečitev okužb so opazili tudi v sistemu organotipske kulture celic dihalnega trakta, ko so predhodno z izvlečkom ameriškega slamnika tretirani dihalni epitelij izpostavili kapljicam HCoV-229E, ki posnemajo naravno okužbo (22).

5 IN VIVO UČINKI NA RESPIRATORNE VIRUSE Z LIPIDNO OVOJNICO

V randomizirani, slepi, kontrolirani klinični raziskavi na 755 odraslih osebah je preventivna uporaba izvlečka škrlatnega ameriškega slamnika v štirih mesecih zmanjšala virusne okužbe na manj kot polovico (17). Brise nosne sluznice simptomatskih bolnikov so testirali na virus gripe, respiratorni sincicijski virus, koronavirus, parainfluenco in metapneumoviruse. V skupini škrlatnega ameriškega slamnika so odkrili 24 okužb, od tega 21 s koronavirusom (9 z virusom HCoV-229E, 11 z virusom HKU1 in 1 z virusom OC43). V skupini placeba pa so odkrili 47 okužb, od tega s koronavirusi (15 z virusom HCoV-229E, 17 z virusom HKU1 in 1 z virusom OC43). Medtem ko je bil učinek na viruse z ovojnico statistično pomemben ($p = 0,011$), razlika pri koronavirusih ni bila značilna ($p = 0,154$), verjetno zaradi majhne velikosti vzorca.

Tudi v drugi randomizirani, slepi, kontrolirani raziskavi (18) na 203 otrocih starosti od 4 do 12 let, ki so prejeli izvleček škrlatnega ameriškega slamnika štiri mesece, so v vzorcih nosne sluznice analizirali prisotnost virusov. 47 virusnih okužb pri kontrolni skupini se je zmanjšalo na 28 okužb pri skupini škrlatnega ameriškega slamnika ($p = 0,0218$). Tudi izražanje simptomov pri otrocih, zdravljenih z izvlečkom škrlatnega ameriškega slamnika, je bilo znatno zmanjšano v primerjavi s kontrolo, z 99 točk pri kontroli na 31 točk pri skupini škrlatnega ameriškega slamnika ($p = 0,008$).

6 SKLEP

Kljub omejenim dokazom razpoložljivi podatki *in vitro* kažejo, da lahko izvlečki škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) zaščitijo pred okužbami z različnimi virusi, ki imajo lipidno ovojnico, vključno s koronavirusi in znotraj tega tudi z virusom SARS-CoV. Ker protivirusno delovanje ni specifično in obsega širok spekter tovrstnih virusov, verjetno lahko deluje tudi na novi koronavirus SARS-CoV-2. Dve randomizirani, slepi, kontrolirani klinični raziskavi prav tako podpirata preventivne učinke proti virusom z lipidno ovojnico. Če se koronavirusne okužbe še vedno pojavljajo, so ponavadi blažje in se hitreje pozdravijo (18). Tovrstna rastlinska zdravila so primerna zlasti za zdravljenje blagih oblik bolezni covid-19, ki so veliko pogostejše od hudih oblik in so ključni dejavnik pri širjenju virusov SARS-CoV-2 v skupnosti in na posameznike iz rizičnih skupin (19). Prav tako lahko ta zdravila rastlinskega izvora uporabljamo za preprečevanje bolezni, saj imajo odličen varnostni profil. Do podobnih zaključkov so prišli tudi v drugih, v zadnjem mesecu objavljenih znanstvenih pregledih (20, 21).

7 LITERATURA

1. U. S. Food and Drug Administration. Hydroxychloroquine sulfate Health Care Provider Fact Sheet, version date 4/3/2020.
2. Kirkpatrick GL. The Common Cold. *Prim Care*. 1996;23(4):657-75.
3. Holmes KV. In: Fields B, Knipe N, Howley DM, et al., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p 1187-203.

4. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7988–93.
5. Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*. 2016;4(3):26.
6. Roche 2020. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Tamiflu. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tamiflu-epar-product-information_sl.pdf
7. Kreft S, Razinger B. Assessment report on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., herba recens. European Medicines Agency 2014.
8. Madaus. Echinacin – patient information leaflet. <https://www.rote-liste.de/suche/praep/3587/Echinacin%C2%AE%20Liquidum%20Madaus%20F%C3%BCssigkeit>
9. Esberitox – patient information leaflet. <https://www.rote-liste.de/suche/praep/23939/Esberitox%C2%AE%20COMPACT%20Tabletten>
10. Bioforce. Echinaforce – patient information leaflet. https://data.avogel.nl/productfeed/bijsluiter/08711596589474.pdf?_ga=2.102985097.808931647.1588845100-304840643.1588845100
11. Arroll B. Common cold. *BMJ Clin Evid*. 2011;2011:1510.
12. Allan GM, Arroll B. Prevention and treatment of the common cold: making sense of the evidence. *CMAJ*. 2014 Feb 18;186(3):190–9.
13. Sharma M, Anderson SA, Schoop R, Hudson JB. Induction of multiple pro-inflammatory cytokines by respiratory viruses and reversal by standardized Echinacea, a potent antiviral herbal extract. *Antiviral Res*. 2009;83(2):165–70.
14. Sharma M, Schoop R, Hudson JB. Echinacea as an anti-inflammatory agent: the influence of physiologically relevant parameters. *Phytother Res*. 2009;23(6):863–7.
15. Pleschka S, Stein M, Schoop R, Hudson JB. Anti-viral properties and mode of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virologia*. 2009;6:197.
16. Signer J, Jonsdottir HR, Albrich WC, Strasser M, Züst R, Ryter S, et al. In vitro antiviral activity of Echinaforce®, an Echinacea purpurea preparation, against common cold coronavirus 229E and highly pathogenic MERS-CoV and SARS-CoV. *Research Square*. <https://www.researchsquare.com/article/rs-15282/v2> (under review).
17. Jawad M, Schoop R, Suter A, Klein P, Eccles R. Safety and Efficacy Profile of Echinacea purpurea to Prevent Common Cold Episodes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:841315.
18. Ogal M, Klein P, Schoop R. Echinacea for the Prevention of Respiratory Tract Infections in Children 4 – 12 years: A Randomized, Blind and Controlled Study. *Societe Suisse de Pediatrie (SSP, Poster)*, 24th May 2018, Lausanne, Switzerland; (manuscript submitted).
19. Galanti M, Birger R, Ud-Dean M, Filip I, Morita H, Comito D, et al. Rates of asymptomatic respiratory virus infection across age groups. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e176.
20. de Abreu IRLB, de Abreu KMS. Cone Purple Flower (Echinacea purpurea.) Effect on Respiratory Viral Infections (Brief Review Study): Could it be a Possible Solution to SARS-COV-2 and Other Viral Infection Pandemic Lockdown? *EC Pulmonology and Respiratory Medicine* 9.5 (2020): 23-8.
21. Schapowal A. Use of Echinaforce to Prevent Coronavirus Infections. *EC Microbiology SI.02 2020*: 23-5.
22. Sharma M, Schoop R, Hudson JB. The efficacy of Echinacea in a 3-D tissue model of human airway epithelium. *Phytother Res*. 2010;24(6):900-4.



BLAŽENJE SINDROMA SPROŠČANJA CITOKINOV PRI COVID-19

ALLEVIATING CYTOKINE RELEASE SYNDROME IN COVID-19

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.¹
Izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.²
Prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.¹
Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.²

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Covid-19 je infekcijska bolezen, ki jo povzroča respiratorni betakoronavirus SARS-CoV-2 (1). Velika večina obolelih to bolezen preboli v blažji obliki, a pri nekaterih posameznikih,

POVZETEK

Za hudo obliko koronavirusne bolezni 19 (covid-19) je značilno zajetno sproščanje vnetnih citokinov, imenovano tudi citokinska nevihta. Ker imunski mehanizmi ne uspejo zamejiti namnoževanja virusa SARS-CoV-2 v zgodnji fazi okužbe, sta kasnejši velika virusna obremenitev ter obsežna apoptoza endotelijskih celic in pnevmocitov odgovorni za vdor nevtrofilcev in makrofagov v pljučno tkivo. Ti sproščajo citokine, ki na mesto vnetja privabljajo nove imunske celice. Visoka koncentracija vnetnih citokinov izzove povečano prepustnost kapilar in sindrom akutne dihalne stiske zaradi alveolarnega edema ter aktivira koagulacijsko kaskado, kar vodi v dihalno odpoved in odpoved drugih organov. Zaviranje sproščanja vnetnih citokinov ali blokiranje njihove signalizacije tako predstavlja potencialno podporno zdravljenje hude oblike covid-19. V prispevku predstavljamo terapevtske strategije blaženja citokinske nevihte, ki spremlja covid-19. Trenutno kot imunomodulatorje v ta namen v kliničnih raziskavah vrednotijo predvsem zaviralce Janusove kinaze, antagonist interlevkinov 6 in 1, azitromicin in hidroklorokin.

KLJUČNE BESEDE:

citokinska nevihta, covid-19, imunomodulatorji, SARS-CoV-2, sindrom sproščanja citokinov

ABSTRACT

Severe coronavirus disease 19 (covid-19) is characterized by a surge of pro-inflammatory cytokines, termed cytokine storm. As the SARS-CoV-2 virus evades early clearance by the immune system, high viral load, and endothelial and pulmonary epithelial cell apoptosis in later stages of infection are responsible for infiltration of lung tissue by neutrophils and macrophages. These, in turn, release cytokines, attracting further immune cells to the site of inflammation. High concentration of cytokines induces leakage of blood vessels, acute respiratory distress due to alveolar edema, activation of coagulation pathways, and consequent irreversible damage to lungs and other organs. Blocking the release or interfering with pro-inflammatory cytokine signalling should thus be considered as supportive therapy for severe covid-19. Here, we review therapeutic strategies aimed at alleviating covid-19-related cytokine storm. Some of the most promising im-

munomodulatory drugs being evaluated for this indication in on-going clinical trials are Janus kinase inhibitors, interleukin 6 and 1 antagonists, azithromycin and hydroxychloroquine.

KEY WORDS:

covid-19, cytokine release syndrome, cytokine storm, immunomodulators, SARS-CoV-2

pretežno starejših in kroničnih bolnikih, lahko bolezen poteka v hujši obliki. Hujša oblika bolezni prizadene tudi spodnje dihalne poti in se kasneje lahko razvije v življenje ogrožajočo pljučnico, sistemska okužba v nekaterih primerih privede celo do odpovedi več notranjih organov. Pri tem igra pomembno vlogo zakasnen imunski odziv v zgodnji fazi okužbe, kar virusu omogoči hitro namnoževanje, in pretiran ter nadzorovan imunski odziv v kasnejši fazi bolezni, za katerega je značilen t. i. sindrom sproščanja citokinov, ki je odgovoren za nepovratne poškodbe pljuč in drugih organov (2).

2 SINDROM SPROŠČANJA CITOKINOV V POZNIH STADIJIH OKUŽBE S SARS-COV-2

Hitra in obsežna aktivacija mehanizmov prirojene imunosti je ključnega pomena za zamejitev namnoževanja virusov, ki vdrejo v organizem. Evolucijsko ohranjene strukture virusa (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*; kot je npr. dvoverižna RNA) aktivirajo receptorje PRR (*pattern recognition receptors*) v okuženih celicah, kar privede do sproščanja interferonov (IFN) tipa I in aktivacije transkripcijskega dejavnika NF- κ B. IFN tipa I v sosednjih celicah sprožijo nastajanje protivirusnih proteinov, ki se aktivirajo v prisotnosti virusne RNA in izzovejo nespecifično razgradnjo RNA v citosolu ter zavrejo translacijo, s čimer zamejijo širjenje virusa. Hkrati IFN spodbudijo tudi izražanje pglavitnega histokompatibilnega kompleksa (MHC) I in tako povečajo verjetnost predstavljanja virusnih epitopov na površini okuženih celic, na katere se odzovejo citotoksični limfociti T (Tc), ter uravnavajo delovanje naravnih celic ubijalk (NK), antigen-predstavitvenih celic (APC), limfocitov B, T-celic pomagalk (Th) in Tc (3). V levkocitih transkripcijski dejavnik NF- κ B nadzira izražanje številnih genov, ki kodirajo vnetne citokine, med drugim dejavnik tumorske nekroze α (TNF α) ter interleukina (IL) 6 in IL-1 β . To so pleiotropni citokini, ki sodelujejo pri aktivaciji in novačenju imunskih celic

na mestu vnetja ter predstavljajo pomembno vez med prirojeno in pridobljeno imunostjo (4).

Koronavirusi poleg genov za strukturne proteine in proteine, potrebne za replikacijo, nosijo v genomu zapis za t. i. pomožne proteine (*accessory proteins*). Številni med njimi se vpletajo v signalne poti receptorjev prirojene imunosti in ovirajo sproščanje citokinov iz okuženih celic, s čimer se virusi uspešno izmikajo imunskim mehanizmom. Tako raziskave *in vitro* (z respiratornimi epitelijskimi celicami, dendritičnimi celicami in makrofagi) kot poskusi na živalskih modelih nakazujejo, da SARS-CoV-1 in MERS-CoV učinkovito zavrejo sproščanje vnetnih in kemotaktičnih citokinov v zgodnji fazi okužbe, medtem ko kasneje beležimo okrepjeno sproščanje zlasti IL-1 β , IL-6, TNF α in nekaterih kemokinov (CCL2, CCL3 in CCL5). Ti nastajajo kot odziv na obsežno tvorbo vnetnih eikozanoidov (levkotrienov in prostaglandinov) v alveolarnih makrofagih, sproženo z apoptozo okuženih celic (5), in so verjetno odgovorni za nadaljnjo infiltracijo nevtrofilcev in monocitov. Ker slednji sproščajo še več citokinov, to privede do nepovratnih poškodb pljučnega tkiva zaradi apoptoze epitelijskih in endotelijskih celic in pojava edema, t. i. sindroma akutne respiratorne stiske, ter pridružene odpovedi drugih organov (2). Opisan sindrom sproščanja citokinov, v najhujši obliki imenovan citokinska nevihta, tudi pri bolnikih s covid-19 povezujemo s povišano smrtnostjo. Bolniki s hujšo obliko bolezni imajo značilno višje plazemske ravni IL-6, IL-2R, IL-10 in TNF α ter kljub višjim številom levkocitov manj limfocitov Th in Tc v primerjavi z bolniki, pri katerih bolezen poteka blažje (6). Razumevanje patofizioloških procesov, povezanih z okužbo z virusom SARS-CoV-2, razkriva potencialne nove strategije zdravljenja bolezni covid-19. Medtem ko bi s protivirusnimi učinkovinami lahko učinkovito zamejili namnoževanje virusa v zgodnji fazi okužbe, bo verjetno za bolnike v kasnejših stadijih bolezni potrebno razviti pristope zdravljenja s tarčnimi imunomodulatornimi zdravili (7). V prispevku podajamo pregled obetavnih učinkovin za omejevanje vnetnih procesov, ki so neposreden vzrok razmeroma visoke smrtnosti pri okužbi s SARS-CoV-2.

