

Strategije razvoja cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2

Mamić, Tomislav

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:428461>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

STRATEGIJE RAZVOJA CJEPIVA PROTIV VIRUSA SARS-CoV-2
VACCINE DEVELOPMENT STRATEGIES AGAINST SARS-CoV-2

ZAVRŠNI RAD

Tomislav Mamić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentorica: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Zagreb, 2021.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opće karakteristike virusa SARS-CoV-2	3
3. Faze razvoja cjepiva od ideje do dospijea na tržište	6
4. Mete cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2	9
5. Tipovi cjepiva	12
5.1 Cjepiva temeljena na atenuiranom virusu	12
5.2 Cjepiva s inaktiviranim virusom	13
5.3 Cjepiva temeljena na proteinskoj virusnoj podjedinici i cjepiva zasnovana na čestici nalik virusnoj	15
5.3.1 Cjepiva temeljena na proteinskoj podjedinici	15
5.3.2. Cjepiva temeljena na čestici nalik virusnoj	16
5.4 Vektorska cjepiva	17
5.4.1 Cjepiva temeljena na replikacijski kompetentnom vektoru	17
5.4.2 Cjepiva temeljena na replikacijski nekompetentnom vektoru	18
5.5 Cjepiva temeljena na nukleinskoj kiselini	20
5.5.1 DNA cjepiva	21
5.5.2 mRNA cjepiva	24
6. Važnost adjuvanata kao sastavnica cjepiva	29
7. Emergencija novih varijanti virusa SARS-CoV-2	31
8. Zaključak	35
9. Literatura	36
10. Sažetak	43
11. Summary	44

1. Uvod

Zahvaljujući razvoju cjepiva, tijekom ovog te proteklih dvaju stoljeća, prevalencija mnogih bolesti značajno je smanjena. Primjerice, bolest velikih boginja (*Variola vera*), za koju se smatra kako je samo u 20. stoljeću odnijela otprilike 300 milijuna života (Henderson 2011), službeno je iskorijenjena 1980. godine zahvaljujući globalnom cijepljenju (www.ourworldindata.org/smallpox). Neizmjerne je važnosti cjepiva u suzbijanju bolesti i u 21. stoljeću. Procjenjuje se da 4-5 milijuna smrti godišnje biva spriječeno primjenom cjepiva, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2019. (www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/immunization). Globalno cijepljenje nameće se i kao najdjelotvornije rješenje u suzbijanju pandemije bolesti COVID-19 (Shin i sur. 2020) koja je od 31. prosinca 2019., kada je službeno zabilježen prvi slučaj, do 12. kolovoza 2021. prouzrokovala više od četiri milijuna registriranih smrti diljem svijeta (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>). Iako se pandemija može ublažiti nošenjem zaštitnih maski, održavanjem fizičkog razmaka, testiranjem i praćenjem zaraženih, tek imunizacijom značajnijeg dijela stanovništva, s ciljem postizanja „imuniteta krda“, može se govoriti o normalizaciji ekonomskog i društvenog života (Wouters i sur. 2021). Europski centar za sprečavanje i kontrolu bolesti (ECDC) kao ciljeve cijepljenja navodi smanjenje pritiska na zdravstveni sustav, smanjenje prosječne smrtnosti i ozbiljnosti bolesti COVID-19, ponovno otvaranje društva te u konačnici - eliminaciju bolesti (www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Objectives-of-vaccination-strategies-against-COVID-19.pdf). Nakon objave genetičke sekvencije virusa SARS-CoV-2, 11. siječnja 2020., brojne su tvrtke krenule u razvoj cjepiva (Deplanque i Launay 2021). Zaključno s 12. kolovozom 2021., prema podacima WHO-a, 294 je cjepiva protiv SARS-CoV-2, od toga 184 u pretkliničkim, a 110 u kliničkim fazama razvoja (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

U poglavljima koja slijede dobit će se uvid o općim karakteristikama virusa SARS-CoV-2: njegovoj sistematici, proksimalnom podrijetlu, genomu, strukturi, načinu ulaska u čovjekov organizam te interakciji sa staničnim receptorima. Obrazložit će se koji je put od ideje i dizajna

cjepiva do njegova dospijanja na tržište, s naglaskom na promijenjeni pristup u pandemijskim uvjetima. Navest će se komponente virusne čestice SARS-CoV-2 koje mogu poslužiti kao izvor antigena cjepiva u razvoju. U najopsežnijem poglavlju pregledat će se postojeće strategije u dostavi antigena cjepiva u stanice od interesa, a iznijet će se i konkretna cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2 svake pojedine strategije, uglavnom ona koja su najdalje odmakla u razvoju. Bit će riječi i o važnosti adjuvanta kao sastavnice cjepiva. Ukazat će se na problem emergencije novih varijanti i utjecaja koji ista ima na cjepiva kojima raspolažemo te predložit će se moguća rješenja. Na samom kraju izvest će se kratki zaključak na temelju prethodno napisanog.

