

GIMNAZIJA FRANCA MIKLOŠIČA LJUTOMER
PREŠERNOVA ULICA 34
9240 LJUTOMER



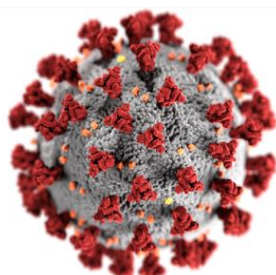
Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

RAZISKOVALNA NALOGA

Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA



AVTORICE:

Zara Bertalanič*, Lara Pučko*, Saša Štajner*

MENTORICA:

mag. Nina Žuman

ZUNANJA MENTORJA:

doc. dr. Marko Jukić, Sebastjan Kralj

Ljutomer, marec 2023

(* Avtorice smo enakovredno prispevale k nastanku dela.)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant
SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

ZAHVALA

Za pomoč pri nastajanju raziskovalne naloge se zahvaljujemo mentorici z Gimnazije Franca Miklošiča Ljutomer, mag. Nini Žuman, profesorici kemije, ter mag. Saši Pergarju za lektoriranje raziskovalne naloge.

Še posebej bi se zahvalile doc. dr. Marku Jukiću, višjemu raziskovalcu – asistentu z doktoratom s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru, in delovnemu mentorju Sebastjanu Kralju, prav tako s te fakultete.

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

POVZETEK

Virus SARS-CoV-2 je v zadnjih treh letih glavna tematika v svetu. Posledice pandemije smo začutile tudi na lastni koži, predvsem v obliki pomanjkanja socialnih stikov med sovrstniki zaradi prepovedi druženja. Zaradi tega smo za temo raziskovalne naloge izbrale virus SARS-CoV-2, ker smo razlog za »lockdown« želele bolje spoznati in hkrati usvojiti še čim več znanja kemije in biologije. Želele smo tudi ugotoviti, zakaj se ljudje, kljub temu da smo cepljeni, lahko okužimo s virusom in kako bi to lahko morebiti preprečili.

Na začetku je bilo potrebno predelati zbrano gradivo za izboljšanje lastnega razumevanja snovi in si s tem postaviti temelje za nadaljnje raziskovanje. Z novo pridobljenim znanjem smo se lotile raziskovanja za empirični del, ki smo ga opravile na UM FKKT v Laboratoriju za fizikalno kemijo in kemijsko termodinamiko ter na domačih računalnikih s pomočjo računalniških programov.

Osnovni namen izdelave raziskovalne naloge je bil tako poglobljeni vpogled v že tri leta aktualno temo koronavirusa kot tudi spoznavanje virusnih variant SARS-CoV-2 in vpliv njihovih mutacij na razvoj in učinkovitost potencialnih zdravil.

Med raziskovanjem smo proučile strukturo terapevtskih tarč SARS-CoV-2, ki so ključne za delovanje virusa (S-protein, PLpro, 3CLpro/Mpro in RdRp), popisale in predstavile mutacije virusnih variant na tarčnih proteinih, jih vizualizirale s programom za molekularno vizualizacijo PyMol, ter s pridobljenim znanjem o strukturi biologiji poskušale ovrednotiti njihov vpliv na vezavo potencialnih zdravil Tixagevimab, Nirmatrelvir Remdesivir in kandidatne molekule GRL0617. Ugotovile smo, da imajo mutacije virusnih variant velik vpliv na vezavo med terapevtsko tarčo in zdravilom, saj v skrajnih primerih lahko ob nastanku neugodnih mutacij pride do prekinitve vezi med tarčnim proteinom in zdravilom ter odsotnosti njegovega delovanja.

KLJUČNE BESEDE: koronavirus, mutacije, potencialna zdravila, SARS-CoV-2, virusne variante, računska kemija, molekularno modeliranje.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 has been a major topic in the world for the past three years. We have also felt the effects of the pandemic first-hand, mainly in the form of a lack of social contact among peers due to the ban on socialising. This is why we chose SARS-CoV-2 as the topic of our research paper, as we wanted to better understand the reasons for the lockdown and at the same time learn as much as possible about the chemistry and biology behind it. We also wanted to find out why, despite being vaccinated, people can contract the virus and how we could possibly prevent this.

At the beginning, it was necessary to process the material collected to improve our understanding, and thus lay the foundations for further research. With the newly acquired knowledge, we started researching for the empirical part, which was carried out at the UM FKKT in the Laboratory of Physical Chemistry and Chemical Thermodynamics and at home using different computer programmes.

The main aim of the research was to gain a deeper insight into the topic of coronavirus, which has been a hot topic for three years, as well as to learn more about the viral variants of SARS-CoV-2 and the impact of their mutations on the development and efficacy of potential medicaments.

In the course of the study, we investigated the structure of SARS-CoV-2 therapeutic targets that are crucial for viral activity (S-protein, PLpro, 3CLpro/Mpro and RdRp), mapped and presented the mutations of viral variants on the target proteins, visualised them using the molecular visualisation software PyMol, and used our knowledge of structural biology to evaluate their impact on the binding of the experimental drugs Tixagevimab, Nirmatrelvir Remdesivir, and the molecule GRL0617. We have found that mutations in viral variants have a major impact on the binding between the therapeutic target and the drug, since in extreme cases, when unfavourable mutations occur, the binding between the target protein and the drug may be broken and the drug may not work.

KEYWORDS: coronavirus, mutations, drug candidates, SARS-CoV-2, viral variants, computational chemistry, molecular modelling.

Kazalo vsebine

1 UVOD	8
2 METODOLOGIJA	9
2.1 Namen raziskovalne naloge	9
2.2 Cilji raziskovalne naloge	9
2.3 Raziskovalne hipoteze	9
TEORETIČNI DEL	10
3 VIRUSI SARS-COV-2 IN MUTACIJE	10
3.1 Virusi	10
3.1.1. Mutacije	11
3.1.2. Terapevtske tarče	11
3.1.3. Razmnoževanje	12
3.2 SARS-CoV-2	13
3.2.2 Epidemija SARS-CoV-2	14
3.2.3 Pomen razvoja cepiv in že obstoječa cepiva	14
3.2.4 Struktura in sestava	15
3.2.5 Mutacije SARS-COV-2	16
3.2.6 Variante SARS-COV-2	18
3.2.7 Variante z vplivom na terapevtska sredstva	19
3.3 Pomen mutacij SARS-COV-2	19
3.3.1 Vpliv na diagnostiko	19
3.3.2 Vpliv na terapevtsko	19
4 AMINOKISLINE IN PROTEINI	21
4.1 Aminokisliline	21
4.2 Struktura in funkcije proteinov	22
4.3 Nastanek proteina	23
4.3.1 Transkripcija v jedru	23
4.3.2 Translacija na ribosomih	24
4.4 Gradbeni nivoji	25
5 NEKOVALENTNE INTERAKCIJE PROTEINOV	27
5.1 Molekularne interakcije in nekovalentne vezi	27
5.2 Nekovalentne interakcije v proteinih	28
5.3 Vodikova vez	28
5.4 Van der Waalsove vezi	29
5.5 Hidrofobne interakcije	29
5.6 Ionske vezi	30

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant
SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

5.7 Solni mostovi	30
5.8 II-interakcije.....	30
EMPIRIČNI DEL	31
PYMOL.....	31
6 Terapevtska tarča S-protein	34
6.1 Struktura.....	34
6.2 Funkcije.....	35
6.3 Potencialna zdravila, usmerjena na S-protein	35
6.3.1 Slika mutacij na S-proteinu	36
6.3.2 Opis vpliva mutacij na delovanje nevtralizirajočega protitelesa Tixagevimab.....	37
7 Terapevtski tarči 3CLpro in PLpro	38
7.1 3CLpro	39
7.1.1 Funkcija	39
7.1.2 Struktura	39
7.1.3 Zaviralci delovanja	39
7.1.4 Slika mutacij na 3CLpro.....	39
7.1.5 Opis vpliva mutacije na delovanje proteina	40
7.2 PLpro.....	40
7.2.1 Funkcija	40
7.2.2 Struktura	41
7.2.3 Zaviralci.....	41
7.2.4 Slika mutacij na PLpro	41
7.2.5 Opis vpliva mutacij na delovanje proteina	42
8 Terapevtska tarča RdRp.....	42
8.1 Funkcija.....	42
8.2 Struktura	42
8.3 Potencialna zdravila, usmerjena na RdRp.....	43
8.4 Slika mutacij na RdRp.....	43
8.5 Opis vpliva mutacij na delovanje proteina	44
9 UGOTOVITVE IN ZAKLJUČEK	45
10 VIRI IN LITERATURA	47
10.1 Slike.....	47
10.2 Viri in literatura vsebine.....	47
10.3 Tabele	50
10.4 Priloge	50

Kazalo slik

Slika 1: Razmnoževanje virusa (vir: Reproduction of viruses, 2020)	13
Slika 2: Shematski prikaz konice SARS-CoV-2 (vir: Structural and functional ..., 2020).....	16
Slika 3: Prikaz Spike dela SARS-CoV-2 (vir: SARS-CoV-2 virus ..., 2021).....	17
Slika 4: Ključne mutacije (vir: Biosinteza DNA in RNA ..., 2014)	18
Slika 5: Aminokislina (vir: Aminokislina, 2020)	21
Slika 6: Nastanek peptidne vezi (vir: Proteini, 2013)	22
Slika 7: Tabela vseh 20 aminokislin, ki sestavljajo proteine (vir: Temelji biokemije, 2005) .	23
Slika 8: Od gena do proteina (vir: Transcription and Translation, b. d.)	24
Slika 9: Štiri ravni proteinske strukture (vir: Temelji biokemije, 2005).....	27
Slika 10: Prikaz mutacije na terapevtski tarči PLpro v programu PyMol (vir: Saša Štajner) .	32
Slika 11: Prikaz mutacije na PLpro v programu PyMol (vir: Saša Štajner)	32
Slika 12: Primer merjenja vezave mutacije N501Y na protitelo Tixagevimab (vir: Saša Štajner).....	34
Slika 13: Mutacije na S-proteinu (vir: Sebastjan Kralj).....	36
Slika 14: Mutacija N501Y na S-proteinu (vir: Zara Bertalanič).....	37
Slika 15: Mutacija S477N na S-proteinu (vir: Zara Bertalanič)	37
Slika 16: Mutacija E484A na S-proteinu (vir: Zara Bertalanič)	38
Slika 17: Mutacije na 3CLpro (Mpro) (vir: Sebastjan Kralj)	40
Slika 18: Mutacije na PLpro (vir: Sebastjan Kralj)	42
Slika 19: Mutacije na RdRp (vir: Sebastjan Kralj)	43

Kazalo tabel

Tabela 1: Prej krožeče variante SARS-CoV-2 (vir: Variants of Concern reports, 2022).....	19
Tabela 2: Elementi in njihove barve v programu PyMol (vir: Saša Štajner).....	33
Tabela 3: Vrste vodikovih vezi in njihova elektronegativnost (The Hydrogen ..., b. d.)	33

1 UVOD

Raziskovalna naloga je bila pripravljena v okviru razpisa mladih kemikov pod okriljem Slovenskega kemijskega društva. Izbrano temo, ki zaobjema znanje tako računske kemije kot biologije, smo raziskale s pomočjo zunanjih mentorjev s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru. V nalogi smo primerjale mutacije terapevtskih tarč virusnih variant SARS-CoV-2 in vpliv mutacij na razvoj in delovanje novih zdravil.

Epidemija COVID-19 je močno zaznamovala naša življenja, k sreči so se proti novemu SARS-CoV-2 virusu hitro začela razvijati nova zdravila oziroma cepiva, ki bi oslabila njegovo delovanje. Cepivo pa žal ni bila trdna zagotovitev za odpornost proti okužbi, kar smo lahko vsi tudi občutili, saj smo se kljub cepljenju lahko okužili z virusom. To je bila posledica stalnih mutacij virusa in njegovega S-proteina. Zdravila, razvita na druge tarčne proteine SARS-CoV-2 in druga vezavna mesta na S-proteinu so manj občutljiva na mutacije ter ob okužbah z novimi virusnimi variantami lahko delujejo tako preventivno kot kurativno. To nam omogoča pridobitev časa za prilagoditev cepiv. Naša naloga je nastala z namenom povečati možnosti za odpornost proti virusu. Popis mutacij nam namreč omogoča vpogled v vezavo mutiranega virusa z obstoječimi in kandidatnimi zdravili in protitelesi ter napoved spremembe v interakciji, kar nam omogoča boljšo pripravljenost.

Ker so bile izbrane tarče proteini in zdravila majhne molekule, smo proučile predvsem proteine, aminokislino, ki jih sestavljajo, in interakcije, ki jih tvorijo proteini z drugimi molekulami, pri čemer smo se osredotočile predvsem na nekovalentne interakcije. Ta tip interakcij je prisoten pri prepoznavanju proteinov in pri zdravilih, zato so spremembe v aminokislinskem zaporedju proteinov kot posledica mutacij ključne za vpliv na vezavo oz. prepoznavanje proteinov.

Cilj dela je spoznati virusne variante SARS-CoV-2 in popis mutacij štirih terapevtskih tarč (S-protein, PLpro, 3CLpro/Mpro in RdRp) SARS-CoV-2 ter proučitev vpliva teh mutacij na razvoj novih zdravil. V ta namen smo s pomočjo programov za vizualizacijo molekul proučile strukturo terapevtskih tarč, popisale in predstavile mutacije virusnih variant, jih vizualizirale s programom za molekularno vizualizacijo ter s pridobljenim znanjem poskušale ovrednotiti njihov vpliv na vezavo potencialnih zdravil.

2 METODOLOGIJA

2.1 Namen raziskovalne naloge

Intenziven globalni prehod blaga in ljudi ter moderni življenjski slog in gospodarski pristopi zahtevajo višjo pripravljenost za razvoj in adaptacijo zdravil in cepiv. Slednje je postalo očitno v kontekstu globalnega pojava odpornosti mikroorganizmov na sodobna zdravila, še bolj pa smo se tega zavedeli ob nastopu pandemije SARS-CoV-2 na prehodu iz leta 2019 v leto 2020. Pandemija bolezni COVID-19 je tako ohromila javno življenje in nas soočila z dejstvom, da smo ob soočenju s patogenimi virusi lahko zelo nemočni. Tako se moramo zavedati globalne soodvisnosti in se ustrezno pripraviti na bodočnost. Namen raziskovalne naloge je vpogled v pojav globalnega patogena – za katerega si bomo izbrali nedavni primer koronavirusa SARS-CoV-2 in s pomočjo modernih podatkovnih zbirk oceniti, kako se odziva v globalnem okolju gostiteljev. Zanima nas, ali je takšen patogen statičen ali se tudi sam spreminja. Ocenili bomo, ali so spremembe patogena relevantne za razvoj potencialnih zdravil in/ali cepiv.

2.2 Cilji raziskovalne naloge

Cilj raziskovalne naloge je opis patogena SARS-CoV-2 ter analiza sodobnih podatkovnih zbirk in znanstvene literature, ki spremlja razvoj in pojavnost patogena skozi čas v populaciji. Med nastajanjem raziskovalne naloge bomo virusne variante raziskali in opisali, kaj sploh so. Zanimalo nas bo, zakaj se virusne variante sploh pojavljajo in v čem se med seboj razlikujejo. Predvsem bomo osredotočeni na spremembe virusa in na to, kako so te povezane z boleznijo in razvojem potencialnih novih zdravil in/ali cepiv.

2.3 Raziskovalne hipoteze

Postavili smo spodnje hipoteze.

H1: Virus ni statičen patogen in se med razmnoževanjem spreminja.

H2: Pojav virusnih variant je povezan z velikostjo populacije, v kateri se patogen razmnožuje.