3 MOŽNI TERAPEVTSKI PRISTOPI BLAŽENJA CITOKINSKE NEVIHTE

3.1 ZAVIRALCI KINAZE JAK

Znaten delež bolnikov s hudim respiratornim obolenjem kot posledico okužbe z virusom SARS-CoV-2 lahko razvije

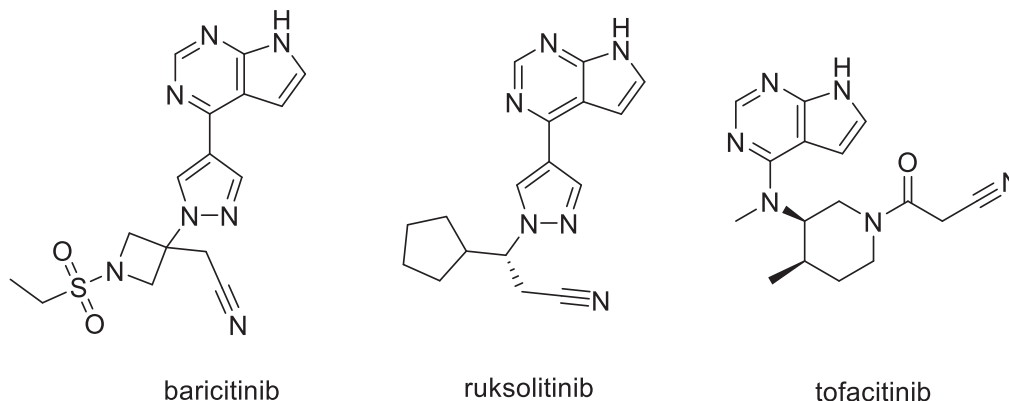


vnetni sindrom, imenovan sekundarna hemofagocitna limfocitocitoza (SHLH), za katerega sta značilni hipercitokinemija in posledična odpoved več organov (8). Pri bolnikih s hudim potekom covid-19 so v serumu odkrili povišane koncentracije citokinov in kemokinov, vključno z IL-1 β , TNF α , IL-6 in IFN- γ (9, 10). Ta pretiran imunski odziv je zelo podoben citokinski nevihti in je tesno povezan s povečano aktivacijo signalne poti JAK (*Janus kinase*)-STAT (*signal transducer and activator of transcription proteins*), zlasti preko citokina IL-6, ki ga izločajo monociti in makrofagi. V družino JAK uvrščamo štiri proteine, in sicer JAK1, JAK2, JAK3 ter TYK2, ki so povezani z različnimi citokinskimi receptorji. Po vezavi ustreznega citokina pride do fosforilacije proteinov STAT, ki se nato translocirajo v jedro, kjer sprožijo transkripcijo genov (11). Zaviralce JAK danes uspešno uporabljamo za zdravljenje revmatoidnega artritisa (baricitinib, peficitinib, upadacitinib in tofacitinib) in mielofibroze (ruxsolutinib in fedratinib) (11, 12). Zanje je značilno, da so zelo selektivni v primerjavi z ostalimi kinazami, a niso specifični za posamezno JAK (11). Razlog za predlagano uporabo zaviralcev JAK za blaženje citokinske nevihte je torej njihova sposobnost, da utišajo prenos signala preko poti JAK-STAT, ki se sicer sproži po aktivaciji citokinskih receptorjev z interferoni in interleukini (13, 14). V nasprotju s podpornim zdravljenjem citokinske nevihte z zdravili za revmatoidni artritis, ki blokirajo le en citokin (npr. IL-6), namreč zaviralci JAK preprečijo signalizacijo več vnetnih citokinov in kemokinov (15). Pri normalnih terapevtskih plazemskih koncentracijah zaviralci JAK zmanjšajo obseg aktivnosti citokinov, a le-te ne zavrejo popolnoma, saj ciljajo patološko povišane aktivnosti citokinov, ne pa normalne funkcije citokinov (15). Po drugi strani pa nekateri citokini, kot sta IFN- γ in IL-4, katerih signalizacija poteka preko

JAK, zavirajo izražanje proteina ACE2, kar otežuje prepenjanje virusa na celico. Iz tega sledi, da bi zaviranje signalizacije teh citokinov privedlo do povečanega izražanja ACE2, kar bi potencialno povečalo možnost okužbe (16). Baricitinib, ruxsolutinib in tofacitinib (slika 1) trenutno prekušajo kot podporno zdravljenje covid-19 v številnih kliničnih raziskavah, ki so predstavljene v preglednici 1.

Baricitinib ima večplastni mehanizem delovanja, saj je zaviralec JAK1/2 in zaviralec dveh proteinov družine kinaz NAK (*numb-associated kinase*), z adapterjem povezane protein kinaze 1 (AAK1, *adapter-associated protein kinase 1*) in s ciklinom G povezane kinaze (GAK, *cyclin G-associated kinase*), ki sodelujeta pri s klatrinom posredovani endocitozi virusa SARS-CoV-2 v celico (17, 18). Ta raznovrstni mehanizem delovanja bi zato lahko v prvi vrsti ublažil vnetne procese in hkrati zmanjšal obseg vnosa virusa (19). Ob tem velja omeniti, da že z zelo nizkimi peroralnimi odmerki v območju 2–4 mg na dan dosežemo zadostne plazemske koncentracije za zaviranje AAK1 (20). V pilotni klinični raziskavi, ki so jo izvedli na 12 bolnikih s pljučnico, ki so 14 dni prejeli po 4 mg baricitiniba, so ugotovili značilno izboljšanje nekaterih kliničnih znakov in pljučne funkcije (21). Trenutno poteka še deset kliničnih raziskav, ki vrednotijo učinkovitost in varnost zaviranja JAK pri zdravljenju hudih oblik bolezni covid-19 (preglednica 1). V predhodnih kliničnih raziskavah so sicer ugotovili, da dolgoročno zdravljenje z baricitinibom lahko poveča tveganje za reaktivacijo latentnih virusnih okužb (varicella zoster, herpes simpleks, Epstein Barr), in sicer zaradi motenega protivirusnega odziva, posredovanega z interferoni (22, 23).

Ruxsolutinib je zaviralec JAK1/2, trenutno odobren za zdravljenje bolnikov z mieloproliferativnimi novotvorbami, vključno s pacienti s policitemijo vera, ki so se nezadostno



Slika 1: Strukture reprezentativnih zaviralcev JAK.

Figure 1: Structures of representative JAK inhibitors.

odzvali na ali so intolerantni na hidrokortikoidno, bolnikov z intermediarno ali visokotvegano mielofibrozo ter za zdravljenje odraslih in pediatričnih bolnikov z akutno zavrtnjavo presadka (24). Ruksolitinib tako kot ostali zaviralci JAK zavira signalno pot JAK-STAT in učinkovito zniža serumsko koncentracijo vnetnih citokinov, še posebej IL-6 in TNF α (25, 26). S preliminarno raziskavo na bolnikih s sHLH, ki so dvakrat dnevno jemali 15 mg ruksolitiniba, so pokazali, da je terapija izboljšala njihovo celokupno preživetje (27). Podobno kot pri baricitinibu so kot dodaten mehanizem delovanja predpostavili zaviranje s klatrinom posredovane endocitoze preko inhibicije AAK1. Ker je ruksolitinib dokaj šibak zaviralec tega encima, verjetno deluje le preko omejevanja vnetja kot posledice covid-19 (19). Med zaviralci JAK ruksolitinib uporabljajo v največ kliničnih raziskavah, njegovo učinkovitost za preprečevanje citokinske nevihte pri covid-19 trenutno vrednotijo v 14 kliničnih raziskavah po vsem svetu. V splošnem velja, da je najpogosteje predpisan odmerek v trenutnih kliničnih preskušanih 10 mg ruksolitiniba dvakrat na dan. V predhodnih kliničnih raziskavah so sicer ugotovili, da dolgoročno zdravljenje z ruksolitinibom lahko poveča tveganje za reaktivacijo latentnih virusnih okužb (28), npr. s hepatitisom B (29), kot tudi bakterijskih okužb, npr. tuberkulozo (30). V kohortni raziskavi so odkrili, da ruksolitinib pri odmerku 20 mg/dan povzroča anemijo, trombocitopenijo, nevtropenijo, edeme in transaminitis (31). **Tofacitinib** je zaviralec JAK3/1, ki je odobren za zdravljenje nekaterih revmatoidnih obolenj (11). Za razliko od baricitiniba in v manjši meri tudi ruksolitiniba tofacitinib ne zavira AAK1 (19). Trenutno potekata dve klinični raziskavi, ki vrednotita učinkovitost in varnost zaviranja poti JAK/STAT s tofacitinibom pri zdravljenju hudih oblik bolezni covid-19 (preglednica 1). V klinični raziskavi faze II (NCT04332042) bo 50 bolnikov, ki so razvili pljučnico, prejemale 10 mg tofacitiniba dvakrat na dan v obdobju 14 dni. S to raziskavo želijo v prvi fazi oceniti vpliv terapije s tofacitinibom na potrebo po mehanskem predihavanju. Z drugo raziskavo pa želijo ovrednotiti, ali je sočasno zdravljenje s tofacitinibom in hidrokortikoidom učinkovitejše v primerjavi z monoterapijo s hidrokortikoidom (NCT04390061). V sklopu predhodnih varnostnih raziskav so ugotovili, da zdravljenje s tofacitinibom lahko poveča tveganje za reaktivacijo latentnih virusnih okužb s herpes virusi in bakterijskih okužb zgornjega respiratornega trakta (32). Jemanje tofacitiniba so povezali tudi z anemijo, limfopenijo in nevtropenijo (33).

Čeprav so zaviralci JAK na splošno varne učinkovine, vseeno zavirajo imunski odziv telesa, saj blokirajo delovanje več citokinov, vključno z IFN- α , ki je bistveni sestavni del protivirusnega imunskega odziva (13). Za zaviralce JAK je prav

tako značilno, da povzročajo limfocitopenijo (zmanjšajo tudi število celic NK) in nevtropenijo, zato pri bolnikih s covid-19 povečajo tveganje za oportunistične okužbe ali reaktivacijo latentnih virusnih ali bakterijskih okužb (13, 20, 22, 34, 35). Uporabo zaviralcev JAK so povezali tudi s povečanim tveganjem za tromboembolijo, kar je še posebej pomembno v luči podatka, da se pri nekaterih bolnikih kot posledica covid-19 pojavljajo motnje v koagulaciji (35). Zaradi vseh naštetih neželenih učinkov je potrebno dobro premisliti, v katerih primerih in v kateri časovni točki je uporaba zaviralcev JAK pri blaženju citokinske nevihte kot posledice hudega poteka covid-19 smotrna. Zagotovo jih ni smiselno uporabljati v zelo zgodnji fazi okužbe in ob blagem poteku bolezni, saj se mora imunski sistem aktivirati za boj proti virusu, pri čemer pomembno sodelujejo interferoni. Predpostavili so, da jih je bolje aplicirati v drugi fazi bolezni, ko se virusna obremenitev nekoliko zmanjša, a še pred pojavom citokinske nevihte, kar se običajno zgodi v drugem tednu po okužbi (20).

3.2 ANTAGONISTI IL-6

IL-6 velja za enega ključnih mediatorjev vnetja v kontekstu sindroma sproščanja citokinov. Sproščajo ga aktivirani monociti in makrofagi, ki se odzivajo na evoluciono ohranjene strukture virusov. Med drugim je IL-6 odgovoren za spodbujanje diferenciacije celic Th17, katerih prekomerno aktivnost povezujemo s številnimi avtoimunskimi in kroničnimi vnetnimi boleznimi. Zaviranje signalizacije IL-6 se je izkazalo kot učinkovita terapevtska strategija za blaženje citokinske nevihte, ki občasno spremlja zdravljenje limfomov in levkemij z avtologno transfuzijo citotoksičnih limfocitov T, transduciranih s himernimi antigenskimi receptorji (CAR-T). Na osnovi sicer omejenih kliničnih raziskav sta tako EMA kot FDA odobrili uporabo tocilizumaba za preprečevanje citokinske nevihte, povezane s CAR-T (36).

Tocilizumab je humanizirano monoklonsko protitelo razreda IgG1, primarno indicirano za zdravljenje hudih oblik aktivnega revmatoidnega artritisa in juvenilnega idiopatskega artritisa. Veže se na receptor za IL-6 (IL-6R), tako na njegovo topno kot membransko obliko (obe se povezuje z membranskim proteinom gp130, ki prevaja signale v celico), in prepreči njegovo asociacijo z IL-6. Za preprečevanje sindroma sproščanja citokinov pri CAR-T ga odraslim bolnikom apliciramo v obliki enourne infuzije v odmerku 8 mg/kg telesne mase, bodisi v obliki monoterapije ali v kombinaciji s kortikosteroidi. Če se stanje po prvi infuziji ne izboljša, lahko zdravljenje apliciramo še do trikrat v razmiku najmanj 8 ur. Podoben terapevtski režim (1 do 8 mg/kg z največjim dovoljenim odmerkom 800 mg in ponovitev in-

Preglednica 1: Pregled potekajočih in načrtovanih kliničnih raziskav s ciljem ovrednotenja učinkovitosti in varnosti zaviralcev JAK za blaženje citokinske nevihte pri covid-19 (vir: clinicaltrials.gov).

Table 1: Overview of on-going and planned clinical trials evaluating efficacy and safety of JAK inhibitors for alleviating cytokine storm in covid-19 (source: clinicaltrials.gov).