2. Opće karakteristike virusa SARS-CoV-2

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus je iz porodice *Coronaviridae* (V'kovski i sur. 2021). Virusi iz te porodice zaražavaju sisavce, uključujući i ljude, te ptice. Koronavirusi čiji domaćini su sisavci uglavnom uzrokuju respiratorne i enteričke bolesti. Virus SARS-CoV-2 pripada potporodici *Orthocoronavirinae* te rodu *Betacoronavirus*. Virusi porodice *Coronaviridae* koji već dugo cirkuliraju ljudskom populacijom, kao što su, primjerice, HCoV-229E i HCoV-OC43, izazivaju bolesti blagih simptoma, sličnih simptomima prehlade. S druge strane, virusi MERS-CoV i SARS-CoV-1, koji također pripadaju rodu *Betacoronavirus*, te SARS-CoV-2, koji su tek nedavno prešli s drugog domaćina na čovjeka, izazivaju znatno ozbiljnije bolesti s višim stopama smrtnosti. Tako je virus SARS-CoV-1 tijekom 2002. i 2003. zarazio 8096 ljudi diljem svijeta sa smrtnošću od 9% (Yan i sur. 2020). Virus MERS-CoV je pak, od 2012. kada je prvi put otkriven, do danas, zarazio 2574 ljudi sa smrtnošću od 34% (Yan i sur. 2020) dok je smrtnost uzrokovana virusom SARS-CoV-2, uzevši u obzir samo potvrđene slučajeve zaraze i smrti, oko 2% (<https://covid19.who.int/>).

Genom virusa SARS-CoV-2, kao i u ostalih koronavirusa, jednolančana je RNA molekula (Xu i sur. 2020) sazdana od 29,9 kb (Lu i sur. 2020). Struktura genoma virusa SARS-CoV-2 sadrži karakteristike već ranije poznatih koronavirusa (Khailany i sur. 2020). Prve dvije trećine genoma (gledajući s 5' strane) sačinjavaju dva otvorena okvira čitanja, ORF1a i ORF1b, koji kodiraju za nestrukturane proteine uključene u stvaranju kompleksa za virusnu replikaciju i transkripciju (RTC) (V'kovski i sur. 2021). U zadnjoj trećini genoma nalaze se geni za strukturne proteine: protein šiljka (S), protein ovojnice (E), transmembranski protein (M) te nukleokapsidni protein (N) (Troyano-Hernández i sur. 2021).

Protein S omogućuje ulazak virusne čestice u stanice domaćina. Naime, homotrimerni protein S sastoji se od dvaju funkcionalno različitih dijelova, S1 i S2 (V'kovski i sur. 2021). S1 sadrži N-terminalnu domenu (NTD) te receptor vezujuću domenu (RBD) pomoću koje se virusna čestica veže na receptor angiotenzin-konvertirajućeg enzima 2 (ACE2) domaćinske stanice (Huang i sur. 2020). Podjedinica S2, koja je odgovorna za fuziju virusne čestice sa staničnom membranom, sastoji se od fuzijskog peptida (FP), heptapeptid ponavljajuće

sekvencije 1 (HR1) i 2 (HR2), domene TM te citoplazmatske domene. U prefuzijskoj konformaciji protein S inaktivni je prekursor koji nakon vezanja na receptor, tijekom daljnjih koraka koji dovode do fuzije virusne čestice sa staničnom membranom, doživljava brojne konformacijske promjene (Huang i sur. 2020). Prvo se aktivira cijepanjem na spomenuta dva funkcionalna dijela pomoću specifične stanične proteaze (TMPRSS2). Otkriveno je kako SARS-CoV-2 sadrži mnoga furinska mjesta cijepanja čime se povećava vjerojatnost cijepanja, a time i infektivnost samog virusa (Hasan i sur. 2020). Možda je i to jedan od razloga zašto je SARS-CoV-2 zarazniji od virusa SARS-CoV-1 (Huang i sur. 2020). Nakon cijepanja proteina S dolazi do izlaganja fuzijskog peptida koji, nakon interakcije s određenim ligandima, prolazi konformacijske promjene zbog kojih se ugrađuje u staničnu membranu (Harrison 2015). Poznato je i kako fuzijski peptid omogućuje fuziju razarajući, a kasnije i spajajući lipidni dvosloj stanične membrane (Millet i Whittaker 2018). U takvom položaju domena HR1 nalazi se bliže staničnoj membrani, a HR2 virusnoj (Eckert i sur. 2001). Uslijed toga dolazi do nove konformacijske promjene kojom HR1 i HR2 formiraju zajedničku strukturu sazdanu od šest zavojnica pri čemu dolazi do povlačenja virusne membrane i njena vezanja za staničnu membranu što rezultira, u konačnici, virusnom fuzijom.