H3: Virusne variante bistveno ne vplivajo na razvoj zdravil.

H4: Vsi selektivni in aktivni zaviralci ne zavirajo delovanja izbranih terapevtskih tarč virusnih variant SARS-CoV-2.

TEORETIČNI DEL

3 VIRUSI SARS-COV-2 IN MUTACIJE

Vsi virusi med razmnoževanjem v gostitelju mutirajo. Mutacije, ki so spremembe genskega materiala virusa, se po prepisu odražajo na proteinih virusa. Spremembe aminokislin v proteinu pomenijo tudi spremembe interakcij v proteinu, za katere vemo, da so pomembne tako za vzpostavitev strukture proteina kot funkcijo. Vse spremembe aminokislin lahko vplivajo na prepoznavanje terapevtskih tarč in zdravil. Razumevanje njegovega vpliva je ključno za adaptacijo zdravil na mutirane viruse oz. virusne variante. Virus SARS-CoV-2 se je v kratkem času močno razširil med svetovnim prebivalstvom. Ker je v okolju prisotna večja količina virusa, je povečano tudi število mutacij, kar pomeni hiter nastanek novih virusnih variant in s tem povečano potrebo po prilagajanju cepiv in zdravil, saj njihovo delovanje upade na račun mutacij virusa in slabe vezave molekul. V naslednjem poglavju so predstavljene osnove virusov s poudarkom na SARS-CoV-2 in mutacijah.

3.1 Virusi

Virusi so najmanjši mikroorganizmi, ki imajo poleg genoma še druge sestavine in se tako razlikujejo od enostavnejših samostojnih genetskih elementov, kakršni so viroidi ali plazmidi, ki vsebujejo le nukleinsko kislino. Razlikujejo se tudi od prionov, kužnih beljakovin domnevno brez nukleinske kisline. Virusni genom predstavlja bodisi DNK ali RNK, ki je zaščitena z beljakovinskim plaščem in pri nekaterih virusih še z ovojnico. Virusom manjkajo sistemi za sintezo lastnih sestavin, zato so obvezni znotrajcelični zajedalci. V naravi se ne razmnožujejo samostojno, ampak šele po vstopu njihovega genoma v celico. Njihova zgradba odraža veliko ekonomičnost, majhen virusni genom kodira le omejeno število beljakovin. Virusi so pogosto pravilna geometrijska telesa, pri katerih se sestavine ponavljajo na določenih mestih. Taki virusi so lahko v celici razporejeni v mrežam podobne skupine ali pa se zunaj celic združujejo v psevdokristale. (Koren idr., 2011)

Virusi imajo največjo genetsko raznolikost med vsemi mikroorganizmi. Podobno kot pri bakterijah lahko tudi pri virusih opazujemo pojave, povezane z zgradbo in ureditvijo genoma. Najpogostejši genetski spremembi pri virusih sta mutacija (sprememba virusnega genetskega materiala) in rekombinacija (izmenjava genetskega materiala med dvema virusoma).

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

Viruse so dolgo časa po odkritju poimenovali po boleznih, ki jih povzročajo. Od bakterij so jih razlikovali po tem, da so prehajali skozi bakteriološke filtre in niso uspevali na umetnih gojiščih. Ker virusov ni bilo mogoče spoznavati drugače kot v gostiteljskih organizmih in so jih lahko gojili ali raziskovali le v laboratorijskih živalih, so jih znanstveniki razvrščali predvsem po njihovem tropizmu (sposobnosti za razmnoževanje v določenih celicah, tkivih ali organih) in jih imenovali nevrotropne, dermatotropne ali pa enterične viruse. Nekatere so imenovali po načinu širjenja okužbe ali prenosa na nove gostitelje, npr. abroviruse, ki jih prenašajo členonožci. Šele z gojitvijo virusov v tkivih in celičnih kulturah, s čimer so uspeli pridobiti zadostne količine prečiščenih virusov in opazovati njihovo razmnoževanje v posameznih celicah, se je nabralo dovolj podatkov o virusnih lastnostih, da je bilo mogoče oblikovati naravni sistem. Ta se še vedno razlikuje od sistema in poimenovanja rastlin in živali, ker ga ne moremo utemeljiti z evolucijo posameznih virusov. Temu cilju se približujemo v zadnjih letih, ko pri nekaterih virusih z analizo njihovega genoma sklepamo na evolucijske in sorodstvene povezave. (Koren idr., 2011)

3. 1. 1. Mutacije

Najpomembnejše in razširjene dedne spremembe v virusnem genomu so mutacije, ki nastanejo zaradi insercije (dodajanja), delecije (odvzemanja) ali substitucije (zamenjevanja) nukleidov. Največ mutacij je usodnih, mutirani virusi se ne morejo več razmnoževati. Veliko mutacij je nevtralnih, kar pomeni, da ne vplivajo na specifične lastnosti virusov. Zaradi nekaterih mutacij pa virusi pridobijo določene selektivne prednosti. Naravne mutacije, ki povzročijo spremembe v zgradbi ključnih epitopov (področje v makromolekuli antigena, ki ga prepozna imunski sistem) na površini virusa, ovirajo delovanje imunskega sistema in otežkočajo pripravljanje učinkovitih virusnih cepiv. (Koren idr., 2011)

3. 1. 2. Terapevtske tarče

Terapevtske tarče predstavljajo proteini virusa, ki so njegovi sestavni deli. Ob vezavi potencialnih zdravil na terapevtske tarče je delovanje virusa onemogočeno in posledično je zmanjšana tudi njegova sposobnost za patogenezo (nastanek bolezni).

Zaradi mutacij v terapevtskih tarčah pa ni nujno, da bodo zdravila uspešna. Da bi bilo potencialno zdravilo uspešno, bi moralo priti do dovolj močne interakcije med virusom in protitelesom oz. zdravilom, ki bi oslabilo delovanje virusa.

V koronavirusu smo identificirali naslednje terapevtske tarče:

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

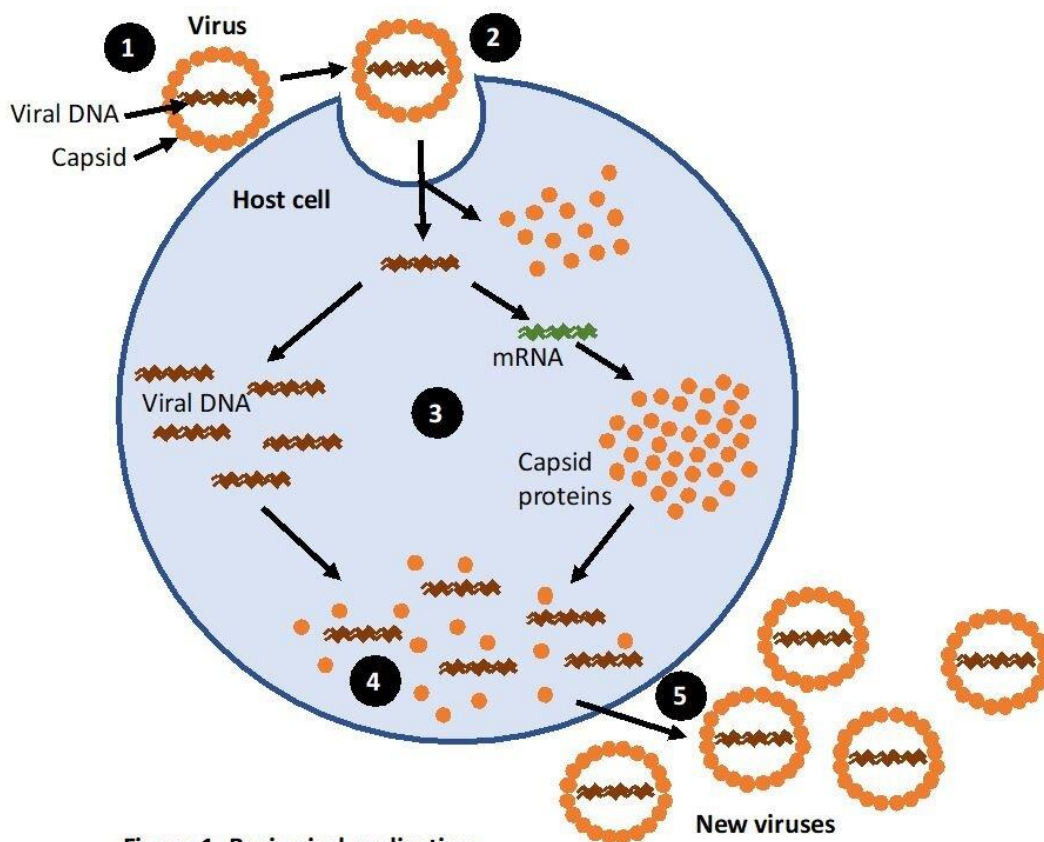
- S-protein (koničasti protein);
- PLpro (papainu podobna proteaza);
- 3CLpro (3-kimotripsinu podobna cisteinska proteaza);
- RdRp (od RNK odvisna RNK-polimeraza).

Nahajajo se lahko na površju virusa (S-protein) ali v njegovi notranjosti (PLpro, 3CLpro, RdRp).

3. 1. 3. Razmnoževanje

Razmnoževanje virusov poteka v več zaporednih stopnjah.

V prvi stopnji se virus pritrdi na celice, nato pa z zlitjem lastne membrane z membrano gostitelja vstopi vanje ter pri tem v notranjosti celice gostitelja sprosti virusne nukleinske kisline. Zatem pride do sinteze virusnih beljakovin in pomnoževanja virusne nukleinske kisline, kar vodi do sestavljanja novih virusov in izstopanja iz celic.



Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

Slika 1: Razmnoževanje virusa (vir: Reproduction of viruses, 2020)

Razmnoževanje virusov je zelo zapleteno dogajanje in se bistveno razlikuje od razmnoževanja drugih mikroorganizmov. Poteka samo v živih (človeških, živalskih, rastlinskih in bakterijskih) celicah. Virusni genom ima ves zapis za izgradnjo virusa, vendar mora gostiteljska celica zagotoviti potrebno energijo in strnitveni ustroj za izdelovanje novih virusov.

V začetku virusnega razmnoževalnega procesa se virus razgradi, v celici je samo virusna nukleinska kislina, ki prevzame nadzor nad celično presnovo. To je obdobje t. i. virusnega mrka oz. eklipse, ki traja od 2 do 12 ur. Sledi obdobje zorenja oz. maturacije, ko se v celici začnejo pomnoževanje virusne nukleinske kisline in sinteza virusnih beljakovin ter sestavljanje novih kužnih virusov (virionov). Število virusov se povečuje eksponentno. V nekaj urah ali dneh se v celici nabere od nekaj tisoč do več sto tisoč virusov, ki v zadnji fazi izstopijo iz celice, ki lizira. (Koren idr., 2011)

3.2 SARS-CoV-2

Koronavirus 2019 (COVID-19) se je prvič pojavil na Kitajskem konec leta 2019 in je ogrozil zdravje ljudi po vsem svetu. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je število primerov COVID-19 preseglo 609 milijonov, število smrti pa več kot 6,5 milijona ljudi po vsem svetu. Učinki COVID-19, ki jih povzroča koronavirus hudega akutnega respiratornega sindroma (SARS CoV-2), se kažejo kot neobičajni simptomi virusne pljučnice, vključno s hudo dispnejo – občutkom pomanjkanja zraka, izgubo okusa/voha, vročino, suhim kašljem, utrujenostjo, bolečinami po telesu in drisko. SARS-CoV-2 je sposoben prenosa med gostitelji, kot so ljudje in živali, ter ima visoko patogenost in virulenco.

CoV so virusi z ovojnico z lipidno membrano, pridobljeno iz gostiteljske celice. Vanjo so vgrajeni virusni površinski proteini. Proteini, ki štrlijo iz virusne membrane (zlasti spike ali S-protein), dajejo tem patogenom značilen videz pod elektronskim mikroskopom.

Vsem CoV je skupno, da je njihov genom v obliki enoverižne ribonukleinske kisline (RNK) s pozitivno polarnostjo, kar pomeni, da osnovno zaporedje RNK ustreza kasnejši informacijski RNK (messenger RNA – mRNK). Z dolžino 26,4–31,7 kilobaz (26400–31700 baznih parov) je genom CoV največji genom RNK od vseh znanih virusov RNK.

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

- Podobnost aminokislinskega zaporedja med SARS-CoV-2 in SARS-CoV-1 je 77 %.

S-glikoprotein na površini CoV se lahko pritrdi na celični receptor angiotenzin-konvertazo 2 (ACE2) na površini človeških celic. ACE2 se nahaja v spodnjih dihalnih poteh ljudi in uravnava medvrstni prenos in prenos s človeka na človeka.

SARS-CoV-2 ima visoko stopnjo mutacije zaradi proteina in terapevtske tarče RdRp (RNA-dependent RNA polymerase – od RNK odvisna RNK-polimeraza), ki je nagnjena k napakam in je odgovorna za podvajanje genetskih informacij. Ta lastnost in druge so prispevale k veliki raznolikosti CoV v naravi, kar tem virusom omogoča okužbo številnih vrst.

Prvi opisani koronavirus je bil izoliran iz piščančjih zarodkov leta 1937, in sicer virus infekcijskega bronhitisa (IBV). Od takrat so številne CoV odkrili pri najrazličnejših živalih, vključno z divjimi živalmi, domačimi živalmi in hišnimi ljubljenci. Razdeljeni so na rodove α - in β -CoV, povezane s sesalci, ter γ - in δ -CoV, povezane s pticami. (Ludwig, Zarbock, 2020)

3.2.2 Epidemija SARS-CoV-2

Decembra 2019 je bila Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) obveščena o izbruhu bolezni v Wuhanu v provinci Hubei na Kitajskem. Januarja 2020 je SZO (Svetovna zdravstvena organizacija) razglasila, da je epidemija te bolezni izredna zdravstvena nesreča mednarodnega pomena (PHEIC – Public health emergency of international concern). Februarja 2020 je SZO trenutni izbruh koronavirusne bolezni uradno poimenovala Koronavirusna bolezen – 2019 (COVID-19), medtem pa je Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses) virus prvič imenoval SARS-CoV-2.

3.2.3 Pomen razvoja cepiv in že obstoječa cepiva

- Za nadzor epidemije in širjenja SARS-CoV-2 je poglobitnega pomena razvoj učinkovitih in varnih cepiv ter zdravil. Od izbruha pandemije se je pojavilo 177 kandidatov za cepivo, 54 jih je v fazi testiranja na ljudeh. Za obvladovanje pandemije so pomembna tako cepiva kot zdravila, slednja imajo največjo vlogo predvsem po nastanku bolezni, cepiva pa v večini primerov apliciramo preventivno. Prav tako je mehanizem delovanja povsem različen, pri cepivih izzovemo imunski odziv gostitelja

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

z oslabljenimi delci virusa, pri zdravilih pa delujemo direktno na proteine virusa. (Wang idr., 2020) (COVID-19 Vaccine ..., 2022)

Odobrena cepiva proti COVID-19 v Sloveniji so prikazana v Prilogi 1.