Ident. št.	Načrt raziskave	Intervencija	Št. bolnikov	Predviden zaključek
NCT04359290	OKR, ES, F2	ruksolitinib	15	nov. 2020
NCT04361903	OpR, RKR, UC	ruksolitinib	13	maj 2020
NCT04348071	OKR, ES, F2/F3, UC	ruksolitinib	80	okt. 2020
NCT04334044	OKR, ES, F1/F2	ruksolitinib	20	jun. 2020
NCT04331665	OKR, ES	ruksolitinib	64	jan. 2021
NCT04338958	OKR, NRR, ES, F2	ruksolitinib	200	avg. 2021
NCT04362137	RR, DS, F3, MC	ruksolitinib vs. placebo	402	jul. 2020
NCT04377620	RR, DS, F3, MC	ruksolitinib (5 vs. 15 mg) vs. placebo	500	jul. 2020
NCT04354714	OKR, ES, F2	ruksolitinib	25	dec. 2021
NCT04366232	OKR, RR, F2b/3	ruksolitinib +anakinra vs. anakinra vs. standardno zdravljenje	54	avg. 2020
NCT04374149	OKR, NRR, F2	ruksolitinib +plazmafereza vs. plazmafereza	20	apr. 2021
NCT04348695	OKR, RR, F2	ruksolitinib +simvastatinom vs. standardno zdravljenje	94	maj 2020
NCT04355793	razširjen dostop	ruksolitinib	?	/
NCT04337359	razširjen dostop	ruksolitinib	srednja	/
NCT04320277	OKR, NRR, N, F2/3	baricitinib +lopinavir/ritonavir ^a	200	jul. 2020
NCT04321993	OKR, NRR, F2	baricitinib vs. hidroksiklorokin vs. lopinavir/ritonavir	1000	mar. 2022
NCT04340232	OKR, ES, F2/F3	baricitinib	80	okt. 2020
NCT04358614	OKR, NRR, N, F2/F3	baricitinib +protivirusna zdravila ^b	12	zaključena
NCT04373044	OKR, F2	baricitinib vs. hidroksiklorokin vs. lopinavir/ritonavir vs. remdesivir	59	apr. 2022
NCT04362943	OpR, RSR	baricitinib vs. anakinra	576	jul. 2020
NCT04346147	OKR, RR, P, F2	baricitinib vs. hidroksiklorokin vs. imatinib vs. lopinavir/ritonavir	165	sep. 2020
NCT04390464	OKR, RR, F4	baricitinib vs. ravulizumab ^c vs. standardno zdravljenje	1167	maj 2022
NCT04345289	DS, RR, F3, MC	konvalescentna plazma vs. sarilumab vs. hidroksiklorokin vs. baricitinib vs. placebo (p.o. vs. i.v.)	1500	jun. 2021
NCT04365764	OpR	različna zdravljenja, vključujoč baricitinib	400	dec. 2020
NCT04332042	OKR, P, ES, F2	tofocitinib	50	jul. 2020
NCT04390061	OKR, RR, F2, MC	tofocitinib +hidroksiklorokin vs. hidroksiklorokin	116	okt. 2020

2S – dvostopenjska raziskava; DS – dvojno slepa raziskava; ES – enoskupinska raziskava; F2 – raziskava druge faze; F3 – raziskava tretje faze; F4 – raziskava četrte faze; F – factorialna raziskava; MC – multicentrična raziskava; N – navzkrižna raziskava; NRR – nerandomizirana raziskava; OKR – odprta klinična raziskava; OpR – opazovalna raziskava; P – prospektivna raziskava; RR – randomizirana raziskava; RKR – retrospektivna kohortna raziskava; RSR – retrospektivna raziskava; UC – unicentrična raziskava

^a Bolniki, zdravljeni z baricitinibom in lopinavirjem/ritonavirjem od začetka, vs. bolniki, prvotno zdravljeni le s protivirusnimi zdravili in/ali hidroksiklorokinom

^b Bolniki, zdravljeni z baricitinibom in protivirusnimi zdravili od začetka, vs. bolniki, prvotno deležni le standardnega zdravljenja

^c Ravulizumab je monoklonsko protitelo, usmerjeno proti komplementu C5, ki prepreči s komplementom izzvano celično lizo

fuzije po 12 urah, če se stanje ne izboljša) uporabljajo v večini kliničnih raziskav, v katerih vrednotijo učinkovitost tocilizumaba za preprečevanje citokinske nevihte pri covid-19 (preglednica 2). Ob tocilizumabu proučujejo za enako terapevtsko indikacijo še nekatere novejša biološka učinkovina, ki zavirajo prenos signala IL-6 (preglednica 2). **Sarilumab**, humano monoklonsko protitelo razreda IgG1 za zdravljenje revmatoidnega artritisa, ki ga apliciramo subkutano, deluje kot klasičen antagonist receptorja IL-6R (37), medtem ko so **siltuksimab** (IgG1), **klazakizumab** (aglikozilirani IgG1), **olokizumab** (IgG4) in **sirukumab** (IgG1) monoklonska protitelesa, ki z vezavo na IL-6 preprečijo signalizacijo tega vnetnega citokina (37). Siltuksimab je sicer zdravilo sirota za zdravljenje multicentrične Castlemanove bolezni pri odraslih, ki niso okuženi z virusom humane imunske pomanjkljivosti (HIV) in humanim virusom herpesa tipa 8 (HHV-8). Apliciramo ga v obliki infuzije. Klazakizumab in olokizumab sta učinkovini v razvoju, katerih varnost in učinkovitost pri zdravljenju kroničnega idiopatskega artritisa (revmatoidnega, juvenilnega idiopatskega in psoriaznega artritisa ter ankilizirajočega spondilitisa) vrednotijo v kliničnih raziskavah, medtem ko je razvoj sirukumaba za enak nabor indikacij zastal, potem ko sta tako EMA kot FDA pri ocenjevanju dosjaja vloge za pridobitev tržnega dovoljenja zahtevali dodatne klinične podatke.

3.3 ANTAGONISTI IL-1

Ob IL-6 igra verjetno najpomembnejšo vlogo v patogenezi bronhoalveolarnega edema citokin IL-1 β (38). Tudi IL-1 β sproščajo aktivirani makrofagi in ima številne podobne funkcije kot IL-6. Zaviranje signalizacije IL-1 je uveljavljena terapevtska strategija pri blaženju kroničnih vnetnih bolezni, pri čemer izkoriščamo rekombinantni antagonist receptorja za IL-1 (anakinra) in protitelo, usmerjeno proti IL-1 β (canakinumab), medtem ko rilonacept, topen receptor za IL-1 (fuzijski protein IL-1R-Fc) ni več v uporabi (39). Trenutno poteka šest kliničnih raziskav, ki vrednotijo učinkovitost in varnost zaviranja signalizacije IL-1 pri zdravljenju hudih oblik bolezni covid-19 (preglednica 2). Dve raziskavi ocenjujeta primernost **anakinre**, ki jo sicer predpisujejo bolnikom z revmatoidnim artritisom, bolnikom s periodičnimi vročinskimi sindromi, povezanimi s kriopirinom, in bolnikom s Stillovo boleznijo (39). Anakinro apliciramo v obliki subkutanih injekcij. V treh raziskavah vrednotijo **canakinumab**. Šesta raziskava vrednoti **RPH-104**, rekombinantni antagonist IL-1 (fuzijski protein, heterodimer regije Fc IgG1 in ektodomene IL-1RI ter IL1RAP (pomožni protein receptorja za IL-1)) v primerjavi z olokizumabom in placebom pri zdravljenju covid-19.

Preglednica 2: Pregled potekajočih in načrtovanih kliničnih raziskav s ciljem ovrednotenja učinkovitosti in varnosti bioloških zdravil za blaženje citokinske nevihte pri covid-19 (vir: clinicaltrials.gov).

Table 2: Overview of on-going and planned clinical trials evaluating efficacy and safety of biologics for alleviating cytokine storm in covid-19 (source: clinicaltrials.gov).

Ident. št.	Načrt raziskave	Intervencija	Št. bolnikov	Predviden zaključek
NCT04315480	OKR, ES, F2, UC, 2S	tocilizumab	38	maj 2020
NCT04359667	OpR, ES, P, UC	tocilizumab	30	apr. 2020
NCT04310228	OKR, RR, MC	tocilizumab vs. favipiravir vs. favipiravir+ tocilizumab	150	maj 2020
NCT04335305	OKR, RR, F2, MC	tocilizumab +pembrolizumab vs. standardno zdravljenje	24	maj 2020
NCT04306705	OpR, RKR	tocilizumab vs. standardno zdravljenje vs. kontinuirana dializa	120	jun. 2020
NCT04346355	OKR, RR, F2, MC	tocilizumab vs. standardno zdravljenje	398	maj 2020
NCT04365764	OpR, RSR	različna zdravljenja, vključno s tocilizumabom	400	dec. 2020
NCT04333914	OKR, RR, F2, MC	GNS561 (analog klorokina) vs. tocilizumab vs. nivolumab vs. standardno zdravljenje	273 ^a	avg. 2020
NCT04356937	DS, RR, F3, UC	tocilizumab vs. placebo	300	avg. 2020
NCT04363853	OKR, ES, F2, P	tocilizumab	200	avg. 2020
NCT04363736	OKR, RR, F2, MC	tocilizumab (4 vs. 8 mg/kg i.v.)	100	avg. 2020

NCT04331795	OKR, NRR, F2, UC	tocilizumab (200 vs. 80 mg) ^b	50	dec. 2020
NCT04366206	OpR, P	različna zdravljenja, vključno s tocilizumabom in sarilumabom	143	jul. 2020
NCT04372186	DS, RR, F3, MC	tocilizumab vs. placebo	379	okt. 2020
NCT04320615	DS, RR, F3, MC	tocilizumab vs. placebo	330	sep. 2020
NCT04330638	P, RKR, OKR, F, F4, MC	anakinra, siltuksimab, anakinra+siltuksimab, tocilizumab, anakinra+tocilizumab vs. standardno zdravljenje	342	dec. 2020
NCT04332094	OKR, RR, F2, MC	tocilizumab +hidroksiklorokin+azitromicin vs. hidroksiklorokin+azitromicin	276	okt. 2020
NCT04361032	OKR, RR, F3, MC	tocilizumab +enoksaparin vs. deferoxamin +enoksaparin	260	okt. 2020
NCT04335071	DS, RR, F2, MC	tocilizumab vs. placebo	100	okt. 2020
NCT04345445	OKR, RR, N, UC	tocilizumab , metilprednizolon	310	okt. 2020
NCT04332913	OpR, P	tocilizumab	30	mar. 2021
NCT04317092	OKR, ES, F2, MC	tocilizumab	400	dec. 2022
NCT04331808	OKR, RR, F2	tocilizumab vs. standardno zdravljenje	228	dec. 2021
NCT04322773	OKR, RR, F2, MC	tocilizumab (i.v. vs. s.c.) vs. sarilumab (s.c.) vs. standardno zdravljenje	200	jun. 2021
NCT04370834	OKR, ES, F2	tocilizumab	200 ^c	jan. 2022
NCT04361552	OKR, RR, F3, UC	tocilizumab vs. standardno zdravljenje	180	maj 2022
NCT04339712	OKR, NRR, F, MC	anakinra, tocilizumab	40	apr. 2022
NCT04341870	OKR, RR, F2/3, MC	sarilumab vs. sarilumab +azitromicin+hidroksiklorokin	27	avg. 2020
NCT04357808	OKR, RR, F2, UC	sarilumab vs. standardno zdravljenje	30	jun. 2020
NCT04327388	DS, RR, F2/F3	sarilumab vs. placebo	300	avg. 2020
NCT04357860	OKR, RR, F2, UC	sarilumab (200 vs. 400 mg) vs. placebo	120	jul. 2020
NCT04321993	OKR, NRR, F2	sarilumab vs. lopinavir/ritonavir vs. hidroksiklorokin vs. baricitinib vs. standardno zdravljenje	1000	jul. 2021
NCT04315298	DS, RR, F2/F3	sarilumab (visok vs. nizek odmerek) vs. placebo	400	apr. 2021
NCT04359901	OKR, RR, F2, UC	sarilumab vs. standardno zdravljenje	120	apr. 2023
NCT04324073	OKR, RR, F2/3	sarilumab vs. standardno zdravljenje	239	dec. 2021
NCT04345289	DS, RR, F3, MC	sarilumab vs. konvalescentna plazma vs. hidroksiklorokin vs. baricitinib vs. placebo (p. o. vs. i. v.)	1500	jun. 2021
NCT04322188	OpR, RSR	siltuksimab vs. standardno zdravljenje	50	maj 2020
NCT04329650	OKR, RR, F2	siltuksimab vs. prednizolon	200	maj 2020
NCT04380519	DS, RR, MC	RPH-104^d vs. olokizumab vs. placebo	372	nov. 2020
NCT04380961	DS, RR, F2	sirukumab vs. placebo	270	sep. 2020

NCT04381052	DS, RR, F2/3	klazakizumab vs. placebo	30	avg. 2020
NCT04343989	DS, RR, F2/3	klazakizumab (25 vs. 12,5 mg) vs. placebo	90	jul. 2020
NCT04348500	DS/OKR, RR, F2	klazakizumab vs. placebo	60	mar. 2021
NCT04363502	DS, RR	klazakizumab vs. placebo	30	avg. 2020
NCT04351724	OKR, RR, MC	klorokin ali hidroksiklorokin vs. lopinavir/ritonavir vs. rivaroksaban vs. tromboprofilaksa vs. kandesartan vs. antihipertenzivi, ki ne blokirajo poti RAS vs. klazakizumab vs. standardno zdravljenje vs. placebo (za klazakizumab)	500	dec. 2020
NCT04362813	DS, RR, F3, MC	canakinumab vs. placebo	450	okt. 2020
NCT04348448	OpR, P	canakinumab	100	sep. 2020
NCT04365153	DS, RR, F, F2, UC	canakinumab (300 mg vs. 600 mg) vs. placebo	45	dec. 2020

2S – dvostopenjska raziskava; DS – dvojno slepa raziskava; ES – enoskupinska raziskava; F2 – raziskava druge faze; F3 – raziskava tretje faze; F4 – raziskava četrte faze; F – faktorialna raziskava; MC – multicentrična raziskava; N – navzkrižna raziskava; NRR – nerandomizirana raziskava; OKR – odprta klinična raziskava; OpR – opazovalna raziskava; P – prospektivna raziskava; RR – randomizirana raziskava; RKR – retrospektivna kohortna raziskava; RSR – retrospektivna raziskava; UC – unicentrična raziskava

^a Bolniki z napredovanimi ali metastatskimi raki in covid-19

^b Hospitalizirani bolniki s pljučnico covid-19 s tveganjem/brez tveganja za dekompenzacijo

^c Bolniki z rakom in covid-19

3.4 OSTALE IMUNOMODULATORNE UČINKOVINE

3.4.1 Azitromicin

Azitromicin je makrolidni antibiotik, ki ga med drugim uporabljamo za zdravljenje bakterijskih bronhitisov in pljučnic in ima poleg protibakterijskega tudi imunomodulatorni učinek (40). Sočasno zdravljenje z makrolidnimi in beta-laktamskimi antibiotiki zmanjša smrtnost pri hospitaliziranih bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico, medtem ko kombinacije beta-laktamov z drugimi antibiotiki, ki so sicer učinkoviti tudi proti atipičnim patogenom, nimajo enakega terapevtskega izida (41). Točen imunomodulatorni mehanizem delovanja azitromicina še ni povsem pojasnjen. Obstajajo dokazi, da makrolidi zavirajo aktivnost nevtrofilcev, sintezo in sproščanje številnih interlevkinov (npr. IL-8 in IL-1 β) (40) in kemokinov (42). Dodaten mehanizem delovanja azitromicina, ki bi utegnil biti zanimiv pri zdravljenju covid-19, je oviranje endosomskega zorenja virusa SARS-CoV-2, pomembnega za zlitje virusne ovojnice z membrano endosomov, kot tudi eksocitoznih mehanizmov, ki jih virus izkorišča za izstop iz celic (43). Azitromicin je namreč po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih lizosomotropična učinkovina. Znatna lipofilnost in šibka bazičnost mu omogočata vstop v endosomske vezikle s pasivno difuzijo, kjer se v kislem okolju protonira. Kopičenje azitromicina v endolizosomih domnevno spremeni normalen pH v teh organelih, kar ovira življenjski cikel virusa (43). Seveda ne gre zane-

mariti tudi protibakterijskega delovanja azitromicina pri preprečevanju superinfekcij. Kombinacija protivnetnega, imunomodulatornega in opisanega protivirusnega delovanja azitromicina bi utegnila prispevati k sočasnemu zmanjšanju obremenitve z virusom in blaženju sproščanja citokinov, a bo potrebno učinkovitost takšnega zdravljenja pri covid-19 potrditi v kliničnih raziskavah.