Protein E nužan je za sastavljanje virusnih čestica kao i njihovo otpuštanje iz stanica pomoću interakcija s proteinom M (Troyano-Hernández i sur. 2021). Protein M pak najobilniji je virusni strukturni protein koji posreduje u sastavljanju ovojnice te nukleokapside. Vežući se za virusnu RNA, protein N formira helikalnu nukleokapsidu. Protein N također ima važnu ulogu i u virusnoj replikaciji i transkripciji, ali i virusnoj patogenezi potičući imunski odgovor stanice na infekciju.

Što se tiče proksimalnog porijekla virusa SARS-CoV-2, dvije su promjene koje su rezultirale virusom SARS-CoV-2 kao izuzetno patogenim ljudskim virusom – receptor-vezujuća domena proteina S optimizirana za vezanje staničnog receptora ACE2 te insercija furinskog mjesta cijepanja na granici funkcionalnih domena S1 i S2 proteina S (Andersen i sur. 2020). Obama promjenama izvorište možemo pronaći u koronavirusima čiji domaćin je šišmiš (Andersen i sur. 2020). Na temelju toga, može se zaključiti kako sarbekovirusi, za razliku od drugih RNA virusa koji prilagodbe za uspješno umnažanje i širenje stječu tek nakon prelaska na novog domaćina (Parrish i sur. 2008), unaprijed stječu generalistička svojstva evolucijskim promjenama svojih receptor-vezujućih domena što, posljedično, rezultira prelaskom na druge

domaćine, uključujući ljude (MacLean i sur. 2021). Za optimizirano vezanje virusne čestice na odgovarajući receptor stanice domaćina poglavito je bitan sastav šest kritičnih aminokiselina receptor-vezujuće domene regije S1 virusnog proteina S (Wan i sur. 2020). Zanimljivo je kako se pet od tih šest aminokiselina virusa SARS-CoV-2 razlikuje od aminokiselina u proteinu S virusa SARS-CoV-1. Receptor-vezujuća domena proteina S ujedno je i najvarijabilniji dio virusnog genoma (Zhou i sur. 2020).

3. Faze razvoja cjepiva od ideje do dospijeća na tržište

Kako bi cjepivo dospjelo na tržište, mora proći niz strogih testova kako bi se s visokom pouzdanošću dokazalo da je sigurno i svrsishodno. Za ocjenu cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2 na području Europske unije (EU) nadležna je Europska agencija za lijekove (EMA) (www.halmed.hr/COVID-19). Ocjenjivanje provode EMA-ina znanstvena povjerenstva - Povjerenstvo za humane lijekove (CHMP) i Povjerenstvo za ocjenu rizika na području farmakovigilancije (PRAC). Svoj konačni sud EMA dostavlja Europskoj komisiji koja, u slučaju pozitivnog ishoda, donosi odluku o puštanju cjepiva u promet.

No, prije nego što cjepivo pristupi testiranju, potrebno je sakupiti mnogo informacija neophodnih za razvoj željenog cjepiva, kao što su, primjerice, informacije o životnom ciklusu patogena: o načinu ulaska u organizam, interakciji sa staničnim receptorima, replikacijskim mehanizmima i principima virulencije (Cunningham i sur. 2016). Također, od iznimne je važnosti ustanoviti interakcije patogena s imunskim sustavom domaćina s posebnim naglaskom na stupanj, tip i mehanizam indukcije humoralne, stanične i nespecifične imunosti. Potom, na temelju dobivenih spoznaja izabire se i dizajnira prikladan antigen, adjuvant, platforma po kojoj će antigen završiti u stanici od interesa i ostale komponente. Tek tada cjepivo može ići u daljnje prekliničke pa potom kliničke faze ispitivanja u kojima će se evaluirati njegova djelotvornost i sigurnost.