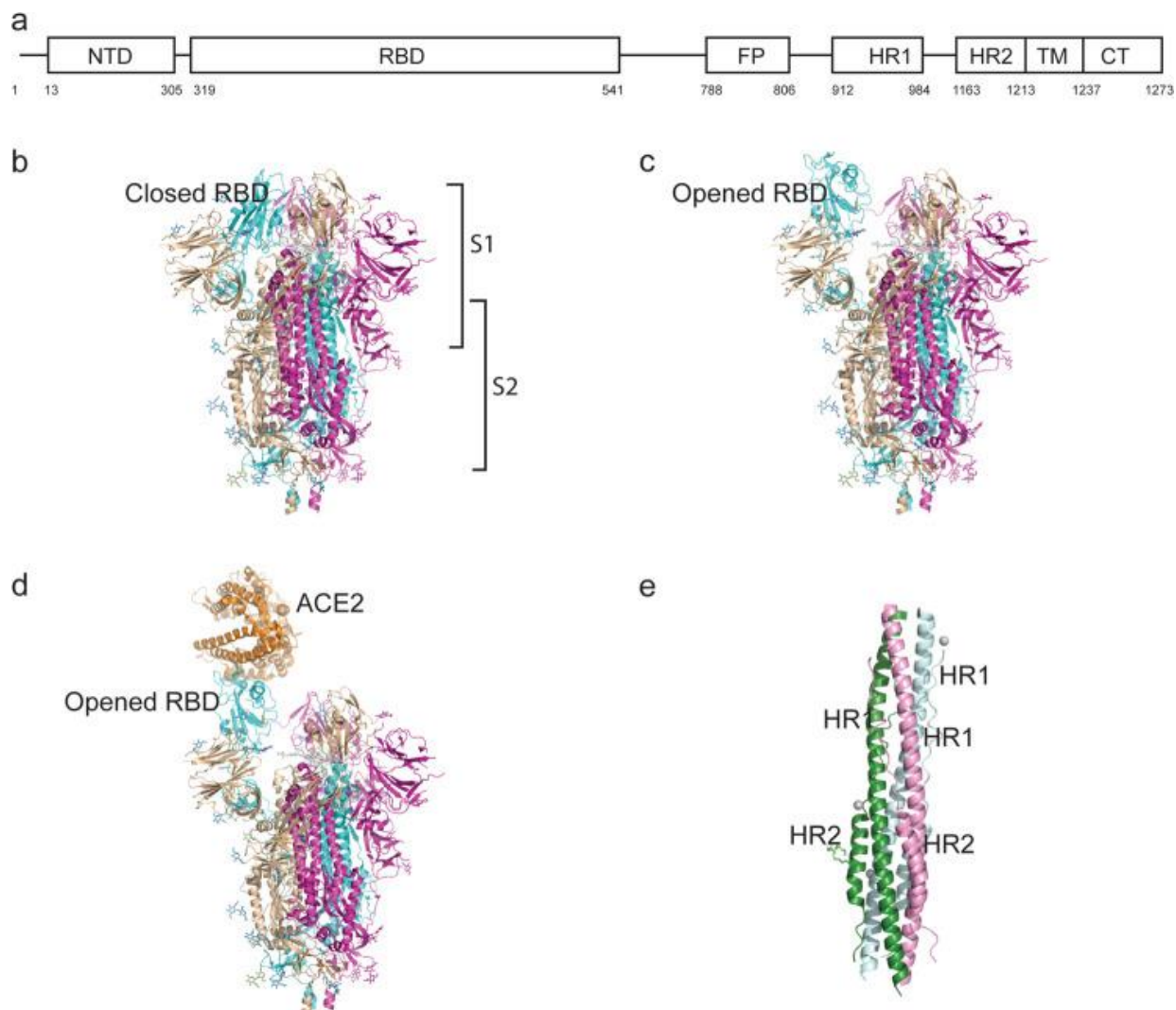
3.2.4 Struktura in sestava

Virion SARS-CoV-2 ima premer približno 50–200 nanometrov. Večina koronavirusov vključno s SARS-CoV-2 ima štiri strukturne beljakovine, znane kot S (spike – konica), E (envelope – ovojnica), M (membrana) in N (nukleokapsida).

Vstop koronavirusov v gostiteljske celice posreduje konica spike glikoproteina – S-proteina, prek katere se virus veže na celice. Ker je ta protein kritičen za vstop koronavirusov, predstavlja privlačno protivirusno tarčo. S-protein je sestavljen iz dveh funkcionalnih podenot, in sicer S1 in S2. Funkcija podenote S1 je vezava na receptor na gostiteljski celici. Funkcija podenote S2 pa je spajanje membran virusov in gostiteljskih celic. (Huang idr., 2020)

Shematski prikaz konice SARS-CoV-2 je prikazan na sliki 2, na kateri je z b in c označen S-protein receptorsko vezavne domene (RBD – receptor-binding domain), in sicer z zaprtim in odprtim statusom. Ob zaprtem statusu je S-protein nedostopen receptorju, ob odprtem statusu pa ima možnost vezave na receptor. Z d je označen S-protein, ki se veže na celični receptor ACE2 (angiotenzin-konvertaza 2) z odprtim statusom RBD v podenoti S1. Z e je označena struktura šestih vijačnic, ki jo tvorita HR1 in HR2 (heptade repeat – heptadna ponovitev) podenote S2. Heptadna ponovitev ali HR je domena, ki zagotavlja ključne informacije o virusnem mehanizmu. Sestavljena je iz peptidov, sama podenota S2 pa je sestavljena iz dveh takšnih domen.

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**



Slika 2: Shematski prikaz konice SARS-CoV-2 (vir: *Structural and functional ...*, 2020)

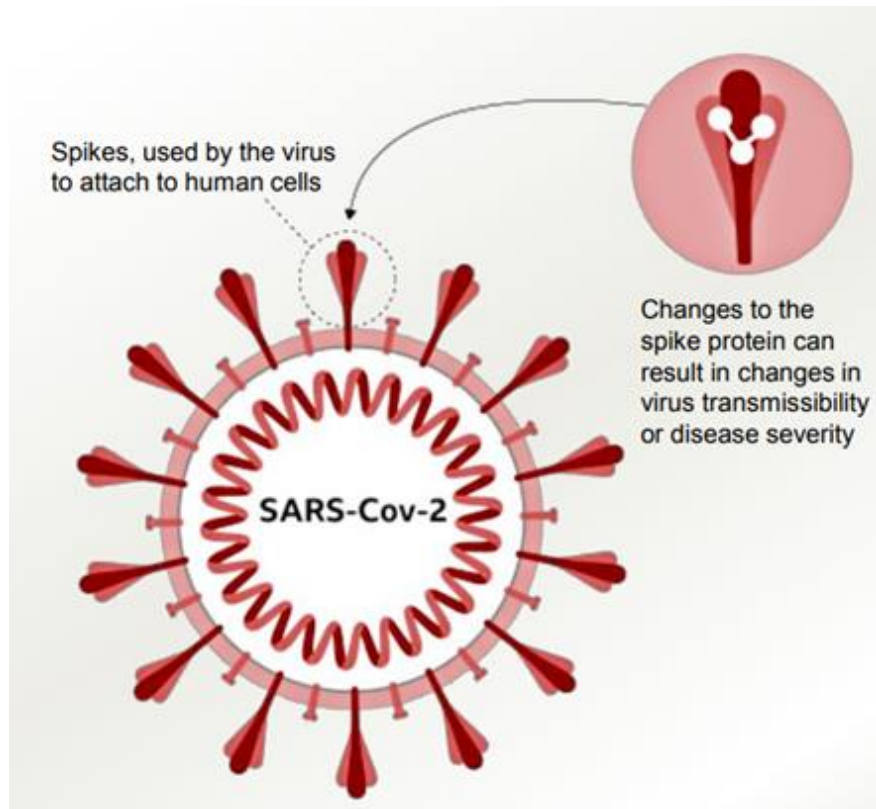
3.2.5 Mutacije SARS-COV-2

V biologiji je mutacija definirana kot sprememba v zaporedju nukleinske kisline genoma organizma oziroma virusa. Virusni genomi vsebujejo DNK ali RNK. Mutacije so posledica napak med replikacijo, mitozo, mejozo ali pa nastanejo kot posledica drugih vrst poškodb (npr. UV). Mutacije so lahko tudi posledica vstavitve ali izbrisa segmentov DNK zaradi mobilnih genetskih elementov.

Čisto običajno je, da se virusi sčasoma razvijajo z mutacijami, ker imajo te tudi svoje značilnosti. Mutacija pomeni dejansko spremembo v gensko zaporedje virusa. Mutacije lahko povzročijo, da je virus bolj prenosljiv, povečajo resnost bolezni ali vplivajo na učinkovitost

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

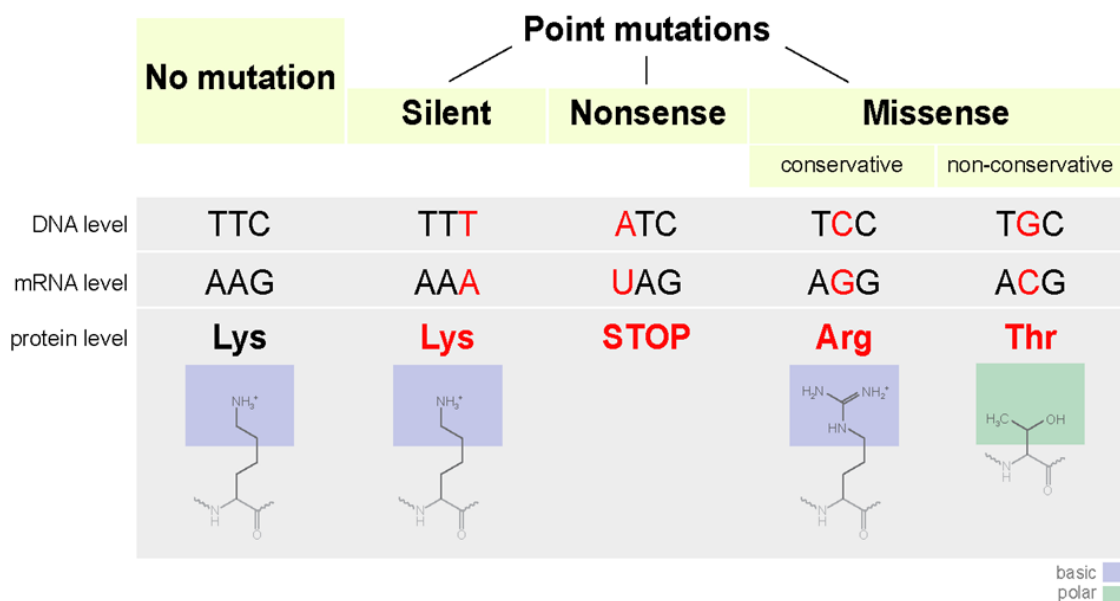
diagnostike, terapije ali cepiva. Ko te variante povečajo tveganje za človekovo zdravje, se štejejo za »variants of concern« (skrb vzbujajoče variante). Kadar je v populaciji veliko okužb, se verjetnost, da bo virus mutiral, poveča.



Slika 3: Prikaz Spike dela SARS-CoV-2 (vir: SARS-CoV-2 virus ..., 2021)

Poznamo več različnih vrst mutacij. **Drugačnosmiselna mutacija (missense mutation)** je vrsta mutacije, pri kateri pride do spremembe enega baznega para DNA, ki ima za posledico zamenjavo ene aminokislina drugo v beljakovini, ki jo tvori gen. **Nesmiselna mutacija (nonsense mutation)** je prav tako sprememba enega baznega para DNK. Namesto zamenjave ene aminokislina z drugo DNK prežgodaj signalizira celici spremenjeno zaporedje, da preneha graditi beljakovino. Ta vrsta mutacije povzroči skrajšan protein, ki lahko deluje nepravilno ali pa sploh ne deluje. **Tihe mutacije (silent mutation)** predstavljajo tiste mutacije, ki spremenijo baze DNA, nimajo pa nobenega vpliva na zaporedje aminokislina v beljakovini. Te mutacije ne vplivajo na strukturo ali delovanje proteina. (Types of mutations, 2022)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**



Slika 4: Ključne mutacije (vir: Biosinteza DNA in RNA ..., 2014)

3.2.6 Variante SARS-COV-2

Varianta oz. različica je virusni genom (genetska koda), ki lahko vsebuje eno ali več mutacij. V nekaterih primerih lahko javnozdravstvene organizacije skupino variant s podobnimi genetskimi spremembami, kot je linija ali skupina linij, označijo kot spremljano varianto (VUM), skrb vzbujajočo varianto (VOC) ali zanimivo varianto (VOI) zaradi skupnih lastnosti in značilnosti, ki lahko zahtevajo javnozdravstvene ukrepe.

- **Skrb vzbujajoče variante (VOC – Variants of Concern):** VOC je opredeljena s povečanjem prenosljivosti in virulence ali zmanjšanjem učinkovitosti izvajanih javnozdravstvenih, socialnih ukrepov in razpoložljivih terapevtskih sredstev.
- **Zanimive variante (VOI – Variants of interest):** VOI je opredeljena z variantami, za katere opazimo, da povzročajo širjenje v skupnosti, da se pojavijo v več primerih ali skupinah ali pa so bile odkrite v različnih državah.
- **Spremljane variante (VUM – Variants under monitoring):** VUM je opredeljena kot varianta z genetskimi spremembami, za katere se domneva, da vplivajo na lastnosti virusa, lahko predstavljajo tudi tveganje za javno zdravje in varnost v prihodnosti. Za zbiranje dokazov o fenotipskih ali epidemioloških učinkih teh variant sta potrebna okrepljeno spremljanje in stalna ocena.

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

3.2.7 Variante z vplivom na terapevtska sredstva

Trenutno so pod nadzorom le skrb vzbujajoče variante – VOC, trenutno krožeče zaskrbljujoče variante ali HOC pa predstavlja varianta omikron, ki je bila določena 24. novembra 2021. Omikron ima za razliko od ostalih variant znanih veliko podvariant (primer: BA.5, BA.2.75, BA.4.6, XBB in BA.2.3.20).

Delovna definicija skrb vzbujajočih variant: varianta, ki glede na študijo evolucijskega razvoja vrste pripada trenutno krožečemu VOC. Varianta Rrav tako kaže prednosti prenosa v primerjavi z drugimi krožečimi linijami VOC ter ima dodatne aminokislinske spremembe, za katere je znano ali domnevno, da dajejo opaženo spremembo v epidemiologiji in fitnessu prednost v primerjavi z drugimi variantami v obtoku.

Prej krožeče variante, torej variante ki so se pojavile v preteklosti, predstavljajo variante alfa, beta, gama in delta, katerih število odkritih zaporedij s kombinirano linijo variante je prikazana v tabeli. (Tracking SARS-CoV-2 variants, 2020)

Oznaka WHO	Št. odkritih zaporedij s kombinirano linijo variante (od 14. 12. 2022)
alfa	1.173.176
beta	42.169
gama	127.687
delta	4.417.682

Tabela 1: Prej krožeče variante SARS-CoV-2 (vir: Variants of Concern reports, 2022)

3.3 Pomen mutacij SARS-COV-2

3.3.1 Vpliv na diagnostiko

Trenutna molekularna in vitro diagnostika za COVID-19 temelji na genomskih testih za odkrivanje, seroloških testih za odkrivanje protiteles in odkrivanju virusnega antigena. Različne mutacije lahko privedejo do spremenjene diagnostike.