3.4.2 Hidroksiklorokin in klorokin

Hidroksiklorokin in klorokin sta učinkovini, ki ju povezujemo primarno z zdravljenjem malarije, a imata tudi številne imunomodulatorne učinke (44), ki jih izkoriščamo pri blaženju simptomov avtoimunskih bolezni, kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematosus. Njuno imunomodulatorno delovanje je posledica vpletanja v zakisanje vsebine lizosomov (podobno kot azitromicin sta lizosomotropični učinkovini in tako izkazujeta tudi protivirusno delovanje (45)), kar ovira proteolizo in predstavljanje antigenov s strani makrofagov (46) ter zavira signalizacijo endosomskih PRR – receptorjev TLR (*Toll-like receptors*) (47). Poleg tega zavirata fosfolipazo A2, s čimer je zmanjšano nastajanje prostaglandinov, omejitja sproščanje IL-1 in IL-6 (48) ter zmanjšata aktivacijo limfocitov T (49). Predvsem hidroksiklorokin (tudi v kombinaciji s sinergistično delujočim azitromicinom) vrednotijo v številnih kliničnih raziskavah po svetu za zdravljenje bolezni covid-19. Opozoriti velja na resne neželene učinke, povezane z uporabo visokih odmerkov (hidroksi)klorokina, kakršne uporabljajo pri zdravljenju okužb s SARS-CoV-2.

EMA je na podlagi zgodnjih rezultatov nedavnih kliničnih raziskav o uporabi klorokina in hidroksiklorokina pri bolnikih s covid-19 (50, 51) izdala opozorilo, da učinkovini lahko izzoveta srčno aritmijo (specifično: podaljšanje intervala QT), ki je lahko celo vzrok smrti, povzročita poškodbe jeter in ledvic, hipoglikemijo ter periferno nevropatijo (52).

3.4.3 Zaviralci tirozin kinaz

Zaviralci tirozin kinaz, kot so imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib in ponatinib, so učinkovine, indicirane za zdravljenje kronične mieloidne levkemije, specifičnih akutno limfoblastnih levkemij in nekaterih tumorjev (53). Odkrili so, da imajo tudi protivnetno delovanje, hkrati pa lahko blago dejno vplivajo tudi na imunski odziv, saj privedejo do reaktivacije limfocitov T in NK-celic (54). V tem pogledu je zlasti izstopal imatinib, ki so ga zaradi dobrega varnostnega profila (55) že vključili v nekaj kliničnih raziskav na bolnikih s covid-19 (NCT04357613, NCT04356495 in NCT04346147). Tudi bosutinib in nilotinib sta v raziskavah *in vivo* pokazala protivnetno delovanje, ki se je odražalo predvsem v blokadi signalne poti NF- κ B in s tem v zmanjšanem izločanju vnetnih citokinov (56-58). Kljub temu da se je bosutinib v varnostnih študijah izkazal kot bolj varen od imatiniba (59), ga zaenkrat še niso vključili v nobeno klinično raziskavo na bolnikih s covid-19. V primeru nilotiniba so se na podlagi raziskave, ki je nilotinib povezala s kardiovaskularnimi zapleti (60), odločili proti vključitvi v tovrstne klinične raziskave.

3.4.4 Antagonisti TNF α

Koncentracije TNF α so v serumu bolnikov s hujšo obliko covid-19 nekoliko povišane, a ne tako izrazito, kot to velja za nekatere druge vnetne citokine (6). Kljub temu je zaviranje signalizacije TNF α med citokinsko nevihto morda smiselno, saj prav ta citokin nadzira številne vnetne procese in spodbuja sproščanje IL-6. Temu v prid govori tudi dejstvo, da so v raziskavah na miših, okuženih z virusom SARS-CoV-1, pokazali, da nevtralizacija TNF α poveča verjetnost preživetja živali (61). Tako imenovane antagoniste TNF α , rekombinantna monoklonska protitelesa (npr. adalimumab, golimumab in infliximab) ali topni receptor (etanercept), ki z vezavo citokina preprečijo njegovo asociacijo z receptorjem, uporabljamo za zdravljenje številnih kroničnih vnetnih bolezni. Ob nevtralizaciji TNF α te učinkovine izzovejo tudi znižanje števila aktiviranih monocitov in makrofagov, ki izražajo membransko obliko receptorja za TNF α , po mehanizmu s protitelesi posredovane celične citotoksičnosti (62). Ker so prav monociti/makrofagi eni od osrednjih krivcev za citokinsko nevihto, predstavljajo antagonisti

TNF α še eno potencialno pomembno skupino učinkovin za preprečevanje simptomov pri hudi obliki bolezni covid-19. V klinične raziskave blaženja citokinske nevihte pri covid-19 jih (še) niso vključili.

3.4.5 Modulatorji eikozanoidnega odziva

Kot inovativen pristop zaviranja vnetne reakcije pri covid-19 so predlagali terapevtsko uporabo sicer endogenih avtakoidnih mediatorjev (resolvinov, lipoksinov in protektinov; skupno poimenovanih tudi SPM (*specialized pro-resolving mediators*)), ki spodbujajo sprotno odstranjevanje celičnih komponent, nastalih pri apoptotičnih procesih med virusno okužbo, s fagocitozo (5). To bi utegnilo voditi do manjše aktivacije alveolarnih makrofagov in preprečitve t. i. eikozanoidne nevihte, ki je podlaga sproščanja vnetnih citokinov. Še ena možnost blaženja vnetja je uporaba zaviralcev epoksid hidrolaze, encima, ki katalizira hidrolizo epoksi-eikozatrienojskih kislin (EET). EET so namreč parakrino delujoče epoksimaščobne kisline, ki nastajajo iz arahidonske kisline in spodbujajo sproščanje lipoksinov in tako posredno zavrejo tvorbo prostaglandinov in levkotrienov (5). Tako SPM kot EET oslabijo proces tromboze, ki v nekaterih primerih dodatno zaplete potek težke bolezni covid-19.

4 SKLEP

Sindrom sproščanja citokinov je resen zaplet, ki pri nekaterih obolelih za covid-19 spremlja pozno fazo okužbe. Obsežna vnetna reakcija in infiltracija tkiv z imunskimi celicami je odgovorna za pljučni edem, nepovratne poškodbe pljuč in drugih organov. Medtem ko bodo cepiva omogočila preprečevanje okužb z virusom SARS-CoV-2 in protivirusne učinkovine zavrle njegovo namnoževanje v zgodnji fazi okužbe, bo za omejitev nenadzorovanega odziva imunskega sistema, značilnega za kasnejši hujši potek bolezni, ključno s podpornim zdravljenjem tarčno utišati signalizacijo specifičnih mediatorjev vnetja. Preusmeritev zdravil, katerih uporaba je odobrena za druge terapevtske indikacije (in sta torej njihova farmakokinetika in varnostni profil dobro raziskana), v zdravljenje hudih oblik covid-19 se ponuja kot možnost za razvoj razmeroma hitrega farmakološkega posredovanja. Izpostaviti velja, da svetovna zdravstvena organizacija (WHO) v aktualnih smernicah zdravljenja covid-19 (63) ne omenja uporabe imunomodulatornih ali imunosupresivnih zdravil z izjemo kortikosteroidov. Rutinsko

uporabo kortikosteroidov pri virusnih pljučnicah (tudi covid-19) zaradi pomanjkanja dokazov o učinkovitosti in možnostih neželenih učinkov sicer odsvetujejo (64). Trenutno še ni dovolj podatkov o učinkovitosti tovrstnega zdravljenja covid-19 (niti za tocilizumab, edino učinkovino, odobreno za preprečevanje citokinske nevihte) za izdajo splošnih priporočil. Zaviranje delovanja imunskega sistema med resno in obsežno virusno okužbo je namreč dvorezen meč. Vsa kršna uporaba imunomodulatornih/imosupresivnih zdravil je tako omejena na klinične raziskave. Številne med njimi bodo prve rezultate dale že kmalu.

5 VIRI

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9.
2. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect*. 2020;80(6):607-13.
3. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):87-103.
4. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
5. Panigrahy D, Gilligan MM, Huang S, Gartung A, Cortes-Puch I, Sime PJ et al. Inflammation resolution: a dual-pronged approach to averting cytokine storms in COVID-19? *Cancer Metastasis Rev*. 2020;
6. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 2020;130(5):2620-9.
7. Pedersen SF, Ho YC. SARS-CoV-2: a storm is raging. *J Clin Invest*. 2020;130(5):2202-5.
8. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033-4.
9. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
10. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020;46(5):846-8.
11. Chaplin S. Janus kinase inhibitors for autoimmune disorders. *Prescriber*. 2017;28(12):33-7.
12. Roskoski R, Jr. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. *Pharmacol Res*. 2016;111:784-803.
13. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O'Shea JJ. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;17(1):78.
14. Sanchez GAM, Reinhardt A, Ramsey S, Wittkowski H, Hashkes PJ, Berkun Y et al. JAK1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of autoinflammatory interferonopathies. *J Clin Invest*. 2018;128(7):3041-52.
15. Peterson D, Damsky W, King B. The use of Janus kinase inhibitors in the time of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Am Acad Dermatol*. 2020;82(6):e223-6.
16. de Lang A, Osterhaus AD, Haagmans BL. Interferon-gamma and interleukin-4 downregulate expression of the SARS coronavirus receptor ACE2 in Vero E6 cells. *Virology*. 2006;353(2):474-81.
17. Sorrell FJ, Szklarz M, Abdul Azeez KR, Elkins JM, Knapp S. Family-wide structural analysis of human numb-associated protein kinases. *Structure*. 2016;24(3):401-11.
18. Bekerman E, Neveu G, Shulla A, Brannan J, Pu SY, Wang S et al. Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1338-52.
19. Stebbing J, Phelan A, Griffin I, Tucker C, Oechsle O, Smith D et al. COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(4):400-2.
20. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet*. 2020;395(10223):e30-1.
21. Cantini F, Niccoli L, Matarrese D, Nicastrì E, Stobbione P, Goletti D. Baricitinib therapy in COVID-19: A pilot study on safety and clinical impact. *J Infect*. 2020.
22. Praveen D, Puvvada RC, M VA. Janus kinase inhibitor baricitinib is not an ideal option for management of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;105967.
23. Smolen JS, Genovese MC, Takeuchi T, Hyslop DL, Macias WL, Rooney T et al. Safety profile of baricitinib in patients with active rheumatoid arthritis with over 2 years median time in treatment. *J Rheumatol*. 2019;46(1):7-18.
24. Mascarenhas J, Hoffman R. Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(11):3008-14.
25. Arana Yi C, Tam CS, Verstovsek S. Efficacy and safety of ruxolitinib in the treatment of patients with myelofibrosis. *Future Oncol*. 2015;11(5):719-33.
26. Albeituni S, Verbist KC, Tedrick PE, Tillman H, Picarsic J, Bassett R et al. Mechanisms of action of ruxolitinib in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2019;134(2):147-59.
27. Ahmed A, Merrill SA, Alsawah F, Bockenstedt P, Campagnaro E, Devata S et al. Ruxolitinib in adult patients with secondary haemophagocytic lymphohistiocytosis: an open-label, single-centre, pilot trial. *Lancet Haematol*. 2019;6(12): e630-e7.
28. Sant'Antonio E, Bonifacio M, Breccia M, Rumi E. A journey through infectious risk associated with ruxolitinib. *Br J Haematol* 2019; 187 (3): 286-295.
29. Caocci G, Murgia F, Podda L, Solinas A, Atzeni S, La Nasa G. Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. *Leukemia*. 2014;28(1):225-7.
30. Khalid F, Damlaj M, AlZahrani M, Abuelgasim KA, Gmati GE. Reactivation of tuberculosis following ruxolitinib therapy for primary myelofibrosis: Case series and literature review. *Hematol Oncol Stem. Cell Ther* 2020.
31. Hui L, Qi L, Guoyu H, Xuliang S, Meiao T. Ruxolitinib for treatment of steroid-refractory graft-versus-host disease in adults: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Hematol*. 2020;13(5):565-75.
32. Papp KA, Menter MA, Abe M, Elewski B, Feldman SR, Gottlieb AB et al. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, for the treatment of chronic plaque psoriasis: results from two randomized, placebo-controlled, phase III trials. *Br J Dermatol*. 2015;173(4):949-61.

33. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovskaya V et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood*. 2013;122(25):4047-53.
34. Cinats A, Heck E, Robertson L. Janus kinase inhibitors: A review of their emerging applications in dermatology. *Skin Therapy Lett*. 2018;23(3):5-9.
35. Spinelli FR, Conti F, Gadina M. HiJAKing SARS-CoV-2? The potential role of JAK inhibitors in the management of COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;8;5(47):eabc5367.
36. Kotch C, Barrett D, Teachey DT. Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(8):813-22.
37. Karkhur S, Hasanreisoglu M, Vigil E, Halim MS, Hassan M, Plaza C et al. Interleukin-6 inhibition in the management of non-infectious uveitis and beyond. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2019;9(1):17.
38. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(1):16-32.
39. Rigante D. A systematic approach to autoinflammatory syndromes: a spelling booklet for the beginner. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(6):571-97.
40. Zimmermann P, Ziesenitz VC, Curtis N, Ritz N. The immunomodulatory effects of macrolides - A systematic review of the underlying mechanisms. *Front Immunol*. 2018;9:302.
41. Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(1):10-21.
42. Schultz MJ, Speelman P, Hack CE, Buurman WA, van Deventer SJ, van Der Poll T. Intravenous infusion of erythromycin inhibits CXC chemokine production, but augments neutrophil degranulation in whole blood stimulated with *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(2):235-40.
43. Homolák J, Kodvanj I. Widely available lysosomotropic agents should be considered as a potential therapy for COVID-19. *Preprints* 2020;2020030345.
44. Ben-Zvi I, Kivity S, Langevitz P, Shoenfeld Y. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42(2):145-53.
45. Vincent MJ, Bergeron E, Benjannet S, Erickson BR, Rollin PE, Ksiazek TG et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology*. 2005; 2:69.
46. Ziegler HK, Unanue ER. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(1):175-8.
47. Kyburz D, Brentano F, Gay S. Mode of action of hydroxychloroquine in RA-evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(9):458-9.
48. Sperber K, Quraishi H, Kalb TH, Panja A, Stecher V, Mayer L. Selective regulation of cytokine secretion by hydroxychloroquine: inhibition of interleukin 1 alpha (IL-1-alpha) and IL-6 in human monocytes and T cells. *J Rheumatol*. 1993;20(5):803-8.
49. Goldman FD, Gilman AL, Hollenback C, Kato RM, Premack BA, Rawlings DJ. Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. *Blood*. 2000;95(11):3460-6.
50. Silva Borba MG, Almeida Val FF, Sousa Sampaio V, Araújo Alexandre MA, Cardoso Melo G, Brito M et al. 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* 2020.
51. Lane JCE, Weaver J, Kosta K, Duarte-Salles T, Abrahao MTF, Alghoul H et al. Safety of hydroxychloroquine, alone and in combination with azithromycin, in light of rapid wide-spread use for COVID-19: a multinational, network cohort and self-controlled case series study. *medRxiv* 2020.
52. EMA. COVID-19: reminder of risk of serious side effects with chloroquine and hydroxychloroquine. 2020 [cited 2020 June 2]; <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-reminder-risk-serious-side-effects-chloroquine-hydroxychloroquine>
53. Jain P, Kantarjian H, Cortes J. Chronic myeloid leukemia: overview of new agents and comparative analysis. *Curr Treat Options Oncol*. 2013;14(2):127-43.
54. Galimberti S, Baldini C, Barate C, Ricci F, Balducci S, Grassi S et al. The CoV-2 outbreak: how hematologists could help to fight Covid-19. *Pharmacol Res*. 2020;157:104866.
55. Olivieri A, Locatelli F, Zecca M, Sanna A, Cimminiello M, Raimondi R et al. Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood*. 2009;114(3):709-18.
56. Ma L, Manaenko A, Ou YB, Shao AW, Yang SX, Zhang JH. Bosutinib attenuates inflammation via inhibiting salt-inducible kinases in experimental model of intracerebral hemorrhage on mice. *Stroke*. 2017;48(11):3108-16.
57. Lonskaya I, Hebron ML, Selby ST, Turner RS, Moussa CE. Nilotinib and bosutinib modulate pre-plaque alterations of blood immune markers and neuro-inflammation in Alzheimer's disease models. *Neuroscience*. 2015;304 316-27.
58. Marinelli Busilacchi E, Costantini A, Viola N, Costantini B, Olivieri J, Butini L et al. Immunomodulatory effects of tyrosine kinase inhibitor in vitro and in vivo study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(2):267-75.
59. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim DW et al. Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results from the randomized BFORE trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(3):231-7.
60. Caocci G, Mulas O, Annunziata M, Luciano L, Bonifacio M, Orlandi EM et al. Cardiovascular toxicity in patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors in the real-life practice: Identification of risk factors and the role of prophylaxis. *Am J Hematol*. 2018;93(7):E159-61.
61. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK et al. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe*. 2016;19(2):181-93.
62. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF-alpha agents - Comparison among therapeutic TNF-alpha antagonists. *Cytokine*. 2018;101:56-63.
63. WHO. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. Interim guidance. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected)
64. Li H, Chen C, Hu F, Wang J, Zhao Q, Gale RP et al. Impact of corticosteroid therapy on outcomes of persons with SARS-CoV-2, SARS-CoV, or MERS-CoV infection: a systematic review and meta-analysis. *Leukemia*. 2020;34:1503-11.