U prekliničkim istraživanjima dobri modeli mogu biti glodavci i primati (isključujući ljude) iako se obavljaju i *in vitro* eksperimenti jer se nastoje smanjiti testiranja na laboratorijskim životinjama (Cunningham i sur. 2016, Artaud i sur. 2019). Idealno bi bilo da se izabrana životinja može prirodno inficirati patogenom te da nakon cijepljenja razvije imunski odgovor sličan ljudskome, no, često ne postoji životinja koja bi udovoljila tim zahtjevima (Artaud i sur. 2019). Naravno, rezultati zabilježeni na animalnim modelima ne moraju biti dobar pokazatelj onoga što se događa u ljudima jer je ipak riječ o različitim vrstama, međutim, sve pojave uočene na životinjskim modelima moraju biti uzete u obzir u daljnjim istraživanjima na čovjeku. Svrha prekliničkih ispitivanja utvrditi je potencijalnu toksičnost samog cjepiva, identificirati organe mete i ustanoviti je li utvrđena toksičnost reverzibilna. Također, na

temelju rezultata prekliničkih studija planiraju se protokoli za provođenje kliničkih studija pa se određuje, primjerice, sigurna doza za primjenu na ljudima koja se može kasnije modificirati ovisno o rezultatima kliničkih istraživanja. Nakon što podnesene rezultate prekliničkih studija nadležna tijela odobre, cjepivo može krenuti u prvu fazu kliničkog ispitivanja, onoga na ljudima.

Prva faza kliničkih istraživanja provodi se na maloj skupini od 20-80 zdravih odraslih ljudi (Artaud i sur. 2019). Često je cilj odrediti optimalnu dozu, onu koja daje najbolji imunski odgovor s prihvatljivom razinom sigurnosti, primjenom različitih doza na različitim ispitanicima. U ispitivanje je uključena i skupina koja umjesto cjepiva prima placebo. Tijekom ove faze mogu se ispitivati različiti sastavi cjepiva kao i potreba za adjuvantom. Istraživanja druge faze uključuju nekoliko stotina ljudi koji će reprezentativno predstavljati ciljanu populaciju za cijepljenje (Preiss i sur. 2016). Druga faza dijeli se na studije faze 2a i studije faze 2b. U fazi 2a utvrđuje se broj potrebnih doza cjepiva i interval između primjene istih te potvrđuje potreba za adjuvantom i vrsta adjuvanta (Artaud i sur. 2019). Također, određuje se način primjene cjepiva, okvirno se bilježe česte nuspojave te se utvrđuje imunogeničnost cjepiva – razina i kinetika proizvodnje specifičnih protutijela te se karakterizira stanična imunost. Fazu 2b obilježava preliminarna analiza djelotvornosti cjepiva: primjerice, uspoređujući incidenciju bolesti cijepljene i necijepljene grupe ili detektirajući patogen u krvi obaju grupa. Treća faza uključuje nekoliko tisuća do nekoliko desetaka tisuća volontera. Ispitanici su podijeljeni u skupine ovisno o tome jesu li primili cjepivo, a ispituje se djelotvornost, reaktogenost i sigurnost cjepiva (Preiss i sur. 2016). U ovoj fazi ispituje se i reproducibilnost i konzistentnost proizvodnje cjepiva u velikim količinama. Često se istraživanja treće faze provode u nekoliko zemalja diljem svijeta kako bi se ustanovilo jesu li rezultati učinka cjepiva primjenjivi na najrazličitijim populacijama (www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-are-vaccines-developed). Ukoliko proizvođač ostvari zadovoljavajuće rezultate, prilaže ih spomenutim nadležnim tijelima koja provode ocjenjivanje i donose svoj sud (Preiss i sur. 2016). Jednom kada je cjepivo licencirano i odobreno, ono je spremno za tržište, a službeno se nalazi u četvrtoj fazi kliničkih studija u kojoj se prikupljaju informacije o vrlo rijetkim nuspojavama cjepiva, djelotvornosti cjepiva u stvarnoj primjeni te o vremenskom trajanju pružanja zaštite od patogena (Artaud i sur. 2019). Nadležna tijela, dakle, nastavljaju nadzirati proizvodnju, efikasnost i sigurnost cjepiva.