3.3.2 Vpliv na terapevtiko

Prva linija zdravil za COVID-19 v klinični uporabi so protivirusna zdravila širokega spektra, kot so analogi nukleotidov (na primer Remdesivir, Favipiravir) ali analogi glukoze (2-deoksi-

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

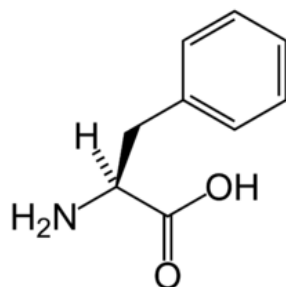
d-glukoza), na katere mutacije običajno ne vplivajo. Poleg tega mutacije ne vplivajo na zdravila za zatiranje citokinske nevihte, oblike sindroma sistemskega vnetnega odziva, ker ta zdravila ne delujejo neposredno na virus, temveč delujejo na imunski sistem bolnika. Mutacije imajo lahko posledice pri ciljnih terapijah z uporabo zdravil z majhnimi molekulami, bioloških zdravil ali konvalescentni plazmi, pri kateri se za terapijo uporablja kri prebolelih za zdravljenje okuženih, ker ta kri vsebuje protitelesa proti virusu. (Thakur idr., 2022)

4 AMINOKISLINE IN PROTEINI

Proteini, sestavljeni iz aminokislin, so osnovne gradbene enote vseh celic v človeškem telesu in so prisotni v vseh živih bitjih. V telesu opravljajo strukturne in regulacijske funkcije. Za celostno razumevanje vpliva mutacij in njihove napovedi funkcije virusa ob vezavi z zdravili je ključno razumevanje delovanja aminokislin in proteinov. V spodnjem poglavju so predstavljeni osnovni gradniki proteinov – aminokisline, potem pa še proteini z vidika nastanka in strukture.

4.1 Aminokisline

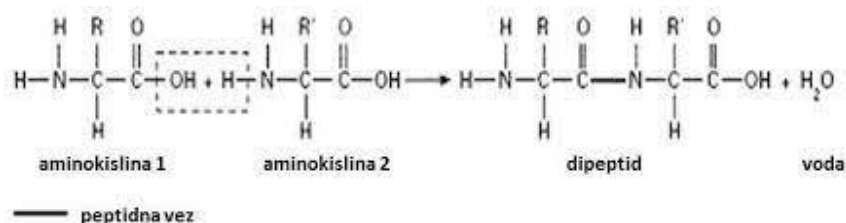
Aminokisline so osnovni gradniki beljakovin. So organske molekule, ki imajo amsko (-NH₂) in karboksilno (-COOH) funkcionalno skupino, vezano na skupen ogljikov atom. V organski kemiji je ogljik, na katerega je pripeta funkcionalna skupina, poimenovan atom α -C. Enak atom dve mesti stran od funkcionalne skupine pa se imenuje atom β -C. Nanj je poleg vodika vezan še spremenljivi del molekule – radikal, ki določa značaj in vlogo aminokisline v beljakovini. V beljakovinah in aminokislinah je atom α -C ogljik zraven karboksilne skupine. (Tomažič idr., 2017)



Slika 5: Aminokislina (vir: Aminokislina, 2020)

Aminokisline se med seboj povezujejo s kovalentno vezjo, ki nastane med karboksilno skupino ene in aminoskupino druge aminokisline. Vez med aminokislinami imenujemo peptidna ali amidna vez. Polimer, ki nastane iz več tisoč aminokislinskih monomerov, imenujemo polipeptid, vendar ta ni sinonim za beljakovino. Le dovolj dolge polipeptidne verige, sestavljene iz več kot 50 aminokislin, oblikujejo beljakovino oz. protein. (Tomažič idr., 2017)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**



Slika 6: Nastanek peptidne vezi (vir: Proteini, 2013)

Z vidika strukturne biologije je najpomembnejša tehnika za določanje strukture proteina rentgenska kristalografija oziroma difrakcija rentgenskih žarkov na kristalnih proteinih. Pri tej metodi elektronski oblak atoma rahlo upogne rentgenske žarke in tako nastane slika molekule, ki jo je mogoče videti na zaslonu. Poleg tega poznamo tudi jedrsko magnetno resonanco (NMR), pri kateri ugotavljajo magnetne lastnosti jeder atomov v proteinu, in krioelektronsko mikroskopijo, ki je primerna za večje delce. Vse tri metode nam omogočajo pridobitev 3D-strukture proteina, s pomočjo katere lahko boljše razumemo njihovo funkcijo. Prav tako je pomemben prispevek metod za določanje struktur proteinov z vezanimi molekulami (tudi zdravili), saj s pomočjo takih struktur boljše razumemo njihovo delovanje.

4.2 Struktura in funkcije proteinov

Izraz protein/beljakovina je leta 1838 prvič uporabil nizozemski kemik Gerardus Mulder za poimenovanje skupine molekul, ki so se pogosto pojavljale v vseh rastlinah in živalih. Proteini, ki so biološki polimeri aminokislin, imajo ogromno različnih struktur in funkcij. Zgrajeni so iz kombinacij 20 različnih aminokislin, ki so zapisane v genih. (Boyer, 2005)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

ime aminokislina	enočrkovni zapis	tričrkovni zapis
glicin	G	Gly
alanin	A	Ala
valin	V	Val
levcin	L	Leu
izolevcin	I	Ile
metionin	M	Met
fenilalanin	F	Phe
prolin	P	Pro
serin	S	Ser
treonin	T	Thr
cistein	C	Cys
asparagin	N	Asn
glutamin	Q	Gln
tirozin	Y	Tyr
triptofan	W	Trp
aspartat	D	Asp
glutamat	E	Glu
histidin	H	His
lizin	K	Lys
arginin	R	Arg

Slika 7: Tabela vseh 20 aminokislin, ki sestavljajo proteine (vir: Temelji biokemije, 2005)

4.3 Nastanek proteina

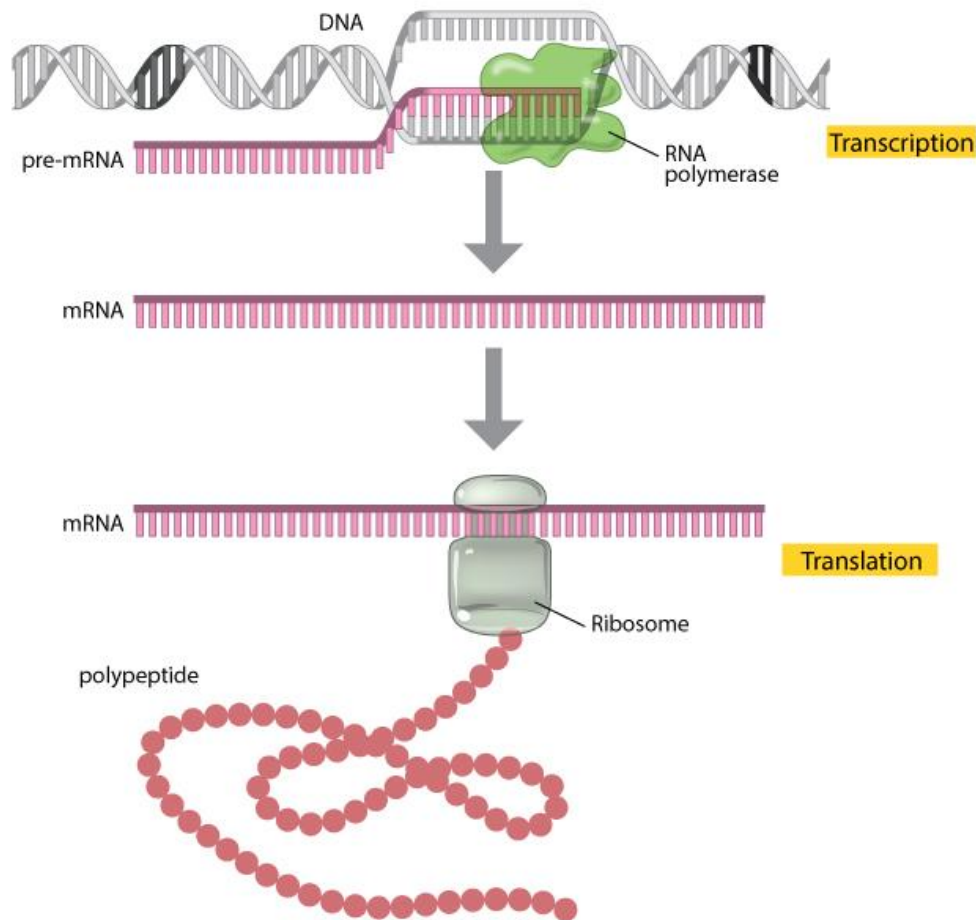
Pri sintezi proteina gre za prepis genske informacije iz odseka DNK v zaporedje aminokislin, ki je značilno za ta protein. DNK se nahaja v celičnem jedru, medtem ko sinteza proteinov poteka na ribosomih, zato je potreben posrednik, ki ga v našem telesu predstavlja molekula obveščevalne RNK (mRNA – messenger RNK). Ta gensko informacijo prevzame z DNK in jo prenese do ribosomov, na katerih pride do nastanka proteina. (Sinteza proteinov, 2010)

4.3.1 Transkripcija v jedru

Molekula mRNA se sintetizira na verigi DNK, natančneje v procesu prepisovanja ali transkripcije. Ta poteka tako, da se dvojna vijačnica DNK odpre na mestu, na katerem se začne gen, ki se bo prepisal. Na eno verigo se nalagajo ribonukleotidi (del RNK, ki ga sestavljajo riboza, fosfatna skupina in organske baze), ki se med seboj povežejo v verigo mRNA. Prepisovanje uravnava encim RNK-polimeraza, ki prepozna verigo DNK in začne

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

sintezo le v pravilni smeri (smer pravilnega zaporedja baz). Sintetizirana mRNK se odcepi od DNK in prehaja do ribosomov. (Sinteza proteinov, 2010)



Slika 8: Od gena do proteina (vir: *Transcription and Translation, b. d.*)

4.3.2 Translacija na ribosomih

Sinteza proteinov na ribosomih se imenuje translacija oz. prevajanje. Poteka v treh stopnjah: iniciacija (začetek), elongacija (podaljševanje) in terminacija (zaključek). Med iniciacijo ribosom prepozna začetno mesto na mRNK. Pri elongaciji se molekule aminokislin vežejo na prenašalno RNK – tRNK (transport RNA), ki se nahaja v celični citoplazmi in prenaša aminokislino do ribosomov. Ta vrsta ima tri zanke, za njeno delovanje pa sta pomembni dve območji. Eno je zaporedje treh nukleotidov, ki je komplementarno zaporedju kodona v informacijski RNK (mRNK). To zaporedje se imenuje antikodon in z njim tRNK prepozna kodon v mRNK. Drug pomemben del tRNK je konec, na katerega je vezana točno določena

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

aminokislina, ki jo določa genetski kod. Ko se mRNK prenese iz jedra v citoplazmo, se poveže z ribosomskima podenotama. Skozi ribosom se mRNK premika kodon za kodonom. Na osnovi vsakega kodona tRNK doda novo aminokislino, ki se s predhodno aminokislino poveže s peptidno vezjo. Na ta način se sestavi polipeptidna veriga, ki se kasneje prostorsko uredi v ustrezno beljakovino.

Proces, med katerim se RNK prevede v zaporedje aminokislin, imenujemo prevajanje ali translacija. V zadnji fazi pride do terminacije. Prevajanje se zaključi, ko v ribosom vstopi stop kodon oz. terminacijski kodon. To je nukleotidni triplet v mRNK, ki označuje zaključek procesa prevajanja trenutne beljakovine. Ko v ribosom vstopi stop kodon, se prevajanje zaključi, beljakovina pa se sprostí ter lahko takoj začne opravljati svojo nalogo ali pa se v celici še nadalje preoblikuje in prenese iz celice do mesta, na katerem učinkuje. (Tomažič idr., 2017) (Sinteza proteinov, 2010)

4.4 Gradbeni nivoji

Polipeptidi se razlikujejo po številu in zaporedju aminokislin v verigi. **Primarna struktura proteina** je določena z zaporedjem aminokislin v polipeptidu, ki so med seboj povezane s kovalentno peptidno vezjo. Stranske verige so specifične za vsako aminokislino in so edina stvar, po kateri se med seboj razlikujejo.

Posamezni deli verige se običajno spontano gubajo ali zvijajo kot vijačnica. Med sosednjimi zavoji v vijačnici ali med gubami sosednjih delov verige se tvorijo številne vodikove vezi, ki so ključne za stabilnost nastalih struktur. Nastajajo med kisikom karbonilne skupine (-CO-) in vodikomaminske skupine (-NH-), kar oblikuje **sekundarno strukturo proteinov**. Obstajata dve glavni vrsti: α -vijačnica in β -struktura. α -vijačnica je na videz paličasta struktura, ki je sestavljena iz tesno ovitega polipeptidnega ogrodja, iz katerega štrlijo stranske verige. V verigi so prisotne vodikove vezi, ki strukturo stabilizirajo. Vodikove vezi ležijo skoraj vzporedno z osjo vijačnice in omogočajo, da se ta raztegne. Raztezanje teh vezi v taki sekundarni strukturi je omejeno z njihovo močjo. V proteinih so prisotne α -vijačnice različnih dolžin. Rotacijska orientacija je lahko tako v smeri urinega kazalca (levo) kot nasprotno (desno), preferenčno je v proteinih zastopana rotacijska orientacija v desno.

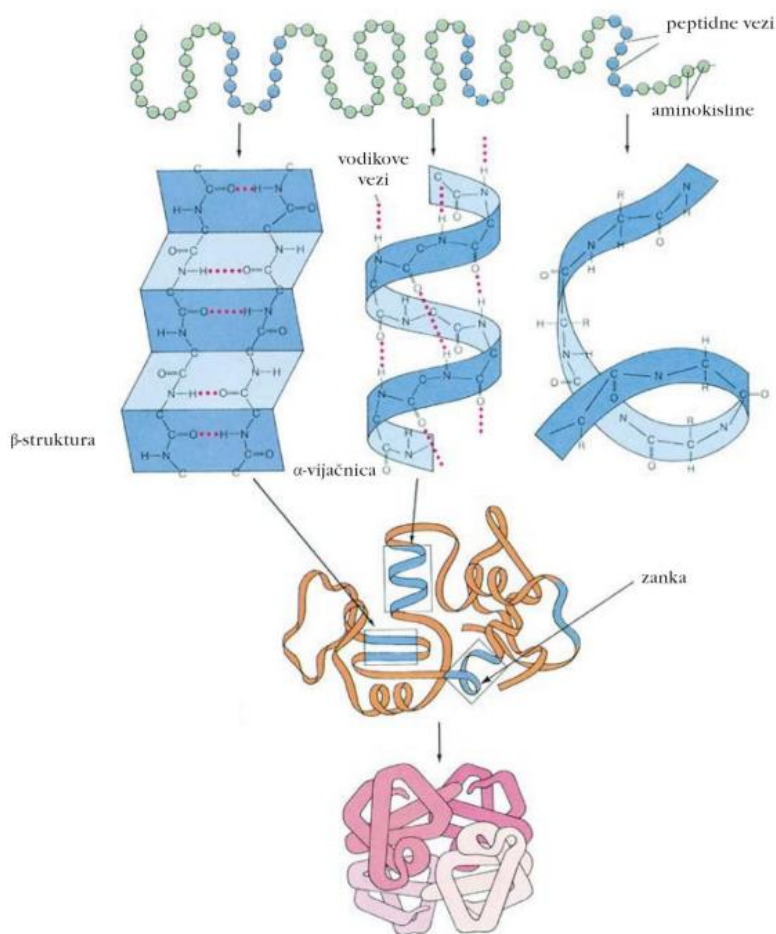
Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

β -struktura ima polipeptidno verigo iztegnjeno, vodikove vezi pa se lahko tvorijo med predeli iste verige ali med različnimi verigami s tako konformacijo (tridimenzionalno razporeditvijo atomov). Glede na usmerjenost ločimo paralelno (ima enako usmerjene polipeptidne verige) in antiparalelno (smer verig je nasprotno usmerjena).