RAZVOJ CEPIV PROTI VIRUSU SARS-COV-2

SARS-COV-2 VACCINE PIPELINE

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.¹

Izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.¹

Doc. dr. Nika Lovšin, univ. dipl. kem.²

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za klinično biokemijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: marija.nika.lovsin@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Koronavirusna bolezen 19 (covid-19) je izbruhnila konec leta 2019 na Kitajskem in se z naglico razširila po celem svetu (1). Do sedaj (19. maj 2020) se je okužilo že 4.823.479 ljudi v 188 državah sveta, umrlo pa jih je 318.857 (2). Zaradi velike kužnosti (reprodukcijsko število virusa – število ljudi, ki jih okuženi posameznik okuži – je 2,2) in relativno visoke smrtnosti (število smrtnih primerov glede na potrjene okužbe) predstavlja covid-19 veliko grožnjo človeštvu, zato je Svetovna zdravstvena organizacija WHO (*World Health Organisation*) 11. marca 2020 razglasila pandemijo.

Najboljša rešitev za zamejitev širjenja boleznii oz. preprečitev izbruha novega vala pandemije je razvoj cepiva, ki bo za-

POVZETEK

Pandemija boleznii covid-19 je vplivala na življenje ljudi, na svetovno gospodarstvo in zdravstvo in tako spodbudila pospešen razvoj cepiv proti virusu SARS-CoV-2. Razvoj gre tudi v smer uporabe obetavnih inovativnih, a še neuveljavljenih platform, kot so vektorska cepiva ter cepiva na osnovi DNA in RNA. Predvidevajo, da bo razvoj cepiva stal okoli 2 milijardi dolarjev in trajal od 12 do 18 mesecev. Trenutno poteka razvoj 115 cepiv, od tega jih je 73 v predklinični fazi, 10 pa v prvi ali drugi stopnji kliničnega preskušanja. Šele rezultati tretje stopnje preskušanja, ki bodo vključevali več tisoč prostovoljcev in njihovo dolgoročno spremljanje, bodo dali odgovor, ali s cepivom dosežemo želeno zaščito pred patogenom. Na poti do končnega cilja varnega, učinkovitega in vsem dostopnega cepiva bo potrebno zaobiti še precejšnje ovire, povezane tudi s stroškovno učinkovito proizvodnjo, predvsem pri novih platformah, pri katerih proizvodna infrastruktura še ne obstaja.

KLJUČNE BESEDE:

cepiva, covid-19, SARS-CoV-2

ABSTRACT

The enormous impact of covid-19 pandemic on everyday life, global economy and healthcare has stimulated the fast-tracked development of SARS-CoV-2 vaccines. Development is directed also towards promising innovative although not yet established platforms, such as vector vaccines and DNA and RNA-based vaccines. The SARS-CoV-2 vaccine development is projected to cost about 2 billion USD and take 12 to 18 months. 115 vaccines are currently being developed, of which 73 are in the preclinical phase and 10 in the first or second stage of a clinical trials. Only the results of the third stage of trials, which will include thousands of volunteers and their long-term monitoring, will give an answer as to whether the vaccine achieves the desired protection against the pathogen. On the way to the ultimate goal of a safe, effective and accessible vaccine, significant barriers to cost-effective production will still need to be overcome, especially for new platforms for which production infrastructure does not yet exist.

KEY WORDS:

covid-19, SARS-CoV-2, vaccines



ščitilo večji del populacije pred obolevanjem in smrtjo za covid-19. Cepiva (vaccine) pri prejemniku izzovejo aktivacijo imunskega odziva in oblikovanje imunskega spomina. Cepljen posameznik postane imun na okužbo s specifičnim povzročiteljem bolezni. Če je precepljen dovolj velik delež populacije, je prekinjena veriga prenosa patogena, s čimer so pred nalezljivo boleznijo posredno zaščiteni tudi posamezniki, ki jih iz različnih razlogov ne moremo cepiti. Kmalu po določitvi nukleotidnega zaporedja novega virusa SARS-CoV-2 (3) je stekel razvoj protivirusnih zdravil in cepiv. Zaradi ogromnega vpliva pandemije na življenje ljudi in svetovno gospodarstvo ter zdravstvo so znanstveniki iz javnega in zasebnega sektorja pričeli s pospešenim razvojem cepiv, pri čemer so posegli tudi po obetavnih inovativnih, a še neuveljavljenih platformah (4, 5). Pandemija covid-19 pomeni tudi prelomnico v hitrosti bazičnih in predkliničnih raziskav; raziskave, ki običajno trajajo nekaj let, so tokrat znanstveniki izvedli tudi v le mesecu dni (6). Prva kandidatna cepiva so tako že marca 2020 vstopila v fazo kliničnega vrednotenja.

Koordinacijo razvoja cepiva proti SARS-CoV-2 in razporeditev finančnih sredstev za projekte je prevzela globalna organizacija CEPI (*The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*) (6, 7). Gre za človekoljubno organizacijo, ki deluje pod okriljem Združenih narodov, Evropske komisije, fundacije Wellcome Trust, fundacije Billa in Melinde Gates in nekaterih vlad ter povezuje javno in zasebno partnerstvo. Poleg donatorskih sredstev, Evropske komisije in nekaterih vlad se direktno financira tudi iz Svetovne banke. Glavni cilj organizacije je omogočiti in poskrbeti, da bo cepivo dostopno vsem. Predvidevajo, da bo razvoj cepiva stal okoli 2 milijardi dolarjev in trajal 12 do 18 mesecev (8). Trenutno (maj 2020) poteka razvoj 115 cepiv, od tega jih je 73 v predklinični fazi, 10 pa v klinični fazi (preglednica 1) (6, 9).

V CEPI pričakujejo, da bodo financirali testiranje osmih cepiv v prvi klinični fazi, šest kandidatnih cepiv pa bo vstopilo v drugo in tretjo klinično fazo raziskav. Vsaj tri cepiva naj bi prejela odobritev regulatornih organizacij in bila dovolj kakovostna, varna in učinkovita za začetek množične proizvodnje. Ker na začetku ne bo dovolj cepiva za celotno populacijo, bodo imeli prednost pri cepljenju zdravstveni delavci, ki so najbolj ogroženi, in ljudje, ki so bolj dovzetni za težko obliko bolezni in pri katerih bi okužba lahko vodila tudi do smrti. Večino cepiv razvija zasebni sektor (72 %), 28 % pa akademske in javne institucije (6). V razvoj cepiva so se vključila tudi nekatera multinacionalna farmacevtska podjetja, vendar daleč največ prizadevanj ostaja v majhnih zasebnih podjetjih. Večino kandidatnih cepiv razvijajo v

ZDA (46 %), 18 % na Kitajskem, 18 % v Evropi, preostalo pa v drugih azijskih državah in Avstraliji (6).

2 NAČRTOVANJE CEPIVA

Leta 2009 so ob pojavu pandemije virusa influence H1N1 (povzročitelja »prašičje« gripe) znanstveniki potrebovali šest mesecev za razvoj cepiva, čeprav so imeli na voljo preizkušeni in odobren proces proizvodnje cepiva proti sorodnemu virusu sezonske gripe. Tokrat se soočamo s povsem novim virusom, za katerega še ne obstaja odobreno cepivo. Zato je hiter razvoj cepiva proti SARS-CoV-2 izziv tako s stališča validacije primerne platforme, ki bo dala učinkovito in varno cepivo, kot s stališč regulative, hitre vzpostavitve množične proizvodnje in distribucije cepiva. Tehnologije razvoja cepiv so v zadnjem desetletju zelo napredovale. Pojavila so se kandidatna cepiva na osnovi nukleinskih kislin (tako RNA kot DNA), cepiva na osnovi vektorskih mikroorganizmov in cepiva, ki temeljijo na rekombinantnih proteinskih antigenih (4). Poleg novih platform si znanstveniki pri razvoju cepiva proti SARS-CoV-2 pomagajo tudi z znanjem in izkušnjami, pridobljenimi pri raziskavah cepiv proti sorodnima virusoma SARS-CoV-1 (analogno imenovan tudi SARS-CoV) in MERS-CoV, saj so si ti betakoronavirusi zelo podobni. SARS-CoV-2 izkazuje visoko stopnjo homologije (79 %) z virusom SARS-CoV-1 (3, 10). Na osnovi podobnosti s SARS-CoV-1 in MERS-CoV so hitro opredelili kot najugodnejšo tarčo za načrtovanje imunogena protein virusne ovojnice, t. i. protein S. Prostorsko strukturo proteina S SARS-CoV-2 so določili v rekordno kratkem času. To je pomembno prispevalo k razumevanju vezave virusnega proteina na pripadajoči receptor ACE2 na gostiteljskih celicah ter načrtovanju imunogena (11, 12). Po imunizaciji nastala protitelesa proti proteinu S preprečijo vezavo virusa na receptor in s tem onemogočijo vstop virusa v celice. Takšna protitelesa imajo nevtralizirajoči učinek.

Po izbruhu virusa SARS-CoV-1 leta 2003 so razvili več kandidatnih cepiv, ki so jih že testirali na živalskih modelih. Ta cepiva so temeljila na oslabljenih virusih, inaktiviranih virusih, vektorskih cepivih, cepivih na osnovi DNA, pa tudi na rekombinantnem proteinu S (pregledano v (13, 14)). V večini primerov so se ta cepiva izkazala kot učinkovita, ponekod pa so se pojavili resni neželeni učinki. Rezultati prve faze kliničnih preskušanj so optimistični in so pokazali, da so cepiva proti SARS-CoV-1, osnovana na inaktiviranem virusu

in temelječa na DNA, varna in izzovejo nastanek nevtralizirajočih protiteles (14). Pri razvoju cepiva proti SARS-CoV-2 bodo ključna testiranja varnosti cepiva pri človeku. Skrbno je treba preveriti, ali cepivo povzroči imunopotenciacijo. Pomembno je tudi, da bo cepivo primerno za starejše od 60. leta in tiste s predhodnimi zdravstvenimi težavami (hipertenzija, diabetes). Ker so se pri ljudeh, ki so preboleli SARS in MERS, titri protiteles po dveh letih znižali, je pri načrtovanju cepiva pomembno upoštevati možnost upada imunskega odziva (pregledano v (13)). Pandemija pa je tudi opozorilo, da je nujno pripraviti tehnologije, ki bodo uporabne ob ponovnem izbruhu podobnega virusa (15).

3 PLATFORME ZA IZDELAVO CEPIVA PROTI SARS-COV-2

Potreba po takojšnjem ukrepanju in hitrem razvoju cepiv je povzročila pojav novih raznovrstnih platform za cepiva proti SARS-CoV-2 (6) ob sicer splošno uveljavljenih strategijah cepiv na osnovi oslabiljenega ali inaktiviranega virusa in virusnih komponent. Njihova potencialna prednost je predvsem prilagodljivost, saj (vsaj teoretično) omogočajo hitro spremembo imunogena v primeru mutacije vi-

Preglednica 1: Pregled platform in tehnologij za razvoj cepiv proti virusu SARS-CoV-2. Z odebeljeno pisavo so označeni projekti, ki so že vstopili v klinično fazo vrednotenja (maj 2020; povzeto po (9, 13, 14)).

Table 1: Overview of platforms and technologies for SARS-CoV-2 vaccine development. Projects which have already entered the clinical phase of development are marked in bold (May 2020; adapted from (9, 13, 14)).