Razvijanje licenciranog cjepiva zahtjevan je proces koji može potrajati godinama. Budući da je financijski rizik velik, proizvođači najčešće faze ispitivanja cjepiva provode linearno, s opsežnim i dugotrajnim analizama rezultata i provjere proizvodnje (Lurie i sur. 2020). Pandemijski uvjeti pak, kao ovi u kojima se trenutno nalazimo, zahtijevaju drugačiju paradigmu u kojoj se mnogo koraka provodi paralelno, a analiza i podnošenje podataka izvode brzo (Lurie i sur. 2020). Naprimjer, ispitivanja prve faze kliničkih studija mogu započeti dok još traju ispitivanja na životinjskim modelima. Financijski rizik za tvrtke značajno je smanjen jer su iz brojnih izvora uložene milijarde dolara u razvoj cjepiva (Ball 2020). Brzom napretku, naravno, potpomogli su i prethodno znanje o virusima srodnima virusu SARS-CoV-2 kao što su MERS-CoV i SARS-CoV-1 (Ball 2020) te razvoj novih platformi koje ne uključuju duge procese kultivacija, već se zasnivaju na sintetičkim metodama – kao što su RNA cjepiva (Lurie i sur. 2020). Sve to je rezultiralo time da je, primjerice, Pfizer-BioNTechovo cjepivo, na području EU, autorizirano za manje od osam mjeseci nakon ulaska u kliničku fazu ispitivanja (Verbeke i sur. 2021).

4. Mete cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2

U ovome poglavlju cilj je naglasiti koje sastavnice virusa SARS-CoV-2, mogu poslužiti kao izvor antigena koji će imunizirati organizam na željeni način. S obzirom na to da je ustanovljena važnost i stanične i humoralne imunosti za zaštitu organizma od virusa SARS-CoV-2, idealno cjepivo moralo bi aktivirati obje. Protein S glavna je meta COVID-19 cjepiva. Najveći broj neutralizirajućih antitijela interagira s receptor-vezujućom domenom proteina S, no poznata su i antitijela koja ostvaruju interakciju s N-terminalnom domenom proteina S čineći tako i NTD potencijalnom metom za razvoj cjepiva (Chi i sur. 2020). Ipak, valja napomenuti kako antitijela specifična za NTD imaju manju snagu neutralizacije od antitijela specifičnih za RBD. Iako bi uključivanje NTD-a u cjepivo doprinijelo povećavanju raspona neutralizirajućih epitopa, nijedno cjepivo protiv SARS-CoV-2 zasnovano na NTD-u nije prijavljeno (Dai i Gao 2021). Jedan od glavnih razloga predvodničke uloge RBD u izazivanju imunskog odgovora stanice jest taj što je čitava površina proteina S, osim one koja pripada RBD, značajno zaštićena od protutijela svojom glikoziliranošću (Grant i sur. 2020). Važno je spomenuti kako je RBD meta i stanične imunosti: u T-stanicama CD4⁺ i CD8⁺ pronađeni su epitopi proteina S virusa SARS-CoV-2 (Grifoni i sur. 2020).

Što se tiče proteina S u cjelini, bolji prinos antigena može se dobiti u prefuzijskoj konformaciji (u kojoj još nije došlo do otpuštanja imunodominantne regije S1 i njene receptor-vezujuće domene) (Dai i Gao 2021). No, prefuzijska konformacija je nestabilna jer protein S, vežući se za receptor ACE2, brzo poprima stabilnu postfuzijsku konformaciju (Bosch i sur. 2003). Tijekom razvoja jednog kineskog cjepiva (Ma i sur. 2021) ta prepreka se nadišla stvaranjem fuzijskog proteina S s privjeskom koji međusobno stvaraju disulfidne veze i time stabiliziraju trimernu konformaciju proteina. Poznato je u virusa MERS-CoV te SARS-CoV-1 kako se prefuzijsko stanje može stabilizirati i supstitucijom dviju određenih aminokiselina u regiji S2 u dva prolina (Pallesen i sur. 2017). Nastali protein označava se kao S-2P i korišten je kao izvor antigena u razvoju nekoliko cjepiva i protiv virusa SARS-CoV-2, primjerice u Moderninu cjepivu mRNA-1273 kao i u Pfizer-BioNTechovu cjepivu BNT162b2 (Dai i Gao 2021) te cjepivu NVX-CoV2373 tvrtke Novavax (Krammer 2020).