Za spreminjanje smeri verig in povezovanje predelov urejenih sekundarnih struktur pa skrbijo zavoji (ang. turn) in zanke (ang. loop). Taki predeli zank so pogosto odgovorni za vezavo proteina z drugimi proteini in molekulami. Poznamo beta zavoj (beta turn), ki je najpogostejši, in omega zanko (omega loop). Beta zavoj sestavljajo tri aminokislino ali več in ga lahko najdemo v globularnih proteinih (protein okrogle oblike) ter je pomemben za stabilizacijo proteina. Omega zanka je sestavljena iz treh ali več aminokislin in ima obliko grške črke Ω . Je krožna struktura, ki se nahaja na koncu polipeptidne verige in omogoča interakcije med dvema deloma proteina.

Sile med funkcionalnimi skupinami aminokislin v zavutih in nagubanih delih polipeptidne verige določajo zapleteno **terciarno strukturo proteina**. Poleg šibkih vodikovih, ionskih in drugih vezi se med funkcionalnimi skupinami aminokislin namreč tvorijo tudi močnejše kovalentne vezi. Na tak način se lahko oblikujejo beljakovine s kroglasto ali nitasto terciarno strukturo. Proteini so lahko zgrajeni tudi iz več polipeptidnih verig, ki se takrat povezujejo v **kvartarno strukturo proteina**. Kvartarna struktura tako pomeni združitev več podenot v funkcionalen protein (npr. hemoglobin). (Tomažič idr., 2017) (Boyer, 2005) (Ravni proteinske strukture, 2010)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**



Slika 9: Štiri ravni proteinske strukture (vir: Temelji biokemije, 2005)

5 NEKOVALENTNE INTERAKCIJE PROTEINOV

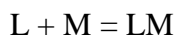
Molekularne interakcije so poglavitnega pomena za delovanje proteinov. Prav tako so poglavitnega pomena za patogenezo – nastanek in razvoj virusa, kot je SARS-CoV-2. Inhibicija interakcij raznih proteinov SARS-CoV-2 lahko prepreči okužbo in posledično potek bolezni. Z vidika razvoja zdravil je pomembno razumevanje, kako se interakcije tvorijo in kako spremembe aminokislin na tarčnem proteinu virusa vplivajo na nastanek novih interakcij. Slednje so lahko močnejše ali šibkejše in vplivajo na delovanje zdravila.

5.1 Molekularne interakcije in nekovalentne vezi

Nekovalentne vezi povezujejo biološke molekule med seboj, da lahko opravljajo določeno biološko nalogo. Najpomembnejše so van der Waalove vezi, ionske vezi, vodikove vezi in hidrofobne vezi. Po pravilih molekulskega prepoznavanja lahko molekule specifično

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

prepoznajo druge molekule in se z njimi povezujejo ter tvorijo komplekse. Pri tem gre pogosto za interakcije med majhno molekulo (ligandom – L) in makromolekulo (M), ki jo lahko izrazimo s spodnjo enačbo.



LM je kompleks s specifično biološko funkcijo, L in M pa sta med seboj povezana z nekovalentnimi vezmi. Za potek določenih reakcij se mora majhna molekula substrata na točno določen način povezati z makromolekulskim katalizatorjem (encimom).

Nekovalentne medmolekulske interakcije so relativno šibke, saj njihova energija niha med 1 in 30 kJ/mol (za primerjavo: energija kovalentne enojne vezi med ogljikovimi atomi je približno 350kJ/mol). Ena nekovalentna vez pogosto sama ni dovolj močna, da bi držala molekule skupaj, zato imajo DNK, RNK in proteinske molekule številne funkcionalne skupine, ki sodelujejo v nekovalentnih interakcijah, kar kompleks stabilizira.

Nekovalentne interakcije so reverzibilne, vezi pa se vzpostavijo, ko molekule (ali njihovi deli), ki se gibljejo, pridejo v neposreden stik. Molekule se gibljejo zaradi termičnega gibanja, zaradi tega pa se lahko vzpostavljene šibke vezi tudi pretrgajo. To se konstantno dogaja, dokler se ne vzpostavi dovolj vezi, da nastane kompleks, ki lahko sproži določen biološki proces. Vezava med molekulami je specifična, torej morata biti dve molekuli kompatibilni/komplementarni, da ju lahko stabilizacijske sile držijo skupaj. (Boyer, 2005)

5.2 Nekovalentne interakcije v proteinih

Vodikove vezi, ki se vzpostavijo med atomi posameznih aminokislinskih ostankov ali med atomi aminokislinskih ostankov in vodo, stabilizirajo strukturo proteinov. V jedru proteinske strukture prevladujejo hidrofobne interakcije, ki se vzpostavijo med aminokislinami z nepolarnimi stranskimi verigami in na ta način iz osrednjega dela izločijo vodo. Poleg tega proteinsko strukturo stabilizirajo tudi van der Waalsove vezi in ionske interakcije. (Boyer, 2005)

5.3 Vodikova vez

Vodikova vez je močna medmolekularna vez, ki nastane med vodikom, ki je vezan na enega izmed treh najbolj elektronegativnih atomov (fluor, kisik ali dušik), in fluorom, kisikom ali dušikom v sosednji molekuli. Med tema dvema atomoma mora biti razlika v

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

elektronegativnosti dovolj velika, da se vez lahko polarizira. Elektronegativnost je zmožnost atoma v molekuli, da k sebi pritegne elektrone. Funkcionalne skupine, ki sodelujejo pri nastanku vodikove vezi, so hidroksilna skupina alkoholov, organskih kislin in ogljikovih hidratov; karbonilna skupina aldehydov, ketonov, kislin, amidov in estrov; skupine N-H aminov in amidov. Vodikove vezi se lahko vzpostavijo tudi med nenabitimi skupinami ali med atomi, vključenimi v peptidno vez. Vodikova vez je vseprisoten element prepoznave v bioloških sistemih. Dolžina vezi je med 0,26 nm in 0,31 nm, (2,6–3,1 Å – enota Angstrom, ki je 10^{-10} m). Moč vodikove vezi je majhna, vendar je v bioloških molekulah navadno veliko število funkcionalnih skupin, ki se lahko povezujejo z vodikovimi vezmi. Številčnost vezi nadomesti primanjkljaj zaradi šibkosti posamezne vezi. Medmolekulska vodikova vez je lahko pomembna za stabilizacijo določene konformacije liganda. To je pomembno predvsem pri ligandih (zdravilih), ko se vežejo na biološko tarčo, saj takrat želimo čim večjo specifičnost vezave. V nasprotnem primeru lahko nespecifična vezava na druge proteine v telesu povzroči stranske učinke. (Molecular interactions, 2020) (Povezovanje delcev ..., 2016) (Graunar idr., 2019)

5.4 Van der Waalove vezi

Van der Waalove vezi povzročata neenakomerna razporeditev in gibanje elektronov v atomih molekul. Te vezi se vzpostavijo med molekulami s stalnimi ali induciranimi začasnimi dipoli, ki so posledica gibanja elektronov. Stabilizacijska energija je od 1 do 5 kJ/mol, vezi so pa dolge od 0,1 do 0,2 nm. Ločimo tri vrste; orientacijske (polarna + polarna molekula) – polarne molekule se v prostoru orientirajo tako, da se približajo nasprotnemu polu, ker se med seboj privlačijo; indukcijske (polarna + nepolarna molekula) – polarna molekula inducira polarizacijo nepolarne molekule, torej govorimo o privlačni sili med stalnim in kratkotrajnim dipolom; disperzijske (nepolarna + nepolarna molekula) – zaradi naključnega gibanja elektronov se nepolarna molekula lahko sama polarizira. (Košič, b. d.)

5.5 Hidrofobne interakcije

Hidrofobne interakcije so najpogostejše interakcije v kompleksih protein-ligand, najpogostejša hidrofobna interakcija pa je tista, ki jo tvorita alifatski ogljik v receptorju, torej ogljik, ki ni del aromatskega obroča, in aromatski ogljik v ligandu. Do njih pride, ko prisotnost vode sili nepolarne molekule, da se uredijo in izognejo stiku z vodo. Stabilizacijska energija je od 5 do 10 kJ/mol. Hidrofobni učinek je izraz, s katerim opišemo proces, med katerim hidrofobni

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

ligand poruši strukturo vode in zmanjša entropijo zaradi močnejšega vezanja in urejanja molekul vode okoli topljenca. Če se ligand in mesto vezi povežeta, se lahko nekatere molekule vode vrnejo v prej porušeno strukturo vode. (Molecular interactions, 2020)

5.6 Ionske vezi

Ionske vezi nastanejo med nabitimi atomi in skupinami. Sile med nabitimi atomi so ionske interakcije, in sicer se nasprotno nabiti ioni privlačijo, enako nabiti ioni pa se odbijajo. Stabilizacijska energija je približno 20 kJ/mol, torej so najmočnejše medmolekulske vezi, dolge so približno 0,25 nm. (Povezovanje delcev, 2016)

5.7 Solni mostovi

Solni mostovi so kombinacija vodikovih in ionskih vezi. Nastanejo med protoniranim aminom v ligandu (protonacija je dodajanje protona atomu, molekuli ali ionu) in specifičnim ostankom asparaginske kisline (α -AK, uporabljena v biosintezi beljakovin), zakopanim v membranski domeni receptorja GCPR (G protein-coupled receptors G – z beljakovinami sklopljeni receptorji G). Da se solni most lahko tvori, si morajo biti molekule dovolj blizu, da na njih lahko deluje elektrostatična privlačnost. (Molecular interactions, 2020)

5.8 Π -interakcije

Pri π -interakcijah gre za interakcije molekul s π -sistemi konjugiranih molekul (npr. benzen), prisotni pa so tudi pri aminokislinah (npr. tirozin).

Poznamo:

- interakcije π - π (med π -orbitalami molekularnega sistema – prisotne pri interakcijah nukleobaz);
- interakcije kation- π (med pozitivnim nabojem kationa in elektroni π -sistema molekule);
- interakcije anion- π (med negativnim nabojem aniona ter π -sistemom molekule, ki mu primanjkuje elektronov);
- interakcije polarna molekula- π (med molekulami s stalnim dipolom ter štiripolnim momentom π -sistema). (Nelson, 2008)

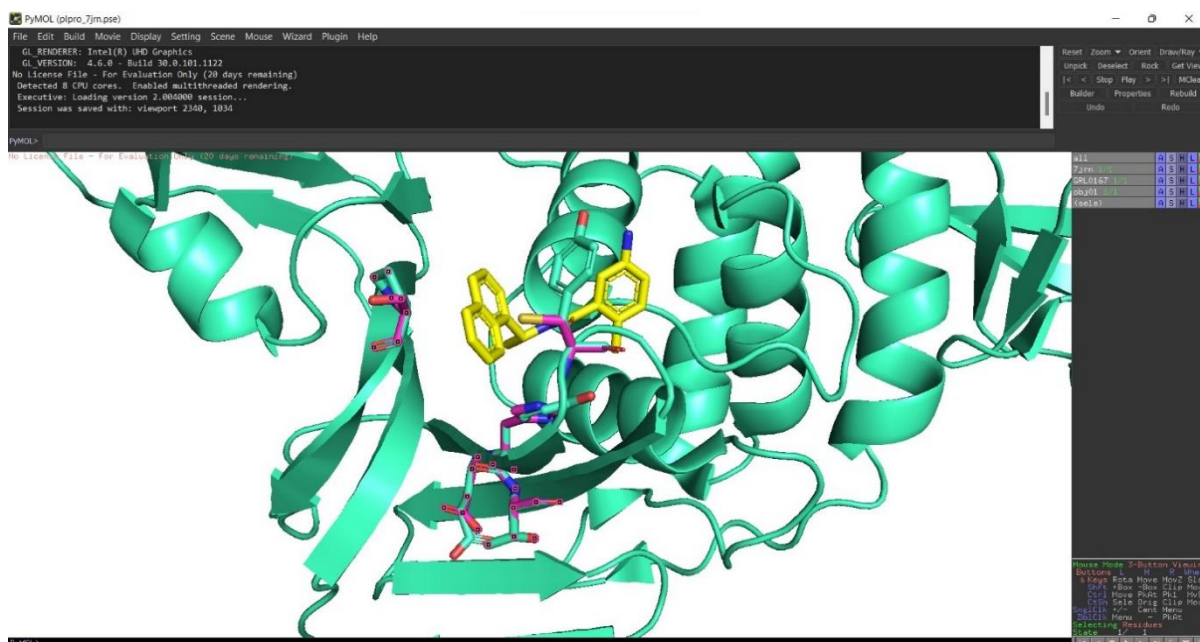
EMPIRIČNI DEL

V empiričnem delu naloge, ki smo ga opravile na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru in na domačih računalnikih s pomočjo računalniških programov, smo poiskale podatke o štirih terapevtskih tarčah oz. tarčnih proteinih, ki jih vsebuje SARS-CoV-2. Terapevtske tarče oziroma tarčni proteini so S-protein, PLpro, 3CLpro, RdRp. Sledil je podroben pregled literature in opazovanje molekul, s pomočjo česar smo odkrile mutacije na teh tarčah oz. proteinih in možnost vezave zdravil. Ta del smo preverile z vizualizacijo mutacij s pomočjo računalniškega programa PyMol. Prav tako smo s pomočjo uporabe spletnega strežnika izbrale mutacije, za katere vpliv na vezavo s terapevtskim protitelesom še ni znan. Naredile smo tudi popis mutacij na drugih tarčah oz. proteinih, za katere je vpliv nanje znan.

PYMOL

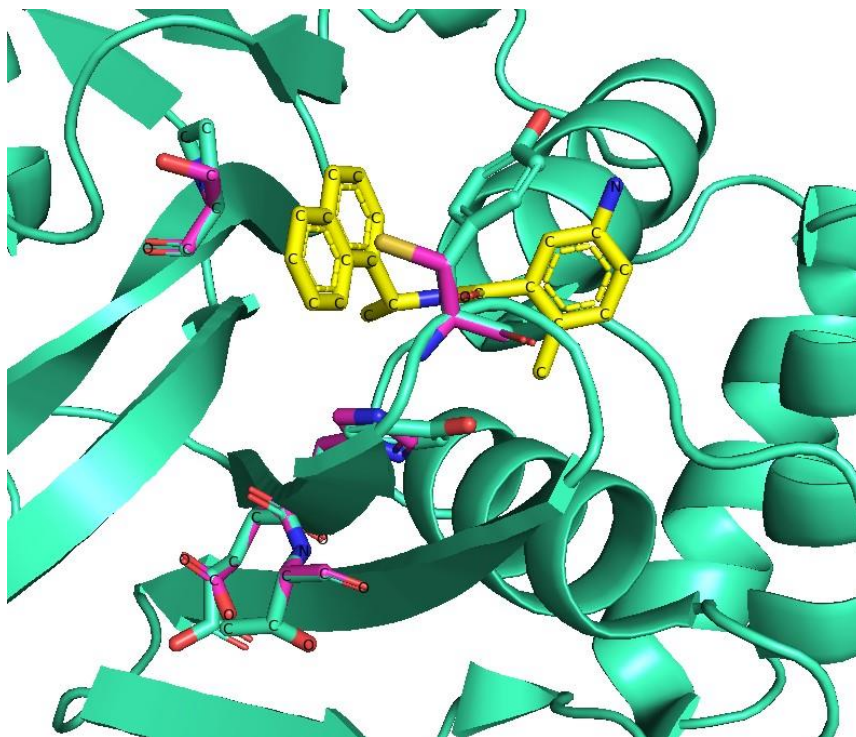
Računalniški program PyMol je sistem molekularne vizualizacije, ki nam omogoča vpogled v 3D-sliko majhnih molekul in bioloških makromolekul, kot so proteini. Je odprtokodno orodje, ki je na voljo za uporabo v strukturni biologiji. S pomočjo tega programa smo vizualizirale in podrobneje proučile mutacije na terapevtskih tarčah S-protein, PLpro, 3CLpro in RdRp ter njihove aminokisliline, s pomočjo katerih smo raziskale, ali je vezava virusa in zdravila možna. Orodje omogoča tudi vizualizacijo zelenih mutacij, kar omogoča vpogled v vpliv mutacije.