Platforma	Imunogen	Že obstaja odobreno cepivo in tehnologija za proizvodnjo cepiva?	Prednosti	Slabosti	Razvijalec
Rekombinantna proteinska cepiva, komponentna cepiva	protein S	bakulovirusni sistem (HPV, virus influence), kvasovke (HBV, HPV)	Ni rokovanja z infektivnimi virusi, adjuvansi okrepijo imunski odziv.	Omejena proizvodna kapaciteta. Potrditi je potrebno ustreznost antigena oz. njegovih epitopov.	Clover Biopharmaceuticals/ CEPI , University of Queensland CEPI, GSK, Novavax/CEPI , Baylor College of Medicine, Sanofi/GSK
Živa atenuirana cepiva	virion	da	Ustaljena proizvodnja, uporabili bi lahko infrastrukturo, ki je že postavljena. Veliko registriranih cepiv.	Potrebna je proizvodnja velike količine oslabiljenega virusa, kar je dolgotrajno, saj ima virus velik genom. Potrebno veliko testiranje za določitev varnosti cepiva. Možen povratek virulence. Ni primerno za imunske oslabiljene posameznike.	Codagenix



Inaktivirana cepiva	virion	da	Ustaljena proizvodnja, uporabili bi lahko infrastrukturo, ki je že postavljena. Veliko registriranih cepiv. Tehnologijo so že uporabili za razvoj cepiva proti virusu SARS-CoV-1. Adjuvansi okrepijo imunski odziv.	Potrebna je proizvodnja velike količine infektivnega virusa, kar je dolgotrajno, saj ima virus velik genom. Potrebno bo preveriti integriteto antigena, ali povzroči dovolj močan imunski odziv.	Sinovac Biotech
Vektorska cepiva	protein S	Da, vendar le nedavno za virus ebola.	Dobri predklinični rezultati. Dober imunski odziv.	Možnost predhodne senzitivacije s sorodnim virusom, kar je vzrok nizke učinkovitost cepiva.	Johnson&Johnson, Vaxart, Geovax, University of Oxford, CanSino Biologicals , University of Hong Kong, Shenzhen Geno-Immune Medical Institute (2 cepivi)
Cepiva na osnovi DNA	protein S	ne	Ni rokovanja z infektivnimi virusi. Cepiva enostavno, poceni in hitro lahko pripravimo tudi za množično proizvodnjo. Obstojna so pri višji temperaturi. Izzovejo humoralni in celični imunski odziv.	Poseben dostavni sistem z elektroporacijo. Še neveljavljena platforma. Lahko pride do vključitve DNA v gostiteljev genom. Imunski odziv je slabši v primerjavi z živim virusom.	Inovio Pharmaceuticals/ CEPI , Applied DNA Sciences
Cepiva na osnovi RNA	protein S	ne	Ni rokovanja z infektivnimi virusi. Cepiva so imunogena in možna je hitra proizvodnja. Ne pride do vključitve v gostiteljev genom.	Reaktogenost. Še neveljavljena platforma.	Moderna/NIAID/ CEPI, BioNTech SE/Pfizer , CureVac/CEPI

rusa. Uporaba novih platform pa narekuje tudi večjo previdnost in skrbnost pri presoji učinkovitosti, varnosti cepiva in prisotnosti neželenih učinkov. Cepiva proti SARS-CoV-2 v razvoju razdelimo na rekombinantna proteinska cepiva, oslABLJena cepiva, inaktivirana cepiva ter novejš

oblike, kot so vektorska cepiva ter cepiva na osnovi DNA in RNA (preglednica 1). Ker se seznam cepiv, ki so vstopila v klinično fazo razvoja hitro spreminja, za osvežen seznam glejte spletni strani ClinicalTrials.gov (9) in WHO (16).

3.1 REKOMBINANTNA PROTEINSKA CEPIVA

Pri rekombinantnih proteinskih cepivih kot imunogen uporabimo posamezen virusni protein, ki ga pripravimo z uporabo tehnologij rekombinantne DNA (slika 1E). Genski zapis za virusni antigen vstavimo v izbrani ekspresijski vektor, ki služi za vnos DNA v ekspresijski sistem. Rekombinantna proteinska cepiva proizvajamo v sesalskih ali insektnih celičnih kulturah (z bakulovirusnimi vektorji) ter v kvasovkah (preglednica 1). Ker pri rekombinantnih proteinskih cepivih za imunizacijo uporabimo dobro očiščen antigen, s tem znižamo neželene učinke cepiva, ki bi jih utegnili povzročiti cepljenje z živim virusom. Prednost rekombinantnih cepiv je visoka varnost cepiva, saj se izognemo rokovanju z visokoinfektivnim virusom, hkrati pa cepivo povzroči specifičen imunski odziv proti virusnemu proteinu. Rekombinantna proteinska cepiva lahko tudi okrepijo humoralni imunski odziv z vključitvijo limfocitov T pomagalk in povzročijo nastanek visokih titrov nevtralizirajočih protiteles (13). Rekombinantna proteinska cepiva proti SARS-CoV-2 vsebujejo protein S ali njegove posamezne domene in predvidoma izzovejo tvorbo protiteles, ki se ob okužbi vežejo na protein S in preprečijo vezavo na gostiteljev receptor ACE2. Proteinska cepiva proti SARS-CoV-2 razvijajo v podjetju Clover Biopharmaceuticals, kjer so za antigen uporabili trimerni protein S, izražen v sesalskih celicah (tehnologija Trimer-Tag®) (17). Povezali so se tudi s podjetjem GSK, ki bo poskrbelo za dodatek adjuvansa cepivu in s tem močnejši imunski odziv na cepivo. Predklinični rezultati so obetavni, zato je CEPI podprl začetek klinične raziskave v Avstraliji (8). Rekombinantno proteinsko cepivo razvijajo tudi na Univerzi v Queenslandu. Uporabili so poseben način stabilizacije konformacije proteina S, t. i. peptidne klešče (*molecular clamps*), s čimer omogočijo boljše prepoznavnost antigena in močnejši imunski odziv pri okužbi. Razvoj tega cepiva poteka v sodelovanju z GSK pod okriljem CEPI (8). Podjetje Novavax proizvaja nanodelce, ki vsebujejo dele rekombinantnega proteina S, tehnologijo pa so že uporabili pri virusu SARS-CoV-1 (18). Ker so predklinične raziskave kandidatnega cepiva NVX-CoV2373 (Novavax) pokazale, da cepivo povzroči visoke titre nevtralizirajočih protiteles, bo v kratkem vstopilo v klinično vrednotenje (9). Obetavno je tudi proteinsko cepivo, ki za antigen uporabi domeno proteina S, s katero se le-ta veže na receptor (RBD, *receptor binding domain*), kar razvijajo na ameriški univerzi Baylor College of Medicine (15, 19). Moči v bitki za novo cepivo sta združila tudi Sanofi in GSK (20). Sanofi razvija rekombinantni protein S z uporabo usta-

ljenega bakulovirusnega sistema, ki ga sicer uporabljajo za pripravo cepiva za sezonsko gripo. GSK pa bo rekombinantnemu cepivu dodal adjuvansa za ojačanje imunskega odziva.

3.2 ATENUIRANA CEPIVA – OSLABLJEN ŽIVI VIRUS

Atenuirana ali oslABLJena cepiva vsebujejo oslABLjen živi virus, ki je obdelan tako, da izgubi virulentnost, vendar se še vedno lahko namnožuje v gostitelju (slika 1A) in spodbudi močan in dolgotrajen imunski odziv (21). Gre za klasična cepiva z ustaljeno množično proizvodnjo registriranih cepiv, kar je velika prednost. Atenuirana cepiva so npr. cepiva proti ošpicam, mumpsu in rdečkam. Slabost atenuiranih cepiv proti SARS-Cov-2 je, da je potrebno pripraviti velike količine virusa in izvesti zelo veliko testiranje za zagotovitev varnosti cepiva. Podjetje Codagenix skupaj z indijskim inštitutom Serum Institute of India razvija atenuirano cepivo proti SARS-CoV-2 s spreminjanjem nukleotidnega zaporedja (16). Z bioinformatičnimi metodami bodo izbrali nekaj kandidatnih nukleotidnih zaporedij virusa, podjetje Serum Institute of India pa bo viruse z mutiranim nukleotidnim zaporedjem pripravilo. Čeprav bi to cepivo lahko relativno hitro proizvedli, bo potrebno obsežno vrednotenje njegove varnosti.

3.3 INAKTIVIRANA CEPIVA – INAKTIVIRAN MRTVI VIRUS

Imunogen pri inaktiviranih cepivih predstavlja celoten virusni delec (virion), ki so ga predhodno inaktivirali (npr. kemično s formaldehidom) (21). Ker se virus ne more razmnoževati v organizmu (slika 1B), je pri imunizaciji običajno potrebno več odmerkov, da vzdržujemo imunost. Prednost inaktiviranih cepiv je že postavljena proizvodnja za druga registrirana cepiva. Na tržišču je veliko inaktiviranih cepiv, npr. cepivo proti poliovirusu (otroški paralizi) in hepatitisu A. Spodbudno je, da so tehnologijo že uporabili pri virusu SARS-CoV-1. Slabost inaktiviranega cepiva pa je, da je potrebno najprej pripraviti ogromne količine infektivnega virusa, kar je dolgotrajno in zahtevno (13). Poleg tega je pri uporabi inaktiviranega cepiva potrebno skrbno preveriti integriteto epitopov, varnost, toksičnost in neželene učinke. Inaktivirano cepivo proti SARS-CoV-2 (PiCoVacc) razvija kitajsko podjetje Sinovac Biotech (22). Viruse so izolirali iz 11 bolnikov iz različnih držav (pet iz Kitajske, tri iz Italije in po enega iz Španije, Velike Britanije in Švice), jih namnožili



in kemijsko inaktivirali (22). Cepivo je povzročilo nastanek protiteles, ki so nevtralizirala 10 različnih virusnih sevov, kar kaže, da bi lahko bilo uporabno za več sevov. Rezultati testiranja na živalih kažejo, da je cepivo učinkovito zaščitilo opice rezus makake pred okužbo in da ni povzročilo zapletov ali poslabšanja bolezni. Cepivo je sedaj prešlo v prvo fazo kliničnega vrednotenja na 144 prostovoljcih na Kitajskem (23).

3.4 CEPIVA NA OSNOVI DNA

Cepiva na osnovi DNA vsebujejo plazmid, ki nosi zapis za tarčni virusni protein. Takšna cepiva vnašamo neposredno v celice z elektroporacijo (slika 2), kar izzove močan imunski odziv (17, 24). Cepiva na osnovi DNA lahko vbrizgamo tudi neposredno intramuskularno ali intradermalno, vendar je učinkovitost vnosa cepiva v celice bistveno višja pri uporabi elektroporacijskih metod. Imunski odziv lahko še okrepiamo z dodatkom adjuvansov. Prednost cepiv na osnovi DNA je, da se izognemo delu z infektivnimi virusi in da cepivo lahko na relativno hiter in poceni način pripravimo v večjih količinah. Poleg tega je DNA stabilna tudi pri višjih temperaturah, tako da je cepivo lažje distribuirati. Pomanjkljivost DNA-cepiv pa je, da jih lahko dostavljamo le z uporabo posebnih aparatov za elektroporacijo. Cepivo na osnovi DNA proti SARS-CoV-2 razvijajo v kitajskem podjetju Inovio Pharmaceuticals. Cepivo INO-4800 vsebuje plazmidno DNA z vključenim zapisom za protein S (9, 25). Razvoj tega cepiva temelji na izkušnjah pri razvoju cepiva proti MERS-CoV, ki je že vstopilo v drugo fazo kliničnega preskušanja. Razvoj cepiva poteka pod okriljem CEPI in v sodelovanju z nemškim podjetjem Richter-Helm BioLogics GmbH. Prednost tega cepiva je intradermalen vnos, ki povzroči dovolj visok titer nevtralizirajočih protiteles.

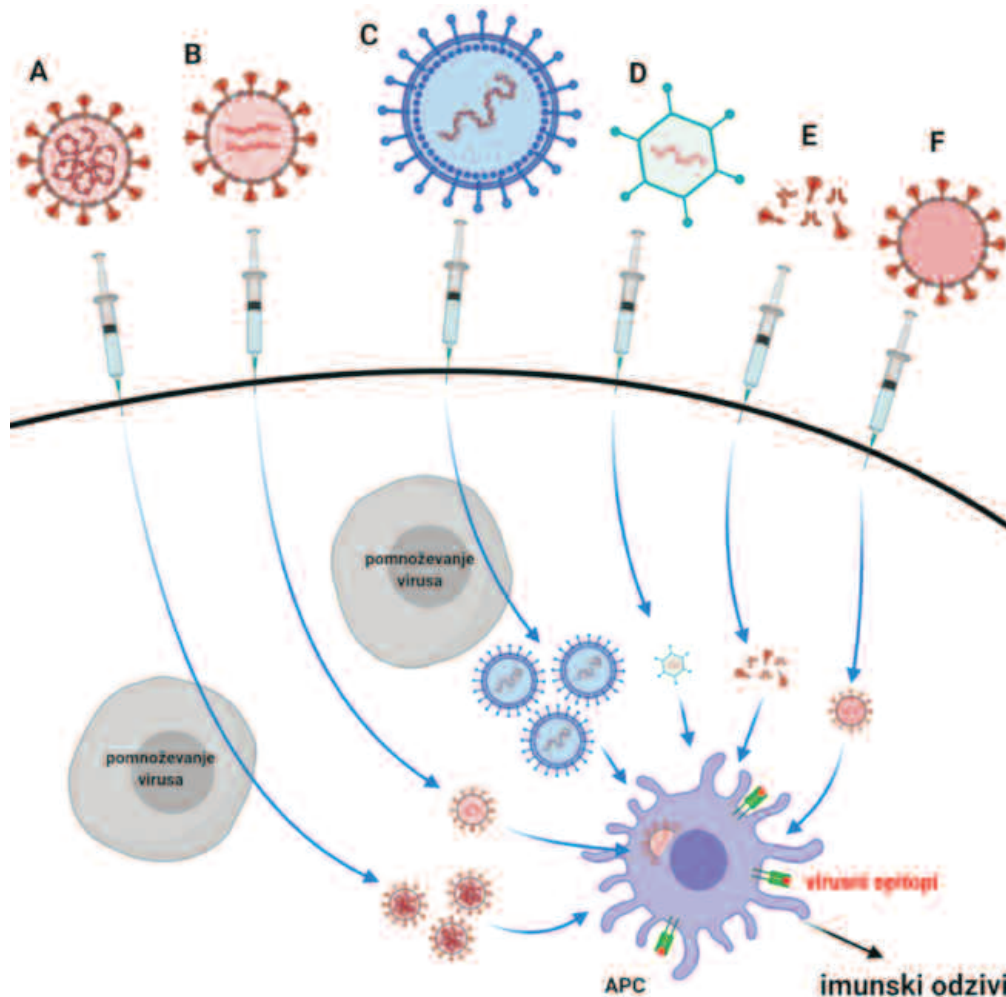
3.5 CEPIVA NA OSNOVI RNA

Cepiva na osnovi RNA vsebujejo informacijsko RNA (mRNA), ki nosi zapis za tarčni virusni protein. mRNA je v cepivu običajno obdana z lipidnim dvoslojem, da pride do lažjega vnosa v celice (slika 2). Po cepljenju pride do prevoda mRNA v protein (imunogen), kar povzroči imunski odziv (17). Razvoj tehnologije RNA-cepiv poteka predvsem na področju zdravljenja raka in infekcijskih bolezni (26). Prednosti cepiv na osnovi RNA so, da ne more priti do vključitve vnesene informacije v genom prejemne celice, močan imunski odziv in možnost hitre proizvodnje cepiva. Cepivo na osnovi RNA lahko vsebuje mRNA za več imunogenov hkrati, kar pomeni, da bi lahko bilo uporabno za

več virusnih sevov (17). RNA-cepivo mRNA-1273 je prvo cepivo proti SARS-CoV-2, ki je vstopilo v klinično vrednotenje. Cepivo vsebuje mRNA proteina S in je vgrajeno v lipidne nanodelce. Cepivo je razvilo ameriško podjetje Moderna v sodelovanju z inštitutom NIAD (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), razvoj pa poteka v okviru CEPI (9, 27). Klinično vrednotenje so začeli tudi v nemškem podjetju BioNTech, kjer skupaj s farmacevtsko družbo Pfizer razvijajo kandidatno mRNA-cepivo BNT162. Ker so molekule RNA nestabilne, povečajo njihovo stabilnost z različnimi modifikacijami (dodatek 5'-kape in 3'-poli(A) repa, 5'- in 3'-neprevedljivih regij in vgradnja modificiranih nukleotidov (28)). Obetavne rezultate z razvojem RNA-cepiva ima tudi nemško podjetje CureVac, ki naj bi vzporedno z začetkom kliničnih vrednotenij postavljajo že množično proizvodnjo cepiva (29).