Mana imunizacije zasnovane na samoj receptor-vezujućoj domeni jest da je riječ o produktu male molekularne mase što ograničava imunogeničnost samog RBD-a te potencira mogućnost nepoželjnih dimerizacija i multimerizacija (Dai i Gao 2021). Taj problem može se riješiti povećanjem molekulske mase (npr. fuzijom s određenim proteinom ili domenom) ili postavljanjem većeg broja RBD-ova na određene nosače (Dai i Gao 2021). Također, budući da RBD-u ipak nedostaje određeni broj neutralizirajućih epitopa, koji čitavi protein S posjeduje, antigenski drift bi poraznije djelovao na cjepivo koje se temelji na RBD-u (Krammer 2020). Pri tome, treba imati na umu i već spomenutu tvrdnju da je RBD ujedno i najvarijabilniji dio virusnog genoma.

Regija S2 svojom glikoziliranošću puno je zaštićenija od staničnih protutijela od regije S1 pa bi stoga i imunogeničnost cjepiva temeljenog na regiji S2 bila znatno manja (Dai i Gao 2021). Ipak, neutralizirajuća antitijela, kao i T-stanice CD4⁺ specifične za regiju S2, postoje pa bi S2, s obzirom na relativnu očuvanost sekvencija koje kodiraju za regiju S2, mogla biti dobra meta za razvoj univerzalnih cjepiva protiv koronavirusa.

Proteini M i E slabo su imunogenični, no konzervirani su između virusnih vrsta pa bi u cjepivu eventualno mogli imati pomoćnu ulogu kao mete za unakrsno-reaktivne T-stanice (Dai i Gao 2021). Protein N pak veoma je imunogeničan te njegovi epitopi aktiviraju staničnu i humoralnu imunost (Sariol i Perlman 2020). Ipak, zasad nije prijavljeno nijedno cjepivo protiv virusa SARS-CoV-2 temeljeno na proteinu N što je dijelom rezultat i ranih istraživanja na virusu SARS-CoV-1 u kojima je pokazano kako cjepiva temeljena na proteinu N ne pružaju zaštitu te da, dapače, uzrokuju *enhanced respiratory disease* (ERD) (Dai i Gao 2021).

Postoje i cjepiva u kojih meta nije ciljani protein, već čitava virusna čestica. Takva su cjepiva s inaktiviranim virusom te živim atenuiranim virusom. U cjepiva s inaktiviranim virusom prisutni su strukturni proteini (u slučaju virusa SARS-CoV-2 to su proteini S, M, E i N) dok u cjepiva sa živim atenuiranim virusom, osim strukturnih, mogu biti prisutni i nestrukturni proteini (Dai i Gao 2021). Iz toga razloga, cjepiva koja koriste čitavu virusnu česticu mogu izazvati puno širi imunosni odgovor (Dai i Gao 2021). Ipak, u eksperimentima pretkliničke i kliničke faze razvoja dvaju kineskih cjepiva s inaktiviranim virusom SARS-CoV-2, uočeno je kako u ispitivanim organizmima (čovjekoliki majmuni u pretkliničkoj fazi te ljudi u kliničkoj fazi) nije došlo do poticanja stanične imunosti (Gao i sur. 2020, Wang i sur. 2020). Izostanak indukcije stanične imunosti vjerojatno proizlazi iz činjenice da komponente inaktiviranog virusa u

zanemarivoj količini ulaze u stanice pa i procesiranje antigena potrebno za prezentaciju peptida T-stanicama, koje se zbiva unutar stanice, izostaje (Dai i Gao 2021).

5. Tipovi cjepiva

U prošleme poglavlju navedene su sastavnice virusne čestice SARS-CoV-2 koje mogu poslužiti kao antigenska meta za imunizaciju. No, primjerice, dva cjepiva unatoč istim virusnim sastavnicama koje služe za poticanje imunosnog odgovora, mogu potpuno različitim pristupima omogućiti „dostavu“ antigena u stanice. Platforme koje se koriste u razvoju cjepiva možemo podijeliti na tradicionalne, koje uključuju cjepiva temeljena na inaktiviranom virusu te živom atenuiranom virusu, na one koje su nedavno rezultirale licenciranim cjepivom (cjepiva temeljena na proteinskoj podjedinici i čestici nalik virusnoj te vektorska cjepiva), platforme koje su tek pojavom pandemije COVID-19 rezultirale licenciranim cjepivom (RNA cjepiva) ili za čiji će se licencirani proizvod morati pričekati određeno vrijeme (DNA cjepiva) (Kyriakidis i sur. 2021).