Raziskovalna naloga: Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil



Slika 10: Prikaz mutacije na terapevtski tarči PLpro v programu PyMol (vir: Saša Štajner)

Posameznim elementom je v programu dodeljena unikatna barva, lahko pa elemente označimo tudi z njihovimi simboli iz periodnega sistema elementov.



Slika 11: Prikaz mutacije na PLpro v programu PyMol (vir: Saša Štajner)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

ELEMENT	BARVA
C – ogljik	rožnata, zelena, rumena
O – kisik	rdeča
H – vodik	bela
N – dušik	modra
P – fosfor	oranžna

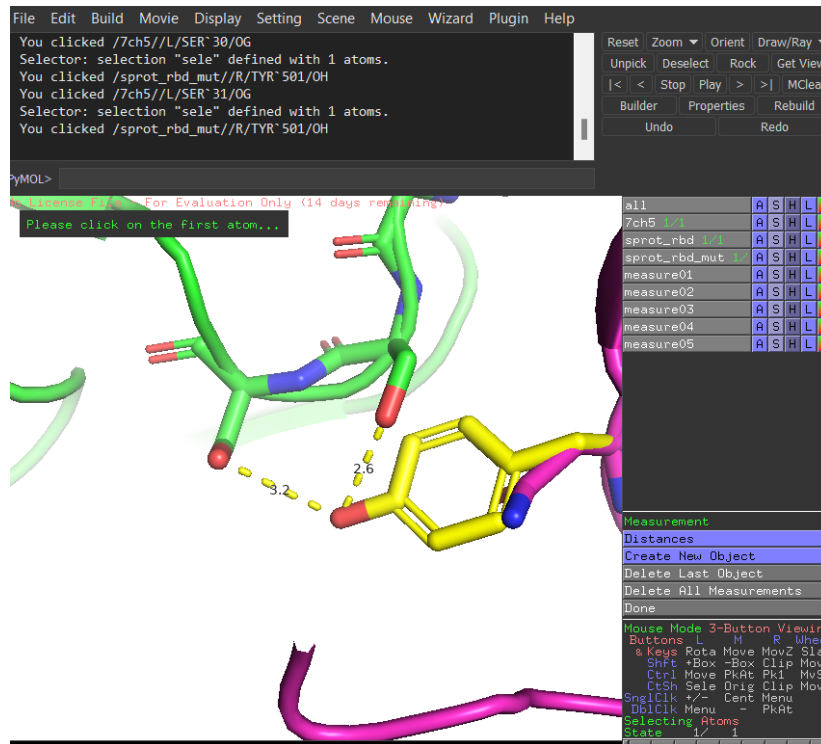
Tabela 2: Elementi in njihove barve v programu PyMol (vir: Saša Štajner)

S pomočjo posebnega vtičnika za program PyMol imenovan »Measure« smo v tem programu merile dolžino medmolekulske vezi. Glede na vrsto vezi, ki se je vzpostavila in na njeno energijo (glej spodnjo tabelo) smo določevale uspešnost oziroma neuspešnost vezave. Seveda je uspešnost odvisna tudi od števila medmolekulskih vezi – če je med mutiranim delom proteina ter protitelesom razdalja večja, je lahko vezava uspešna tudi, če je vezi več. Pri popisu smo se osredotočale na vodikove vezi prikazane v spodnji tabeli. Vezi se v programu PyMol merijo v enoti Angstrom (\AA), ki znaša 1.0×10^{-10} m.

The Hydrogen Bond Type	Energy (kJ/mol)
O–H.....N	29
O–H.....O	21
N–H.....N	13
N–H.....O	8

Tabela 3: Vrste vodikovih vezi in njihova elektronegativnost (The Hydrogen ..., b. d.)

Raziskovalna naloga: Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil



Slika 12: Primer merjenja vezave mutacije N501Y na protiteleso Tixagevimab
(vir: Saša Štajner)

Imena mutacij, ki jih bomo predstavile v nadaljevanju, so sestavljena iz treh delov.

S477N

Črka na začetku (S) predstavlja originalno, torej prvotno aminokislino, črka na koncu (N) pa mutirano aminokislino. Tri številke vmes pa ponazarjajo mesto, na katerem je mutacija potekla. V tem primeru je aminokislina serin mutirala v aminokislino asparagin na mestu 477. S pomočjo takih imen najlažje najdemo iskano mutacijo na kompleksnih proteinih.

6 Terapevtska tarča S-protein

6.1 Struktura

S-protein (imenovan tudi spike protein, protein S ali koničasti protein) je z velikostjo 180–200 kDa (kilodalton – enota za molekularno maso bioloških makromolekul, kot so proteini) najden na površju virusov. Sestavljen je iz zunajceličnega konca, transmembranske domene in kratkega znotrajceličnega končnega dela. Običajno je v metastabilni konformaciji, kar pomeni, da se nanaša na tridimenzionalno strukturo, ki jo virusna ovojnica prevzame, preden

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

se spoji z membrano gostiteljske celice. Ta struktura velja za metastabilno, saj obstaja v več stanjih in naj bi imela ključno vlogo v začetnih fazah vstopa virusa v gostiteljske celice. Ko virus vstopi v interakcijo z gostiteljsko celico, pride do obsežne strukturne preureditve S-proteina, kar omogoči, da se virus zlije z membrano gostiteljske celice. Bodice so prevlečene s polisaharidnimi molekulami, ki se maskirajo in se tako izognejo nadzoru gostiteljevega imunskega sistema med vstopom v organizem. (Huang idr., 2020) (Zhang idr., 2021)

6.2 Funkcije

S-protein na površini virusa je ključni dejavnik pri okužbi, saj gre za protein, ki koronavirusu omogoči, da prodre v človeške celice in se razmnožuje, kar povzroča bolezen. Gre za trimerni glikoprotein. Podobno kot pri drugih koronavirusih protein S virusa SARS-CoV-2 posreduje pri prepoznavanju receptorjev, pritrjevanju na celice in združevanju med virusno okužbo.

Trimer S-proteina, ki se nahaja na površini virusne ovojnice, je osnovna enota, s katero se S-protein veže na receptor. Domena S1 vsebuje RBD (receptor-binding domain), ki je v glavnem odgovorna za vezavo virusa na receptor, medtem ko domena S2 vsebuje domene, ki so tesno povezane s sintezo virusa. S-protein se veže na gostiteljsko celico tako, da prepozna človeški receptor ACE2 (angiotenzinska konvertaza 2). Ta je razširjen predvsem v pljučih, črevesju, srcu in ledvicah ljudi. Je tudi znan receptor za virus SARS-CoV-2. Poleg vezave na receptorje lahko S-protein virusu pomaga pri utišanju imunskega odziva telesa in pri preprečevanju ustvarjanja protiteles. Ob primeru mutacij v S-proteinu pa lahko te vodijo do sprememb v funkcijah proteina in prispevajo k evoluciji virusa. (Huang idr., 2020)

6.3 Potencialna zdravila, usmerjena na S-protein

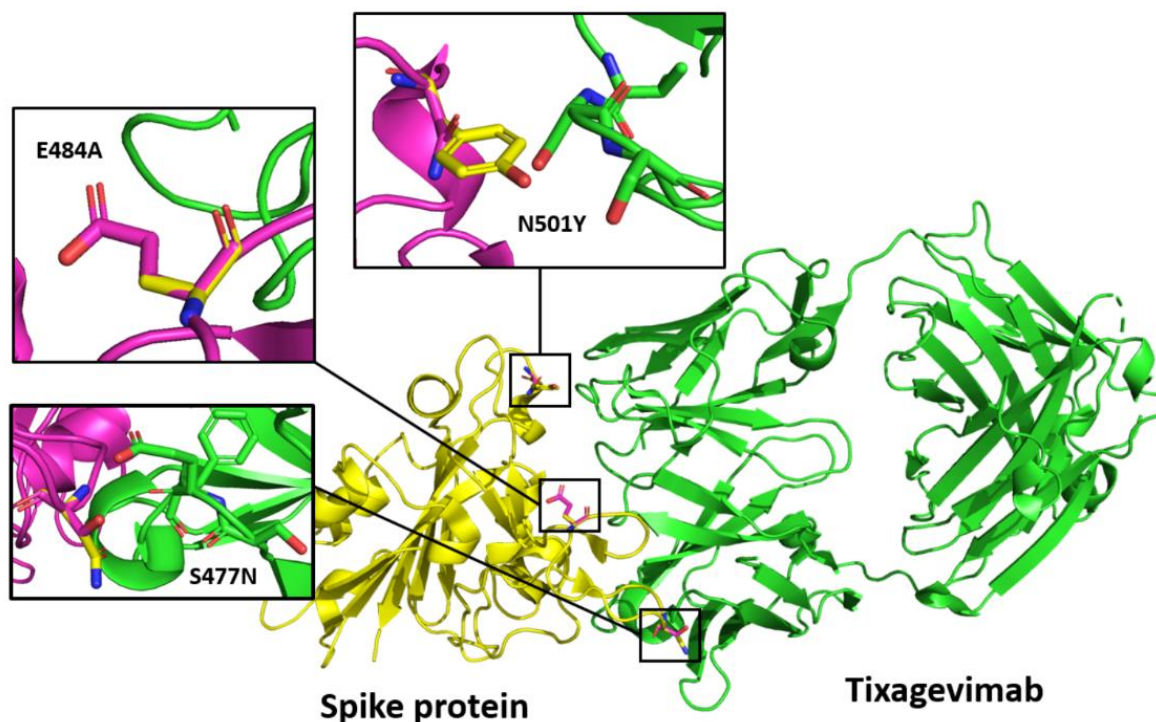
Ker je S-protein specifičen za vsak tip virusa, se raziskave usmerjajo na razvoj zdravil, ki tarčno delujejo nanj. Potencialno vrsto zdravil predstavljajo nevtralizirajoča protitelesa (specifična protitelesa, ki zagotavljajo zaščito pred okužbo, vendar sčasoma, odvisno od imunskega sistema posameznika, izginejo). Ti se vežejo na S-protein in preprečijo, da bi se virus vezal na gostiteljsko celico. Druga potencialna vrsta zdravil so inhibitorji. To so molekule, ki se vežejo na S-protein in onemogočijo interakcijo z gostiteljsko celico. Tretja potencialna vrsta zdravil so protivirusna zdravila, ki delujejo na celični ravni in zavirajo delovanje virusa v celici tako, da se virus ne more razmnoževati. V času pandemije COVID-19 smo dobili na voljo več cepiv, med katerimi so bila nekatera tudi na osnovi mRNK. Takšna cepiva ne vsebujejo oslavljenih

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

ali inaktiviranih virusov, temveč genetske informacije mRNK z navodili, kako ustvariti kopije S-proteina. Cepiva telesu dajo navodilo, da ustvari S-proteine, na katere naš imunski sistem odgovori in s tem pridobimo protitelesa, kar nas ščiti ob prihodnjih okužbah. (Huang idr., 2020) (Kako nas cepiva ..., 2021) (Jaklič, 2021)

6.3.1 Slika mutacij na S-proteinu

Slika prikazuje vezavo terapevtske tarče S-protein (označen z rumeno barvo) na protitelo Tixagevimab/Cilgavimab (označeno z zeleno barvo), ki je kombinacija dveh človeških protiteles. Pregledovale smo zmožnost in učinkovitost vezave protitelesa na tri mutacije na S-proteinu, in sicer N501Y, E484A in S477N.

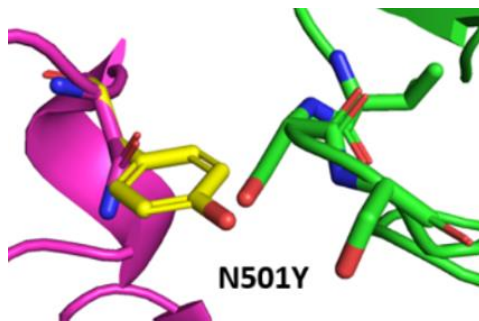


Slika 13: Mutacije na S-proteinu (vir: Sebastjan Kralj)

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

6.3.2 Opis vpliva mutacij na delovanje nevtralizirajočega protitelesa Tixagevimab

N501Y



Slika 14: Mutacija N501Y na S-proteinu (vir: Zara Bertalanič)

Pri mutaciji N501Y asparagin (N) mutira na zaporednem mestu 501 v tirozin (Y).

Pri tem se vzpostavi vodikova vez O-H.....O na razdalji $\sim 2,2$ Å. Prej je bila na tem mestu pri prvotni aminokislini prisotna vodikova vez N-H.....O na razdalji 4,3 Å. Iz tega lahko sklepamo, da bo zdaj vezava s protitelesom boljša, ker je razdalja primernejša (krajša je razdalja, močnejša je vodikova vez). Dolžina vodikove vezi se običajno meri z razdaljo med donorskim (nukleofil) in akceptorskim (elektrofil) atomom, seveda pa obstaja spodnja meja, na kateri se atomi odbijajo, saj velja Paulijevo izključitveno pravilo, ki pravi, da dva atoma ne morata soobstajati na istem mestu ob istem času.

Ugotovile smo, da je ta vezava uspešna, kar se kaže kot uspešnost zdravila za to mutacijo.

S477N



Slika 15: Mutacija S477N na S-proteinu (vir: Zara Bertalanič)

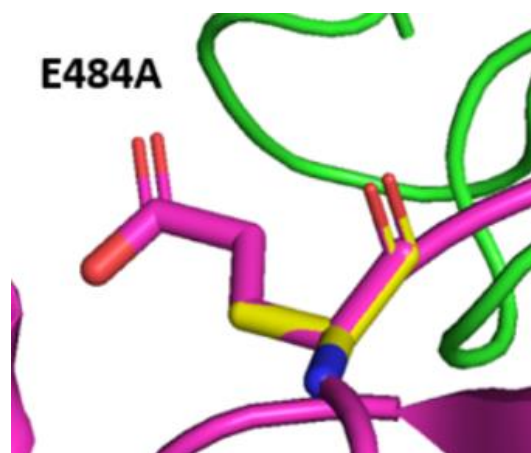
Pri mutaciji S477N serin (S) mutira na zaporednem mestu 477 v asparagin (N).

Raziskovalna naloga: Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil

Pred mutacijo, torej na nemutiranem proteinu, je bila prisotna vez O-H.....O. Zdaj se lahko na novo vzpostavi vodikova vez N-H.....O na razdalji približno 4,1 Å. Asparagin (N), prisoten pri mutirani varianti, ima prosto N- in O-skupino na repu aminokislina, ki se ob pravilni orientaciji lahko poveže s katerimi od aminokislin proteina.

Mutacija lahko na vezavo s protitelesom vpliva ugodno, kar pomeni da je nevtralizirajoče protitelo učinkovito.

E484A



Slika 16: Mutacija E484A na S-proteinu (vir: Zara Bertalanič)

Pri mutaciji E484A glutaminska kislina (E) mutira na zaporednem mestu 484 v alanin (A). Mutacija v alanin povzroči manjšo reaktivnost proteina na tistem mestu. Tudi če se proteinska zanka zasuka v ugoden položaj, bo vezava šibkejša, ker ima alanin zgolj metilno funkcionalno skupino (CH₃), ki je manj reaktivna. To je v našem primeru slabo, saj želimo čim močnejšo vezavo s protitelesom, kar bi povzročilo, da manj virusa okuži človeški receptor ACE2. V tem primeru gre za neugodno vezavo, torej protitelo za to mutacijo ne bi bilo učinkovito.