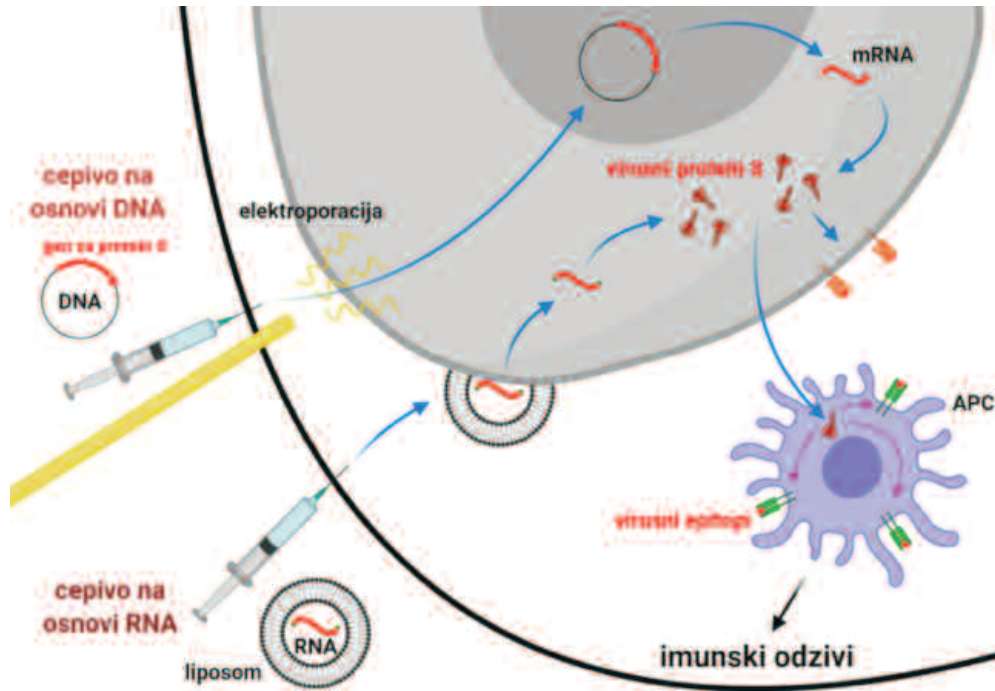
3.6 VEKTORSKA CEPIVA

Pri vektorskih cepivih antigen predstavlja virusni protein, katerega genski zapis je vstavljen v nepovezan virusni vektor (30). Virusni vektorji so gensko spremenjeni tako, da omogočajo vnos in izražanje virusnega imunogena v celicah cepljenega posameznika. Vektorji se lahko v organizmu namnožujejo, npr. oslabljen virus ošpic (slika 1C), ali pa so replikacijsko onesposobljeni, npr. adenovirusni vektorji (slika 1D). Adenovirusnih vektorjev še niso uporabili pri razvoju cepiv, jih pa sicer uporabljajo pri genskem zdravljenju. Prvo registrirano vektorsko cepivo je bilo cepivo proti virusu ebola, imenovano Ervebo. Kot vektor so uporabili oslabljen virus vezikularnega stomatitisa (VSV), ki vsebuje zapis za protein virusa ebola Zaire (31). Prednost vektorskih cepiv so dobri rezultati predkliničnih in kliničnih vrednotenij pri različnih virusih, med njimi tudi pri MERS-CoV. Pomanjkljivo pri vektorskih cepivih pa je, da je pri predhodni senzitivaciji s sorodnim virusom divjega tipa cepivo neučinkovito (13). Kitajsko podjetje CanSino Biological Inc. je skupaj s pekinškim inštitutom Beijing Institute of Biotechnology pripravilo kandidatno cepivo na osnovi adenovirusnega vektorja Ad5-nCoV, ki je kot eno prvih cepiv proti SARS-CoV-2 vstopilo v klinično vrednotenje (9). V prvi fazi kliničnega preskušanja je tudi že adenovirusno kandidatno cepivo, ki so ga razvili na Univerzi v Oxfordu (Jenner Institute) (ChAdOx1). Že v prvi fazi bodo s tem cepivom cepili več kot 1000 prostovoljcev (32). Vstop v klinično raziskavo so omogočili tudi dobri rezultati predklinične raziskave na opicah rezus makakih, izvedene na ameriškem inštitutu Rocky Mountain Laboratories (30). Farmacevtska družba Johnson&Johnson razvija cepivo na osnovi adenovirusnega



Slika 1: Pregled platform potencialnih cepiv proti novemu koronavirusu. A) Atenuirano (oslabljeno) cepivo: virus SARS-CoV-2 nosi mutacije, zaradi katerih se v vakciniranem posamezniku slabše pomnožuje in ne izzove bolezni. B) Inaktivirano cepivo: virus SARS-CoV-2 ni sposoben pomnoževanja, saj ga inaktiviramo s kemijskimi ali fizikalnimi dejavniki, ohrani pa vse svoje antigene. C) Replikativen virusni vektor: oslabljen rekombinantni virusni vektor drugačnega tipa (npr. virus ošpic) izkoristimo za vnos genov, ki kodirajo antigene virusa SARS-CoV-2. D) Nereplikativen virusni vektor: rekombinantni virusni vektor drugačnega tipa (npr. adenovirus) izkoristimo za vnos genov, ki kodirajo antigene virusa SARS-CoV-2. E) Rekombinantne proteinske podenote strukturnih proteinov SARS-CoV-2 (npr. proteinov S in M). F) Virusu podobni delci: virusna ovojnica SARS-CoV-2 brez genskega materiala. Antigen predstavitvene celice (APC) virusne delce ali njihove proteinske komponente sprejmejo s fagocitozo in posamezne virusne antigenske determinante (epitope) predstavijo na svoji površini, vezane na poglobitni histokompatibilnostni kompleks tipa II (zeleno), T-celicam pomagalkam (ni prikazano), ki uravnavajo humoralno in celično komponento pridobljenega imunskega odziva. Prirejeno po (30). Slika je izrisana s programom BioRender.

Figure 1: Depiction of platform for new coronavirus vaccine in development. A) Attenuated vaccine: SARS-CoV-2 virus harbours mutations which hamper its replication, thus making it less likely to cause disease. B) Inactivated vaccine: SARS-CoV-2 virus is incapable of replication due to chemical or physical treatment. It does, however, retain its antigens. C) Replicating viral vector: an attenuated unrelated recombinant viral vector (such as weakened measles) is used to introduce genes encoding SARS-CoV-2 viral antigens. D) Non-replicating viral vector: recombinant unrelated virus (such as adenovirus) is used to transduce cells with SARS-CoV-2 viral antigens. E) Recombinant SARS-CoV-2 viral structural protein subunits (e.g., spike (S) and membrane (M) proteins). F) Virus-like particles: empty SARS-CoV-2 shell (i.e. containing no genetic material). Antigen-presenting cells (APC) engulf viral particles or their subunits by fagocytosis and process the antigens to display individual antigenic determinants (epitopes) bound to type II major histocompatibility complex (in green) on the surface. This leads to activation of helper T cells (not shown), which regulate both humoral and cell adaptive immune responses. Adapted from (30). Figure was drawn with BioRender.



Slika 2: Cepiva proti virusu SARS-CoV-2 na osnovi nukleinskih kislin. Strategija temelji na vnosu genske informacije za posamezne proteine virusa SARS-CoV-2 v celice vakciniranega posameznika. Golo DNA vnašamo v celice z elektroporacijo, cepiva na osnovi RNA pa praviloma vgradimo v liposome, ki se zlijejo s celično membrano. Celice na osnovi vstavljenih genov izdelajo virusne proteine in jih izločijo, nakar jih sprejmejo in procesirajo antigen predstavitvene celice (APC). Hkrati celice epitope virusnih proteinov predstavljajo na svoji površini, vezane na poglobilni histokompatibilnostni kompleks tipa I (oranžno), s čimer se v prepoznavanje antigena vključijo tudi citotoksični limfociti T, ki so nosilci celične imunosti (ni prikazano). Prirejeno po (30). Slika je izrisana s programom BioRender.

Figure 2: Nucleic acid-based SARS-CoV-2 vaccines. Genetic information encoding individual viral proteins is introduced directly into cells of vaccinated individuals. Electroporation is used to increase uptake of naked DNA, while RNA is typically packaged into liposomes which fuse with plasma membrane. Using the genetic information, transfected cells produce and secrete viral proteins. These, in turn, are processed by antigen-presenting cells (APC). Concomitantly, the cells display processed viral epitopes on their surface bound to type I major histocompatibility complex (in orange), engaging cytotoxic T cells, effectors of cell immunity, into antigen recognition (not shown). Adapted from (30). Figure was drawn with BioRender.

vektorskega sistema AdVac® (Janssen) z uporabo celične linije PER.C6® (9). Slabost adenovirusnega vektorskega sistema je, da nobeno cepivo, ki temelji na tej tehnologiji, še nima dovoljenja za promet. Raziskovalci iz Univerze v Hong Kongu razvijajo kandidatno cepivo na osnovi virusa influence, ki izraža tudi podenoto RBP proteina S (16). Kitajsko podjetje Shenzhen Geno-Immune Medical Institute je razvilo kar dve kandidatni cepivi. Cepivi LV-SMENP-DC in Covid-19 aAPC temeljita na lentivirusnem vektorju, ki ima vključen zapis za podenote več virusnih proteinov (tako imenovani minigeni), nosi pa tudi imunomodulatorne gene, ki aktivirajo antigen predstavitvene celice. Ti kandidatni cepivi nista profilaktični – v klinični raziskavi (NCT04276896 in NCT04299724 (9)) vključujejo bolnike s covid-19. Tem odvzamejo antigen predstavitvene celice, ki jih *ex vivo* transducirajo z lentivirusnim vektorjem in vrnejo bolniku s

subkutano injekcijo. Gre torej za obliko genskega oz. celičnega zdravljenja. Pri LV-SMENP-DC zdravljenje spremlja še infuzija aktiviranih antigen-specifičnih citotoksičnih limfocitov T.

4 IZZIVI PRI RAZVOJU CEPIV

Razvoj cepiva je kot tek na dolge proge, a časa v trenutnih razmerah pandemije covid-19, ki hromi naša življenja, nimamo na pretek. Podobno kot pri razvoju drugih zdravil tudi varnost in učinkovitost cepiv vrednotimo v znanstveno osnovanih (pred)kliničnih raziskavah. Ena osrednjih težav,

ki spremlja razvoj cepiva, je ocenjevanje njegove učinkovitosti. Trenutno interakcije med virusom SARS-CoV-2 in imunskim sistemom človeka relativno slabo poznamo; ni še jasno, ali naravno prebolela okužba izzove (dolgotrajno) imunost. V predklinični fazi razvoja si pogosto pomagamo z živalskimi modeli bolezni, a ti za virus SARS-CoV-2 še niso vzpostavljeni in validirani (virus se v običajnem poskusnem modelu – miših, tudi transgenih, ki izražajo človeški ACE2 (33) – namreč slabo pomnožuje; alternativo predstavljajo primati). Poskusne živali po cepljenju izzovemo z virusom in opazujemo, ali jih cepivo zaščiti pred boleznijo. Tudi če živali niso dober gostitelj virusa, lahko vrednotimo morebitno nevtralizacijsko sposobnost protiteles, ki se pojavijo v njihovem serumu po imunizaciji s cepivom, v poskusih s človeškimi celicami, ki jih izzovemo z virusom *in vitro*. Indukcija protiteles pri cepljenju namreč še ne zagotavlja zaščite pred virusno okužbo. Izkušnje s predkliničnim razvojem cepiv proti sorodnemu virusu SARS-CoV-1 (na osnovi oslabljenih ali inaktiviranih virusov, vektorskih vakcin in rekombinantnega proteina S) so sicer ohrabrujoče, saj so praviloma nudila zaščito poskusnim živalim pred razvojem infekcijske bolezni ali pa je ta potekala v blažji obliki (34). Vendar obstajajo tudi poročila o nepričakovanih zapletih po cepljenju, kot sta poškodbi pljučnega in jetrnega tkiva. Wang in sod. (35) so ugotovili, da določeni epitopi (kratki peptidni segmenti iz strukture glikoproteina S), ki so jih uporabili kot cepivo proti SARS-CoV-1, v opicah rezus makakih celo okrepijo replikacijo virusov po naknadni okužbi, kar privede do slabše prognoze. Ta pojav je posledica indukcije nenevtralizirajočih protiteles, ki se vežejo na virus in mu omogočijo vdor v številne celice po alternativni poti, tj. neodvisno od primarnega celičnega receptorja (ACE2) – prek endocitoze, posredovane z receptorji za regijo Fc imunoglobulinov (FcγR). Podobne mehanizme so dokumentirali pri uporabi cepiv proti virusu denga ter pri drugih naravnih okužbah s sorodnim sevom tega virusa (in v raziskavah *in vitro* s HIV, ebola in koronavirusi) (36). Izjemno pomembno je, da takšne nepredvidljive neželene učinke cepiv zaznamo že v fazi predkliničnega razvoja in številni ugledni imunologi svarijo pred prehitrim vstopom potencialnih cepiv proti SARS-CoV-2 v fazo kliničnega vrednotenja in sproščanju na tržišče (37). Predklinične raziskave v razvoju cepiv, sploh proti slabo poznanim povzročiteljem bolezni, so namreč namenjene načrtovanju optimalne platforme cepiva (upoštevajoč interakcije med gostiteljem in patogenom, režim cepljenja (odmerek, odmerni interval, način vnosa v organizem) in zaščitne imunske mehanizme) ter identifikaciji optimalne kombinacije antigena in adjuvanta za doseg želenega imunskega odziva pred preskušanjem cepiva v

kliničnih raziskavah (38). Vrednotenje cepiv poteka v treh stopnjah. Prva, opravljena na majhni homogeni skupini prostovoljcev, je osredotočena izključno na varnost cepiva. Druga proučuje imunogenost in skuša določiti optimalni odmerek, le redko zajema tudi raziskavo učinkovitosti. Šele v tretji, v katero je vključenih nekaj tisoč prostovoljcev, proučujemo, ali s postavljenim režimom cepljenja dosežemo želeno zaščito pred patogenom ob sprejemljivem tveganju za morebitne neželene učinke. Posamezne stopnje kliničnih raziskav v idealnih razmerah obsegajo večletno spremljanje vakciniranih. Žal je le majhno število cepiv proti virusoma SARS-CoV-1 in MERS-CoV doseglo prvo fazo kliničnega preskušanja (njuno širjenje so uspeli še pravočasno zamejiti, s čimer je presahnil tudi interes po nadaljevanju razvoja vakcin), zato so izkušnje s cepivi proti koronavirusom skrajno omejene. Če poznamo učinkovito zdravilo za infekcijsko bolezen, je načeloma mogoče zdrave prostovoljce po cepljenju načrtno izpostaviti patogenu, da preverimo, ali je cepivo učinkovito. Takšna strategija bi sicer močno pospešila razvoj cepiv proti SARS-CoV-2, a je zaradi slabega poznavanja (imuno)patoloških procesov covid-19 izjemno tvegana in s tem etično sporna, četudi bi v raziskavo vključili le mlajše odrasle prostovoljce, ki bolezen praviloma prebolijo v blažji obliki, in uporabili oslabljen virus (39). Ne nazadnje bo verjetno množično cepljenje proti SARS-CoV-2 tudi po razvoju uspešnega cepiva vsaj na začetku omejevala sposobnost proizvesti zadostno količino odmerkov. Nekatera atenuirana in inaktivirana virusna cepiva (npr. sezonsko cepivo proti virusu influence) lahko stroškovno učinkovito proizvajamo s pomnoževanjem v oplojenih kokošjih jajcih, kar pa za koronavirus ni mogoče in jih bo potrebno namnožiti v sesalskih celičnih kulturah. Določene obetavne platforme potencialnih cepiv proti SARS-CoV-2 (npr. cepiva na osnovi mRNA) so popolnoma nove (do zdaj še neuveljavljene) in proizvodna infrastruktura zanje sploh še ne obstaja. Z vidika proizvodnje so verjetno najbolj dosegljiva cepiva na osnovi rekombinantnih virusovih strukturnih proteinov, a so ta v splošnem sposobna inducirati le humoralno imunost, ne pa tudi celične, ki je ključna za popolno odstranitev virusne okužbe.