5.1 Cjepiva temeljena na atenuiranom virusu

Riječ je o jednom od najstarijih tipova cjepiva čiji početci datiraju još od Louisa Pasteura i njegovih pokusa na kokoškoj koleri (Kyriakidis i sur. 2021, Berche 2012). Cilj je proizvesti genetički oslabljenu varijantu virusa koja se u domaćinu može replicirati, ali ne i prouzročiti bolest (Krammer 2020). Atenuirani virus će potaknuti imunosni odgovor sličan onome koji bi potaknuo divlji tip virusa. Kultivacija odgovarajućeg atenuiranog soja proces je koji može potrajati godina (Kyriakidis i sur. 2021). Virus se supkultivira u stranome domaćinu u kojem akumulira mutacije kojima biva optimiziran za replikaciju u novom organizmu pri čemu se, možebitno, smanjuje virulentnost prema starome domaćinu, odnosno čovjeku. Problemu dugotrajnosti može se doskočiti drugačijim pristupom za dobivanje atenuiranog soja – ciljanom delecijom gena odgovornih za virulentnost (Kumar i sur. 2021) ili, primjerice, sintetički, razvijajući virus s promijenjenim kodonskim sekvencijama u proteinski nepromijenjenom slijedu pri čemu dolazi do sporije replikacije virusa zbog potrebe za izoakceptorskim tRNA manje prisutnim u domaćinskom organizmu (kodonska deoptimizacija)

(Stauff i sur. 2019). Dodatna manjkavost ovog tipa cjepiva jest u tome što ponekad novokultivirani virus, jednom kada zarazi čovjeka, može akumulirati reverzne mutacije koje će ga ponovno optimizirati za ljudski organizam (Kyriakidis i sur. 2021). Ovo je posebice problematično u koronavirusa u kojih je zabilježena značajna rekombinacija u uvjetima *in vivo* pri čemu bi atenuirani virus mogao izmijeniti genetički materijal s drugim koronavirusima prisutnim u ljudskog organizmu te tako povratiti divlji fenotip. Problematično je i to što bi sama djelotvornost takvog cjepiva mogla biti dovedena u pitanje uzevši u obzir da ljudska vrsta ima dugu zajedničku povijest s drugim koronavirusima zbog čega je i postojanje određene razine imunosti na atenuirani soj moguće. Jedna od prednosti cjepiva s atenuiranim virusom je ta što bi se moglo primjenjivati intranazalno (Krammer 2020). Pritom bi se aktivirao mukozni imunski odgovor i gornji respiratorni trakt bio bi zaštićen. Također, ovom cjepivu ide u prilog to što razmnožavanjem virusa dolazi i do proizvodnje nestrukturnih proteina pa je imunski odgovor, u usporedbi s mnogim drugim vrstama cjepiva, širi. U kliničkoj fazi razvoja cjepiva, zaključno sa 16. srpnjem 2021. nalaze se dva cjepiva protiv SARS-CoV-2 temeljena na oslabljenom virusu (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Prvo je COVI-VAC, cjepivo američke tvrtke Codagenix razvijeno u suradnji sa Serum Institute of India. U tijelo se unosi nazalno, a predviđa se cijepljenje jednom dozom (www.codagenix.com/vaccine-programs/covid-19/). Drugo je cjepivo MV-014-212, američke tvrtke Meissa, koje se također u tijelo unosi nazalno, predviđena je jedna doza, a proizvođač ističe i odsustvo adjuvanata (www.meissavaccines.com/vaccine-pipeline). U oba cjepiva riječ je o atenuaciji postignutoj kodonskom deoptimizacijom (Krammer 2020).

5.2 Cjepiva s inaktiviranim virusom

Cjepiva temeljena na inaktiviranom virusu proizvode se uzgajajući virus u kulturi stanica te zatim „ubijajući“, tj. inaktivirajući ga pomoću fizikalnih ili kemijskih agenasa (Krammer 2020, Kyriakidis i sur. 2021). Standardne metode koje se koriste za kemijsku inaktivaciju uključuju tretman formaldehidom ili β -propiolaktonom (Kumar i sur. 2021). S obzirom na to što je riječ o inaktiviranom virusu koji se u stanici ne replicira, ovaj tip cjepiva sigurniji je od cjepiva s atenuiranim virusom (Kyriakidis i sur. 2021). Ipak, ponekad tretman

inaktivacije može značajno umanjiti imunogeničnost samog virusa pa je i djelotvornost takvog cjepiva nešto manja od onoga s oslabljenim patogenom. Ovakav tip cjepiva često zahtijeva dodatak adjuvanta, kao što je, primjerice, aluminijev hidroksid. U cjepiva s inaktiviranim virusom prisutni su svi strukturni proteini virusne čestice pa je i imunosni odgovor koji takvo cjepivo inducira veoma širok (Krammer 2020). Zaključno sa 16. srpnjem 2021., 14 je cjepiva protiv SARS-CoV-2 temeljenih na inaktiviranom virusu koji se nalaze u kliničkoj fazi razvoja (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