7 Terapevtski tarči 3CLpro in PLpro

SARS-CoV-2 kot virus s pozitivno verigo RNK kodira dve funkcionalni proteazi. Proteaza je encim, ki razgrajuje beljakovine v manjše polipeptide ali posamezne aminokislina in spodbuja nastanek novih beljakovinskih izdelkov. V primeru SARS-CoV-2 je to papainu podobna proteaza – papain-like protease (PLpro) in 3-kimotripsinu podobna cisteinska proteaza – 3-chymotrypsin-like protease (Mpro ali 3CLpro).

7.1 3CLpro

7.1.1 Funkcija

Virusni encim 3-kimotripsinu podobna cisteinska proteaza (3CLpro) nadzoruje razmnoževanje koronavirusa in je bistvenega pomena za njegov življenjski cikel. 3CLpro je potencialna tarča za odkrivanja zdravil v primeru koronavirusa hudega akutnega respiratornega sindroma (SARS-CoV). Raziskave na tej tarči segajo že v čas prve epidemije SARS-CoV iz leta 2003.

7.1.2 Struktura

Virusni encim je polipeptid, ki je sestavljen iz 306 aminokislin in je kategoriziran kot stabilna, hidrofilna molekula. 3CLpro je sestavljen iz treh domen. Domena I (ostanki 8–101 aminokislin) in domena II (ostanki 102–184 aminokislin) imata antiparalelno β -cevnno strukturo, to je strukturo, ki obsega štiri strukture peptidne vezi iz dveh β -verig. Domena III (ostanki 201–303 aminokislin) vsebuje pet α -vijačnic, povezanih z domeno II.

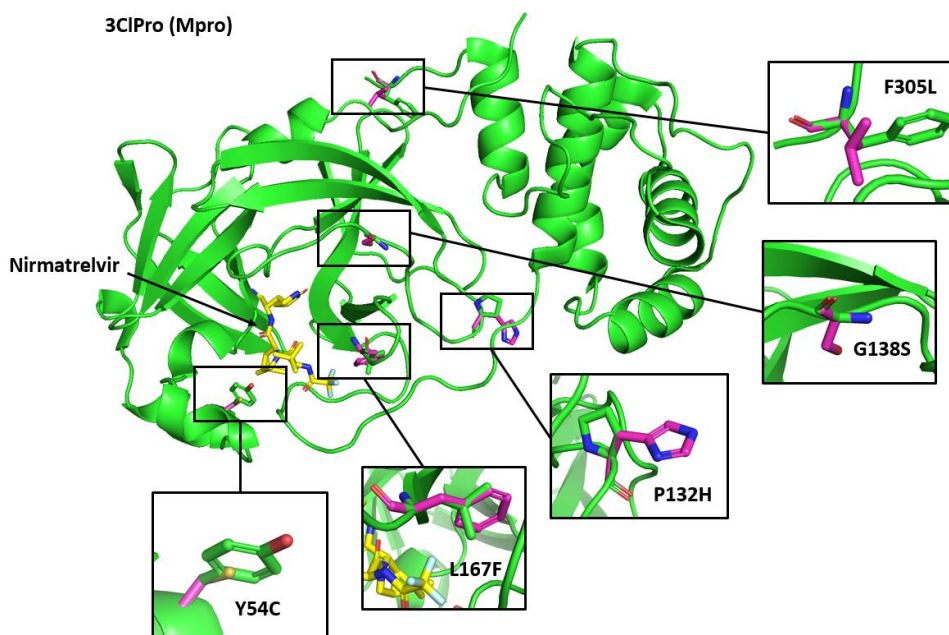
7.1.3 Zaviralci delovanja

Podatki o kristalni strukturi kažejo, da se lahko potencialna zdravila vežejo na vezavno mesto SARS-CoV-2 3CLpro. Raziskave so pokazale, da zdravila, kot so Ebselen, Disulfiram, Tideglusib, Carmofur, Šikonin in PX-12, uspešno zavirajo aktivnost SARS-CoV-2 Mpro. (Fu idr., 2021)

7.1.4 Slika mutacij na 3CLpro

Slika prikazuje povezavo terapevtske tarče 3CLpro na protivirusno zdravilo, ki ga je razvil Pfizer in je aktivni zaviralec 3CLpro. Prav tako je del kombinacije Nirmatrevil/Ritonavir, ki se uporablja za zdravljenje COVID-19. Označenih je pet najpogostejših mutacij na 3CLpro.

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**



Slika 17: Mutacije na 3CLpro (Mpro) (vir: Sebastjan Kralj)

7.1.5 Opis vpliva mutacije na delovanje proteina

Mutacija F305L (fenilalanin mutira v levcin) se nahaja izven vezavnega mesta in verjetno nima neposrednega vpliva na vezavo Nirmatrelvira. Tudi mutaciji G138S (glicin mutira v serin) in P132H (prolin mutira v histidin) iz istega razloga naj ne bi imeli direktnega vpliva na vezavo, ker pa sta ti mutaciji bližje vezavnemu mestu, lahko vplivata na prestrukturiranje vezavnih zank, ki so prisotne v bližini, in prek tega vplivata na vezavo. Mutacija Y54C (tirozin mutira v cistein) lahko povzroči prostorsko oviranje vezave, saj je tirozin večja aminokislina kot cistein, obe pa omogočata tvorbo vodikove vezi. Pri mutaciji L167F (levcin mutira v fenilalanin) lahko večja aminokislina fenilalanin z aromatskim obročem ovira vezavo z Nirmatrelvirom. (SARS-CoV-2 3CLpro mutations ..., 2022)

7.2 PLpro

7.2.1 Funkcija

Čeprav je primarna funkcija PLpro in Mpro usklajena obdelava, cepljenje in zorjenje virusnega poliproteina, ima PLpro dodatno funkcijo odstranjevanja ubikvitina (eden od razredov encimov z deubikvitinacijskim delovanjem na beljakovine) in ISG15 (ubikvitinu podobnega proteina) iz beljakovin gostiteljske celice, kar koronavirusom pomaga pri izogibanju prirojenim

Raziskovalna naloga: Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil

imunskim odzivom gostitelja. Ciljanje na PLpro s protivirusnimi zdravili ima v tem pogledu prednost ciljanja na več funkcij patogeneze (načina razvoja bolezni). (Mesecar idr., 2014)

7.2.2 Struktura

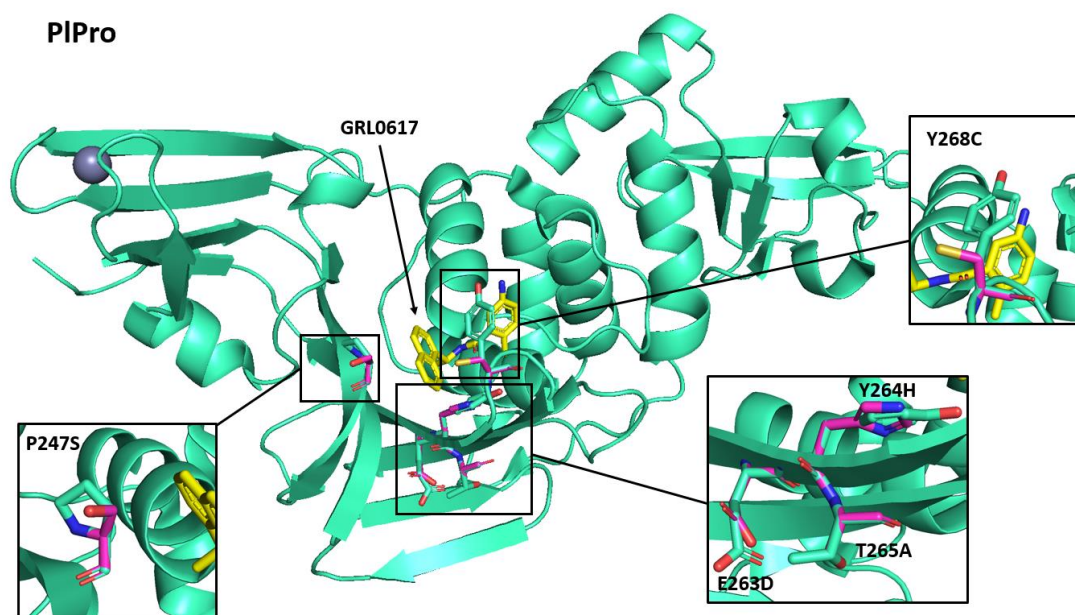
PLpro je ena od osmih domen nestrukturnega proteina 3, ki je največji med nestrukturnimi proteini SARS-CoV-2. PLpro je sestavljen iz 315 aminokislin. Splošna struktura je podobna strukturi človeških deubikvitinacijskih encimov (npr. za ubikvitin specifične proteaze-USP), vendar so njihova zaporedja in strukture dovolj različni, da omogočajo razvoj specifičnih zaviralcev na PLpro. (Ullrich, Nitsche, 2022)

7.2.3 Zaviralci

Glede na to, da imata domeni SARS-CoV in SARS-CoV-2 PLpro največ skupnih strukturnih značilnosti, imajo zaviralci, razviti za SARS-CoV PLpro, dobre možnosti, da bodo učinkoviti pri SARS-CoV-2 PLpro. GRL0617 je eden najučinkovitejših zaviralcev SARS-CoV PLpro. (Zhao idr., 2022)

7.2.4 Slika mutacij na PLpro

Slika prikazuje povezavo terapevtske tarče PLpro na njegov selektivni zaviralec GRL0617, ki je ena prvih odkritih spojin ki na PLpro deluje zaviralno. Označenih je pet najpogostejših mutacij na PLpro.



Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

Slika 18: Mutacije na PLpro (vir: Sebastjan Kralj)

7.2.5 Opis vpliva mutacij na delovanje proteina

Na sliki je označenih pet mutacij, ki jih je treba spremljati in vključiti v postopek načrtovanja zdravil. Mutacija P247S (prolin mutira v serin) lahko vpliva na vezavo GRL0617 prek prerazporeditve zanke vezavnega mesta, ker je prolin pogosto prisoten v zankah, kar se ob prisotnosti serina lahko podre. Mutacija E263D (glutamat mutira v aspartat) ne vpliva bistveno na vezavo, ker imamo v obeh primerih negativno nabito aminokislino z enakimi funkcionalnimi skupinami, krajša je zgolj dolžina. Pri mutaciji T265A (treonin mutira v alanin) se verjetno izgubi del potenciala za vezavo, saj ima alanin zgolj metilno funkcionalno skupino. Mutacija Y264H (tirozin mutira v histidin) verjetno bistveno vpliva na vezavo, ker je tirozin na tem mestu ključen za vezavo z GRL0617. Nezmožnost histidina, da tvori identično vodikovo vez, lahko močno vpliva na vezavo. Mutacija Y268C (tirozin mutira v cistein) vpliva negativno na vezavo z inhibitorjem GRL0617, saj se poruši interakcija π - π z aromatskim obročem GRL0617. (Fu idr. 2022)

8 Terapevtska tarča RdRp

8.1 Funkcija

Od RNK odvisna RNK polimeraza – RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) je encim RNK-virusov, ki je ključen pri kopiranju genomov ter genskem prepisovanju. Ta dejavnost omogoči širjenje virusa ter okužbo novih gostiteljskih celic. Pri katalizi sodelujejo ohranjeni aspartati (neesencialne aminokisliline ASP) ter dvovalentni kovinski ioni. RdRp je prisoten tudi v koronavirusu SARS-CoV-2, ki povzroča COVID-19. (Selvarajan idr., 2018) (Aftab idr. 2020)

8.2 Struktura

Čeprav se zaporedja RdRp spreminjajo, so njihove strukturne značilnosti vedno enake. RdRp so proteini z več domenami (specifična fizična regija ali aminokislinsko zaporedje v proteinu, povezano z določeno funkcijo ali ustreznim segmentom DNK). Povprečna dolžina jedrne RdRp domene je manj kot 500 aminokislin. Te so vključene v polimerizacijo, vstop nukleozid

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

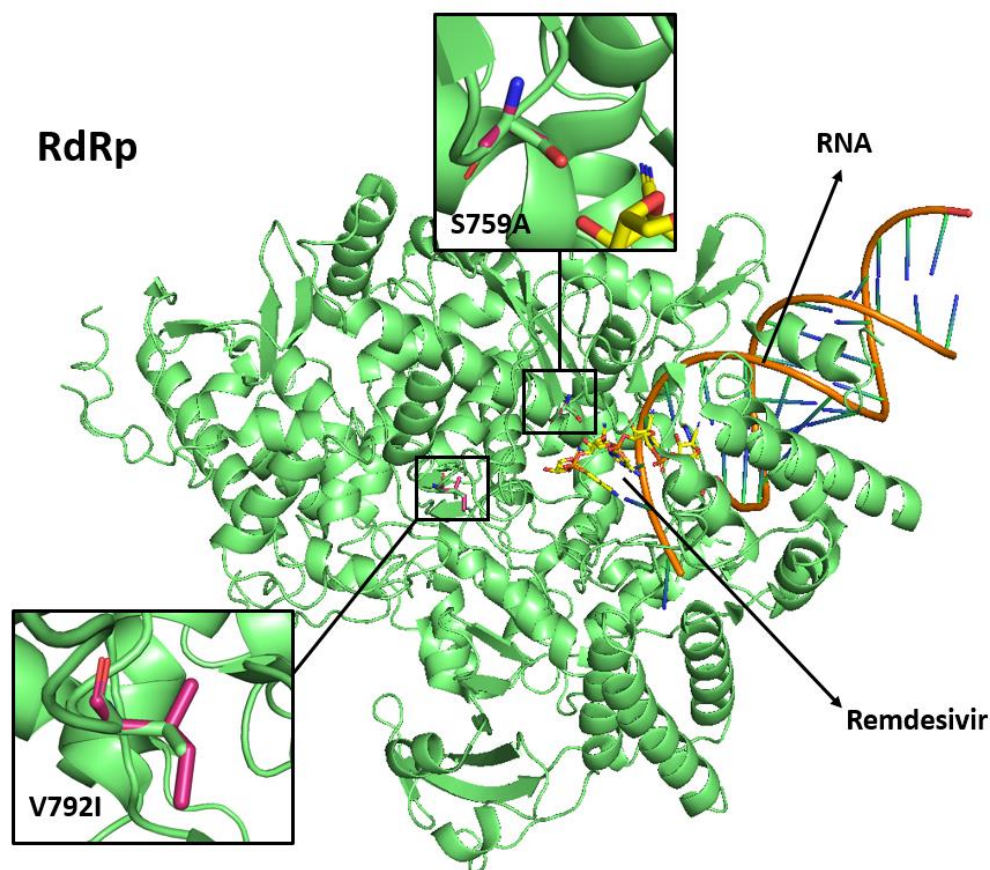
trifosfata – NTP (molekula, sestavljena iz nukleozida (dušikova baza vezana s sladkorjem) in treh fosfatov, ki sprošča energijo). (Selvarajan idr., 2018) (Aftab idr. 2020)

8.3 Potencialna zdravila, usmerjena na RdRp

Remdesivir (RDV) je nukleozidni analog (spojina, ki oponaša naravno prisotne nukleozide) in je odobren za zdravljenje COVID-19, učinkuje pa tudi proti mnogim drugim RNK-virusom. Deluje preko inhibicije RNK-sinteze. (Baric idr., 2022)

8.4 Slika mutacij na RdRp

Slika prikazuje povezavo terapevtske tarče RdRp na protivirusno zdravilo širokega spektra remdesvir, ki se aplicira z injekcijo v veno. Prodaja se pod blagovno znamko Veklury. Označeni sta dve najpogostejši mutaciji na RdRp.