5 SKLEP

Čeprav je zanimanje za čim hitrejši razvoj cepiva veliko, se je potrebno zavedati in upoštevati pomen vseh stopenj



razvoja, ki vodijo do varnega, kakovostnega in učinkovitega cepiva. Kljub izjemno pospešenim predkliničnim raziskavam pri iskanju cepiva za covid-19 znanstveniki opozarjajo pred prehitrim vstopom potencialnih cepiv proti SARS-CoV-2 v fazo kliničnega vrednotenja in pred prehitrim sproščanjem na tržišče, saj so vse predstopnje v razvoju izjemno pomembne za prepoznavanje morebitnih nepredvidljivih neželenih učinkov. Splošno uveljavljene platforme, kot so atenuirana in inaktivirana cepiva, zagotavljajo ustaljeno množično proizvodnjo in izkoriščajo vzpostavljeno infrastrukturo. Prednost preostalih platform je, da patogenega virusa ne potrebujemo. Pri rekombinantnih proteinskih cepivih so bistvenega pomena učinkovit ekspresijski sistem za izražanje proteina in adjuvansi za učinkovit imunski odziv. Novejše platforme, kot so cepiva na osnovi DNA in RNA, prinašajo pomembne prednosti, a tudi izzive, ki so povezani predvsem z načinom dostave in varnostjo. V razvoju so tudi vektorska cepiva, ki učinkovito dostavijo virusne gene, vendar lahko že sami sprožajo imunski odziv ali pa so neučinkoviti zaradi predhodne imunosti proti vektorskemu virusu. Ne glede na uporabljeno platformo nas do cilja čaka še veliko korakov in izzivov, ki jih bo potrebno rešiti.

6 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo dr. Ivi Hafner Bratkovič za pomoč pri pripravi slik.

7 LITERATURA

- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al. *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.* *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.
- Johns Hopkins University Coronavirus Resource Center. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG et al. *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.* *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
- Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. *Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed.* *N Engl J Med.* 2020;382:1969-73.
- Dhama K, Sharun K, Tiwari R, Dadar M, Malik YS, Singh KP et al. *COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics.* *Hum Vaccin Immunother.* 2020;1-7.
- Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gomez Roman R, Tollefsen S, Saville M et al. *The COVID-19 vaccine development landscape.* *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):305-6.
- Yamey G, Schaferhoff M, Hatchett R, Pate M, Zhao F, McDade KK. *Ensuring global access to COVID-19 vaccines.* *Lancet.* 2020;395(10234):1405-6.
- The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, COVID-19. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <https://cepi.net/covid-19/>
- NIH US National Library of Medicine ClinicalTrials.gov [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <https://clinicaltrials.gov/>
- Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. *The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention.* *Nat Rev Immunol.* 2020;20:363-74.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S et al. *Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor.* *Nature.* 2020;581(7807):215-20.
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H et al. *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2.* *Nature.* 2020;581(7807):221-4.
- Amanat F, Krammer F. *SARS-CoV-2 vaccines: status report.* *Immunity.* 2020;52(4):583-9.
- Promptchara E, Ketloy C, Palaga T. *Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic.* *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020;38(1):1-9.
- Chen WH, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME. *The SARS-CoV-2 vaccine pipeline: an overview.* *Curr Trop Med Rep.* 2020;1-4.
- WHO. *Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines.* 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- Ahn DG, Shin HJ, Kim MH, Lee S, Kim HS, Myoung J et al. *Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19).* *J Microbiol Biotechnol.* 2020;30(3):313-24.
- Coleman CM, Liu YV, Mu H, Taylor JK, Massare M, Flyer DC et al. *Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice.* *Vaccine.* 2014;32(26):3169-74.
- Jiang S, Bottazzi ME, Du L, Lustigman S, Tseng CT, Curti E et al. *Roadmap to developing a recombinant coronavirus S protein receptor-binding domain vaccine for severe acute respiratory syndrome.* *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(12):1405-13.
- Sanofi and GSK to join forces in unprecedented vaccine collaboration to fight COVID-19. 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2020/2020-04-14-13-00-00>
- Kraigher A, Ihan A, Avčin T. *Cepljenje in cepiva - dobre prakse varnega cepjenja.* . 2011: Sekcija za preventivno medicino SZD, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe, SZD Inštitut za varovanje zdravja RS.
- Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M et al. *Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2.* *Science* 2020; v tisku.
- Cohen J. *COVID-19 shot protects monkeys.* *Science.* 2020;368(6490):456-7.
- Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K et al. *A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice.* *Nature.* 2004;428(6982):561-4.
- INOVI. *INOVI expands manufacturing of COVID-19 DNA vaccine INO-4800 with new funding from CEPI.* 2020 [cited 2020 May 19]; <http://ir.inovio.com/news-releases/news->

- releases-details/2020/INOVI0-Expands-Manufacturing-of-COVID-19-DNA-Vaccine-INO-4800-With-New-Funding-from-C-EPI/default.aspx
26. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-79.
 27. Moderna. Moderna's pipeline. 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.modernatx.com/pipeline>
 28. Lundstrom K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future Sci OA.* 2018;4(5):FSO300.
 29. CureVac. CureVac's optimized mRNA platform provides positive pre-clinical results at low dose for coronavirus vaccine candidate. 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.curevac.com/news/curevac-s-optimized-mrna-platform-provides-positive-pre-clinical-results-at-low-dose-for-coronavirus-vaccine-candidate>
 30. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature.* 2020;580(7805):576-7.
 31. EMA. Ervebo (cepivo proti virusu Ebola Zaire [rVSVΔG-ZEBOVGP, živo]). 2020 [cited 2020 May 19]; https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/ervebo-epar-medicine-overview_sl.pdf
 32. University of Oxford. Oxford COVID-19 vaccine begins human trial stage. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <http://www.ox.ac.uk/news/2020-04-23-oxford-covid-19-vaccine-begins-human-trial-stage>
 33. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020; v tisku.
 34. Roper RL, Rehm KE. SARS vaccines: where are we? *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(7):887-98.
 35. Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T et al. Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect Dis.* 2016;2(5):361-76.
 36. Negro F. Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis? *Swiss Med Wkly.* 2020;150 w20249.
 37. Jiang S. Don't rush to deploy COVID-19 vaccines and drugs without sufficient safety guarantees. *Nature.* 2020;579(7799):321.
 38. Stern PL. Key steps in vaccine development. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020; v tisku.
 39. Cohen J. Infect volunteers to speed a coronavirus vaccine? *Science.* 2020;368(6486):16.



NAPOVEDNIK KONGRESA ŠSSFD

Študentska sekcija Slovenskega farmacevtskega društva bo v letu 2020 prvič organizirala večdnevni dogodek, kongres ŠSSFD, na katerem se bosta prepletala bogat strokovni ter družabni program in bo na enem mestu združeval študente farmacije iz Slovenije ter strokovnjake z različnih področij. Naš cilj je spodbujati razpravo med študenti, jih izobraževati o različnih tematikah naše stroke in olajšati pretok znanja ter izkušenj med študentskimi organizacijami in ostalimi posamezniki.

Študentska sekcija Slovenskega farmacevtskega društva obstaja že od leta 1976 in se že od samega začetka trudi, da bi obogatila študijska leta študentov na Fakulteti za farmacijo ter dodatno okrepila njihovo znanje preko organizacije projektov, ki se jih udeležujejo tudi študentje iz tujine. V zadnjih nekaj letih se jih je zvrstilo kar nekaj, ki so ime ŠSSFD ponesli v svet ter dodatno pripomogli k temu, da smo slovenski študentje farmacije v tujini vedno bolj cenjeni. Leta 2010 smo tako organizirali Svetovni kongres v okviru Mednarodne študentske farmacevtske federacije (IPSF). Leta 2017 smo organizirali 40. Letni kongres EPSA, lansko leto pa smo v Portorožu organizirali 21. Poletno univerzo EPSA. Vsi ti kongresi so bili izvedeni v sodelovanju z evropskimi oziroma svetovnimi zvezami, kjer je prisotnih več društev iz tujih držav. Kongres ŠSSFD, ki se bo odvijal letos, uresničuje našo dolgoletno željo: organizirati slovenski kongres za študente Fakultete za farmacijo.

Kongres ŠSSFD bo potekal v Ljubljani od 15. do 17. oktobra 2020 na tematiko »*The power of personalised medicine – Moč personalizirane medicine*«. Na dogodku se bomo poučili o različnih vidikih personalizirane medicine, se spoznali z realnim stanjem in si ogledali, kakšni so obeti za prihodnost. Dogodka se bo predvidoma udeležilo od 150 do 300 študentov in strokovnjakov iz Slovenije ter tujine. Kongres predstavlja strokovno in sproščeno okolje, v katerem študenti spoznavajo novosti, ki jih prinašajo nova odkritja na področju farmacevtskih znanosti, ter se učijo veščin, ki jim bodo pomagale pri nadaljnji karieri.

V četrtek, 15. oktobra 2020, bomo kongres začeli z otvoritveno slovesnostjo, kjer se bodo predstavile vse štiri entitete obštudijskega dogajanja na Fakulteti za farmacijo, ki delujejo ločeno, a se zavzemajo za tesno sodelovanje in skupno izpeljevanje projektov. Tako bomo udeležencem predstavili delovanje in člane Društva študentov farmacije Slovenije (DŠFS), skupaj z že omenjeno ŠSSFD, Študentski svet Fakultete za farmacijo (ŠSFFA) in Študentsko organizacijo Fakultete za farmacijo (ŠOFFA). Vse omenjene organizacije seveda skupaj aktivno sodelujejo pri organizaciji številnih projektov (tudi ŠSSFD kongresa), kar je za nas ključnega pomena pri zagotavljanju še boljših dogodkov ter izkušenj za naše študente.

V petek, 16. oktobra 2020, bo potekal simpozij, ki ga ŠSSFD organizira že šesto leto zapored, prvič pa ga bomo letos priključili v širši okvir kongresa ŠSSFD. Na simpoziju se bo zvrstilo več polurnih predavanj na temo personalizirane medicine, nato pa bo sledila okrogla miza, kjer bodo imeli študentje možnost postaviti vprašanja za predavatelje, se aktivno vključiti v debato ter na takšen način poglobiti in razširiti svoje znanje.

V soboto, 17. oktobra 2020, bodo na Fakulteti za farmacijo delavnice, s katerimi bi radi na interaktiven način približali raznovrstne tematike udeležencem z različnimi interesi in ozadji. Preko treningov mehkih veščin jim želimo približati teme, kot so mreženje, komunikacija, skupinska dinamika in javno nastopanje, ter jim pomagati pri razvoju osebnih kompetenc, ki jim bodo koristile v osebnem in profesionalnem okolju. Skozi javno kampanjo, ki bo potekala med kongresom, bi radi dosegli širšo javnost. Z udeleženci se bomo odpravili v center Ljubljane, kjer bomo na naši stojnico vabili mimoidoče in jih ozaveščali o aktualnih problematikah na interaktiven način. Organizirati želimo tudi sejem poklicev, kjer bi udeležencem ponudili možnost interakcije s slovenskimi podjetji in jim olajšali iskanje bodoče zaposlitve. Vsako podjetje bo dobilo svoje mesto za stojnico, kjer bo imelo možnost predstavitve svojega delovanja in izdelkov na splošno, študentje pa bodo lahko prosto hodili od podjetja do podjetja, ki jim bodo na voljo za vprašanja in pregled življenjepisov.

Kongres ŠSSFD je prvi tovrstni dogodek v zgodovini našega delovanja in že komaj čakamo na njegov začetek. Ob tej priložnosti bi se radi zahvalili še Fakulteti za farmacijo, ki nas vedno znova podpira pri našem delovanju in nam pomaga pri nemotenem izvajanju projektov. Hvaležni smo tudi vsem, ki so se že odločili podpreti naš kongres na različne načine, ostali, ki pa bi to še radi storili, pa nas lahko kadarkoli kontaktirate na vodja@sssfd-kongres.si (Nejc Ajlec, vodja kongresa ŠSSFD). Veselimo se sodelovanja z vami!





1. ŠSSFD KONGRES

15. - 17. OKTOBER 2020
LJUBLJANA

MOČ PERSONALIZIRANE
MEDICINE



ŠSSFD
ŠTUDENTSKA SEKCIJA SLOVENSKEGA
FARMADEVTSKEGA DRUŠTVA



Gorenjska podružnica SFD vabi na

20. JUBILEJNI POHOD DO ROBLEKOVEGA DOMA NA BEGUNJŠČICI



KDAJ? v soboto, 19. 9. 2020

KAJ? Planinski pohod do Roblekovega doma na Begunjščici (1657 n.m.v.)

KJE? Zbor udeležencev pri Domu v Dragi (Begunje na Gorenjskem), smer pohoda preko planine Prevala in čez Rožo do Roblekovega doma.

KDO? Pohoda se lahko udeležijo VSI ČLANI SFD*.

*Pohod je primeren za vse tipe pohodnikov in ljubitelje gora. Za varnost bo poskrbljeno s strani vodnikov PD Radovljica.





Pot do zdravja

Naš cilj so zdravi in srečni ljudje. Smo veletrgovnica za prodajo zdravil z najširšo ponudbo izdelkov za humano in veterinarsko medicino v Sloveniji. Odlikujejo nas hitrost, varnost in zanesljivost. Svoje delo opravljamo srčno in predano. Prav zaradi tega nam zaupajo številne lekarne in bolnišnice ter druge zdravstvene in veterinarske ustanove.

Zavedamo se, da nam prihodnost ponuja nešteto izzivov. Premagamo jih lahko z nenehnim izpopolnjevanjem. S kakovostnimi storitvami in s široko izbiro zdravil ter drugih izdelkov bomo zaupanje svojih kupcev opravičevali tudi v prihodnje!

01 470 98 00 | www.kemofarmacija.si