Slika 19: Mutacije na RdRp (vir: Sebastjan Kralj)

8.5 Opis vpliva mutacij na delovanje proteina

Strukturna analiza SARS-CoV-2 RdRp z mutacijami S759A in V792I v programu PyMol je pokazala odpornost na remdesivir. S759A (serin mutira v alanin) je bila locirana na RdRp katalizni S759D. Odsotnost kisika lahko v tem primeru povzroči manjšo afiniteto vezave, ker se vzpostavi ena vodikova vez manj. V792I (valin mutira v izolevcin) je bila locirana v bližini strukturnega elementa polimeraze, ki je pomemben za vključevanje nukleozid trifosfata. Ob mutaciji lahko pride do prostorskega oviranja, ker aminokislina izolevcin zasede več prostora. Iz tega sklepano, da je vezava remdesivirja slabša ob prisotnosti mutacij. (Baric idr., 2022)

9 UGOTOVITVE IN ZAKLJUČEK

Med pisanjem raziskovalne naloge smo usvojile razumevanje biokemije virusov in njihovih mutacij ter vpliv mutacij na razvoj zdravil. Podrobneje smo se seznanile z lastnostmi virusov in njihovo zgradbo. Spoznale smo tudi program PyMol, ki nam je omogočil še vizualni vpogled v možne interakcije mutacij. Seznanile smo se z vrstami nekovalentnih vezav ter z njihovim pomenom. Raziskovalna naloga nam je predvsem omogočila razširitev znanja na področju biotehnologije in medicine.

Predstavljamo ugotovitve, povezane z zastavljenimi hipotezami.

H1: Virus ni statičen patogen in se med razmnoževanjem spreminja.

Hipoteza je **POTRJENA**, saj se virusi med razmnoževanjem v gostitelju spreminjajo in pri tem nastajajo mutacije. Zaradi nastanka mutacij med razmnoževanjem virusi niso statični. Nastanek več mutacij privede do nastanka novih virusnih variant, ki imajo med seboj različne aminokisliline v proteinih, ki opravljajo isto funkcijo. Hipotezo smo potrdile z opazovanjem različnih mutacij na isti terapevtski tarči oz. proteinu SARS-CoV-2.

H2: Pojav virusnih variant je povezan z velikostjo populacije, v kateri se patogen razmnožuje.

Hipoteza je prav tako **POTRJENA**. Pojav virusnih variant je povezan z velikostjo populacije, v kateri se patogen razmnožuje. Čim večja je populacija, v kateri se patogen razmnožuje, tem večja je populacija virusa in večja je verjetnost za mutacije in nastanek variant. To se opazi pri pandemiji SARS-CoV-2, pri katerem se je v zelo kratkem času pojavilo veliko virusnih variant (npr. alfa, beta, delta in omikron).

H3: Virusne variante bistveno ne vplivajo na razvoj zdravil.

Hipoteza je **OVRŽENA**.

Pri pregledu mutacij virusnih variant smo pokazale, da le-te vplivajo na vezavo z zdravili, kar vpliva na razvoj zdravil.

To smo lahko opazili tudi v praksi, saj smo se kljub cepljenju lahko okužili s koronavirusom, ker cepivo ni bilo prilagojeno vsem virusnim variantam, pri katerih so prisotne razlike v S-proteinu. Prav prisotnost cepiva in prisotnost odpornosti lahko selekcijsko deluje na virusno

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

populacijo in povzroči, da so variante z odpornostjo na protitelesa, ki so nastala pri cepljenju, bolj uspešna.

H4: Vsi selektivni in aktivni zaviralci ne zavirajo delovanja izbranih terapevtskih tarč SARS-CoV-2.

Tudi ta hipoteza je POTRJENA. V eksperimentalnem delu, v katerem smo proučile vpliv mutacij tarčnih proteinov, smo dokazale, da lahko pojav mutacij vpliva na vezavo in učinkovitost potencialnih zdravil oziroma zaviralcev virusa. S pomočjo popisa vseh izbranih mutacij smo prišle do zaključka, da vsi selektivni in aktivni zaviralci ne zavirajo delovanja izbranih terapevtskih tarč. To smo lahko zasledile v primeru terapevtske tarče RdRp, pri kateri remdesivir ni imel uspešne vezave na nobeno izmed mutacij.

Z raziskovalno nalogo smo postavile temelje za nadaljnji razvoj zdravil, ki bi potencialno znatno pripomogla tako k zmanjšanju števila okužb s SARS-CoV-2 kot k zagotovitvi izboljšanje zdravljenja okužb s SARS-CoV-2. Popisale smo le najpogostejše mutacije, nadaljnje raziskovanje bi pa lahko omogočilo popis vseh mutacij SARS-CoV-2.

Med raziskovanjem pa smo naleteli tudi na nekaj omejitev, ker je koronavirus novejša tema in zaradi tega še ni mnogo obstoječih virov, ki bi na laičen način obravnavali to tematiko, sploh v slovenščini.

Kljub temu nam je bilo pisanje o tej temi zelo všeč, zato bomo z raziskovanjem nadaljevale še naslednje leto in se, upamo, še bolj približale novim spoznanjem o zdravilih za to zahrbtno bolezen.

10 VIRI IN LITERATURA

10.1 Slike

1. *Reproduction of viruses.* (marec 2020). Mondoscience.
<https://www.mondoscience.com/blog/virus-replication> [povzeto 6. 12. 2022]
2. *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein.* (avgust 2020). Pubmed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747721/#&gid=article-figures&pid=fig-2-uid-1>
[povzeto 6. 12. 2022]
3. *SARS-CoV-2 virus mutations and variants.* (januar 2021). World health organisation.
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/risk-comms-updates/update47-sars-cov-2-variants.pdf?sfvrsn=f2180835_4 [povzeto 6. 12. 2022]
4. *Biosinteza DNA in RNA: podvojevanje in prepisovanje DNA.* (april 2014). Point mutations.
https://studentski.net/gradivo/ulj_fkt_bi1_tbi_sno_biosinteza_dna_in_rna_01_podvajanje_in_prepisovanje_dna [povzeto 6. 12. 2022]
5. *Aminokislina.* (april 2020). Wikipedia: The Free Encyclopedia.
<https://sl.wikipedia.org/wiki/Aminokislina> [povzeto 3. 12. 2022]
6. *Proteini.* (marec 2013). Biokemija in Molekularna biologija.
https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemija_in_Molekularna_biologija_2014.pdf
[povzeto 6. 12. 2022]
7. Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije.* Študentska založba. Str. 70
8. *Transcription and Translation.* (b. d.). Translation: DNA to mRNA to Protein.
<https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393/>
[povzeto 9. 12. 2022]
9. Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije.* Študentska založba. Str. 85

10.2 Viri in literatura vsebine

- (1) Koren, S., Avšič Županc, T., Drinovec, B., Marin, J., Poljak., M. (2011). *Splošna medicinska virologija.* Medicinski razgledi: Ljubljana. (Str. 24-25)
- (2) Ludwig, S., Zarbock, A. (2020). *Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview.*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7173023/> [citirano: 4. 12. 2022]
- (3) *COVID-19 Vaccine & Therapeutics Tracker* (2022). <https://biorender.com/covid-vaccine-tracker> [citirano: 4. 12. 2022]
- (4) Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., Liu, S. (2020) *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19.*
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747721/> [citirano: 4. 12. 2022]

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

- (5) *TYPES OF MUTATIONS* (2022). <https://openoregon.pressbooks.pub/mhccbiology102/chapter/7-4-what-kinds-of-gene-mutations-are-possible/> [citirano: 4. 12. 2022]
- (6) *Tracking SARS-CoV-2 variants* (2020). <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> [citirano: 4. 12. 2022]
- (7) Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., Phalke, S., Velu, G. S. K. (2022) *SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.815389/full> [citirano: 4. 12. 2022]
- (8) Tomažič, I., Zidar, P., Dolec Koce, J., Ambrožič Avguštin, J. (2017). *Biologija 1: O biologiji, celicah in genetiki*. Mladinska knjiga: Ljubljana. Str. 40-42
- (9) Tomažič, I., Zidar, P., Dolec Koce, J., Ambrožič Avguštin, J. (2017). *Biologija 1: O biologiji, celicah in genetiki*. Mladinska knjiga: Ljubljana. Str. 138-139
- (10) Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije*. Študentska založba. Str. 70, 71
- (11) Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije*. Študentska založba. Str. 84, 85
- (12) Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije*. Študentska založba. Str. 97-110
- (13) *Ravni proteinske strukture*. (2010). http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Ravni_proteinske_strukture [citirano: 4. 12. 2022]
- (14) *Sinteza proteinov*. (2010) http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Sinteza_proteinov [citirano: 3. 1. 2023]
- (15) Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije*. Študentska založba. Str. 49-51
- (16) *Molecular interactions*. (2020). https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular_interactions.html [citirano 27. 12. 2022]
- (17) *Povezovanje delcev: Vodikova vez: Nastanek vodikove vezi*. *Kemija 1*. (2016) <https://eucbeniki.sio.si/kemija1/573/index5.html> [citirano 24. 2. 2023]
- (18) Graunar M., Podlipnik, M., Cvirn Pavlin, T. (2019). *Kemija za gimnazije 3, učbenik za organsko kemijo*. DZS.
- (19) Košič, D. *Molekulske sile*. https://si.openprof.com/wb/molekulske_vezi?ch=624 [citirano 2. 1. 2023]
- (20) *Povezovanje delcev: Ionska in kovalentna vez: Nastanek ionske vezi*. *Kemija 1*. (2016). <https://eucbeniki.sio.si/kemija1/1666/index1.html> [citirano 2. 1. 2023]

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

- (21) Nelson, Cox. (2008). *Lehninger Principles of biochemistry: Fifth edition*. W.H. Freeman and Company.
- (22) Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., Liu, S. (2020). *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19*. <https://www.nature.com/articles/s41401-020-0485-4> [citirano 30. 1. 2023]
- (23) Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., Chen, B. (2021). *Structure of SARS-CoV-2 spike protein*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8423807/> [citirano 30. 1. 2023]
- (24) *Kako nas cepiva na osnovi mRNA zaščitijo pred covidom-19*. (2021) <https://vaccination-info.eu/sites/default/files/documents/MRNA-vaccine-infographic-SL.pdf> [citirano 30. 1. 2023]
- (25) Jaklič, T. (2021). *Kaj nam pove test na protitelesa in česa ne*. <https://www.delo.si/razno/kaj-nam-pove-test-na-protitelesa-proti-novemu-koronavirusu-in-cesa-ne/> [citirano 30. 1. 2023]
- (26) Ullrich, S., Nitsche, C. (2022) *SARS-CoV-2 Papain-Like Protease : Structure, Function, and Inhibition*. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.202200327> [citirano: 4. 12. 2022]
- (27) Fu, Z., Huang, B., Tang, J., Liu, S., Liu, M., Ye, Y., Liu, Z., Xiong, Y., Zhu, W., Cao, D., Li, J., Niu, X., Zhou, H., Zhao, Y. J., Zhang, G, Huang, H. (2021) *The complex structure of GRL0617 and SARS-CoV-2 PLpro reveals a hot spot for antiviral drug discovery*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7817691/> [citirano: 4. 12. 2022]
- (28) *SARS-CoV-2 3CLpro mutations selected in a VSV-based system confer resistance to nirmatrelvir, ensitrelvir, and GC376* (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9765458/> [citirano: 4. 12. 2022]
- (29) Mesecar, A. D., John, S. E. St., Baez-Santos, Y. M. (2014) *The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral compounds*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896749/> [citirano: 4. 12. 2022]
- (30) Zhao, Y., Fang, C., Zhang, Q., Zhang, R., Zhao, X., Duan, Y., Wang H., Zhu, Y., Feng, L., Zhao, J., Shao, M., Yang, X., Zhang, L., Peng, C., Yang, K., Ma, D., Rao, Z., Yang, H. (2022) *Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with protease inhibitor PF-07321332*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8533666/> [citirano: 17. 1. 2023]
- (31) Selvarajan, R., Prasad, B., Venkataraman, S. *RNA Dependent RNA Polymerases: Insights from Structure, Function and Evolution*. *Viruses*, 10 (2): 76. (2018) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5850383/> [citirano 1. 2. 2023]
- (32) Aftab, S.O., Ghouri, M.Z., Masood, M.U. *Analysis of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a potential therapeutic drug target using a computational approach*.

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

Journal of Translational Medicine 18, 275. (2020) <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02439-0> [citirano 3. 2. 2023]

- ⁽³³⁾ Baric, R., Chilar, T., Denison, M., George, A., Gordon, C., Götte, M., Hughes, T., Lee, H., Li, J., Lu, X., Perry, J., Porter, D., Pruijssers, A., Sheahan, T., Stevens, L., Tchesnokov, E. *Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA-polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms. Science translational medicine, Volume 14, Issue 656.* (2022) <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abo0718> [citirano 1. 2. 2023]

10.3 Tabele

1. *Variant of Concern reports.* (2022) <https://outbreak.info/situation-reports> [citirano 20. 12. 2022]
3. *The Hydrogen bond type.* (b. d.) https://www.researchgate.net/figure/Types-of-hydrogen-bonds-and-corresponding-energies-adapted-from-32_tbl3_337796901 [citirano 24. 2. 2023]

10.4 Priloge

1. *Priporočila za cepljenje proti COVID-19 za različne skupine prebivalcev.* https://nijz.si/wpcontent/uploads/2022/11/tabela_priporocila_in_odobrena_uporaba_cepi_v_covid-19_12_12_2022.pdf [5. 1. 2023]

Raziskovalna naloga: **Primerjava mutacij terapevtskih tarč virusnih variant SARS-Cov-2 in vpliv mutacij na razvoj novih zdravil**

Priloga 1:

Cepivo		Uporaba	Starostne skupine			Osnovno cepljenje - presledki
			6 m-4 leta	5-11 let	12-17 let	≥ 18 let
Pfizer, BioNTech mRNA cepivo	Comirnaty 3	osnovno cepljenje	✓			3 odmerki → → → 3 tedni 8 tednov
	Comirnaty 10	osnovno cepljenje poživitveni odmerek [#]		✓		
	Comirnaty 30	osnovno cepljenje poživitveni odmerek [#]		✓	✓	
	Comirnaty Original /Omicron BA.1*	poživitveni odmerek [#]			✓	
	Comirnaty Original /Omicron BA.4-5 (15/15 µg)*	poživitveni odmerek [#]			✓	
	Comirnaty Original /Omicron BA.4-5 (5/5 µg)*	poživitveni odmerek [#]		✓		
Moderna mRNA cepivo	Spikevax [‡]	osnovno cepljenje		✓	✓	2 odmerka → → 4 tedni
	Spikevax bivalent Original /Omicron BA.1*	poživitveni odmerek [#] poživitveni odmerek [#]			✓	
	Spikevax bivalent Original /Omicron BA.4-5*	poživitveni odmerek [#]			✓	
Janssen Johnson&Johnson vektorsko cepivo	Jcovden	osnovno cepljenje poživitveni odmerek [#]			✓	1 odmerek
	Nuvaxovid	osnovno cepljenje poživitveni odmerek [#]			✓	2 odmerka → → 3 tedni

* Prilagojena cepiva se glede na zaključke EMA lahko uporabijo tudi za osnovno cepljenje.
[#] Poživitveni odmerek lahko prejmejo osebe, pri katerih je minilo vsaj 3 mesece od zadnjega cepljenja ali prebolelega covid-19.
[‡] Pri osebah, mlajših od 30 let, je namesto cepiva Spikevax priporočljiva uporaba cepiva Comirnaty ali Nuvaxovid.

Cepljenje s cepivom proti covidu-19 in ostalimi cepivi se lahko opravi sočasno ali s kakršnimkoli presledkom.