Cjepiva se uglavnom u tijelo unose intramuskularno te sva zahtijevaju dvije doze. Trenutno su cjepiva dvaju proizvođača, od strane Svjetske zdravstvene organizacije, autorizirana za tržište. To ipak nije slučaj u Europskoj uniji, s obzirom na to što ta cjepiva nisu odobrena od Europske agencije za lijekove (www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines). Prvo je cjepivo kineske tvrtke Sinovac Biotech, CoronaVac, ranije poznato pod imenom PiCoVacc. Riječ je o cjepivu temeljenom na virusu inaktiviranom β -propiolaktonom koji pripada soju CN2 virusa SARS-CoV-2, izoliranom iz bronhioalveolarnog lavata hospitaliziranog pacijenta iz Kine (Gao i sur. 2020). Cjepivo dolazi u kombinaciji s aluminijevim hidroksidom kao adjuvantom. U istraživanjima treće faze kliničkog razvoja cjepiva, provedenim na više od 8000 ljudi u Brazilu (Kyriakidis i sur. 2021), utvrđeno je kako dvije doze cjepiva, primijenjene u razmaku od 14 dana, pružaju zaštitu od simptomatske zaraze virusom SARS-CoV-2 u 51% slučajeva (<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-sinovac-covid-19-vaccine-what-you-need-to-know>). Četrnaest dana nakon primjene druge doze svi ispitanici bili su zaštićeni od ozbiljnog razvitka bolesti i hospitalizacije. Drugo cjepivo u četvrtoj fazi, BBIBP-CorV, također je cjepivo kineske tvrtke, Sinopharm, razvijeno u suradnji s China National Biotech Group te Wuhan Institute of Biological Products. Virus je, kao i u CoronaVac cjepiva, inaktiviran β -propiolaktonom, a u cjepivu se također kao adjuvantno sredstvo koristi aluminijev hidroksid (Kyriakidis i sur. 2021). U drugoj fazi kliničkog razvoja, primjerice, 448 ispitanika primilo je jednu dozu od 8 μ g ili dvije od 4 μ g cjepiva s vremenskim razmakom između dvije doze od 14, 21 ili 28 dana. Najbolje razine antitijela utvrđene su u ispitanika koji su primile dvije doze u vremenskom razmaku od 21 dan. Indukcija stanične imunosti nije registrirana.

5.3 Cjepiva temeljena na proteinskoj virusnoj podjedinici i cjepiva zasnovana na čestici nalik virusnoj

Ovoj skupini pripadaju cjepiva temeljena na proteinskoj virusnoj podjedinici te cjepiva zasnovana na čestici nalik virusnoj (Kyriakidis i sur. 2021). Zajedničko im je i to da izvor antigena nije čitava virusna čestica, već samo određeni imunogenični proteinski fragment. Naravno, proteinski fragment izvor je antigena i u cjepiva temeljenih na nukleinskoj kiselini te u vektorskim cjepivima, no, za razliku tih dviju skupina, fragment se u ovoj skupini cjepiva ne mora tek proizvesti u stanici, nego se od početka primjenjuje u proteinskom obliku.

5.3.1 Cjepiva temeljena na proteinskoj podjedinici

Cjepiva temeljena na proteinskoj podjedinici proizvode se tehnologijom rekombinantne DNA što uključuje unos DNA koja kodira za željeni proteinski antigen u određenu eukariotsku stanicu, zatim ekspresiju antigena u kulturi stanica te u konačnici njegovu izolaciju i pročišćavanje (<https://www.nature.com/subjects/recombinant-vaccine>). Uglavnom je riječ o cjepivima temeljenim na proteinu šiljka ili na RBD. Uneseni konstrukti mogu se eksprimirati u širokom rasponu staničnih sustava: u stanicama sisavaca, kvasaca, insekata pa čak i biljaka (Krammer 2020). Ovisno o ekspresijskom sustavu, različit je prinos antigena, ali i stupanj te tip posttranslacijske modifikacije zbog čega se bakterije i ne nameću kao dobri stanični sustavi za proizvodnju cjepiva. Modifikacije kao što su delecija polibazičnog mjesta cijepanja, uključivanje domena za trimerizaciju i sl. u proteinu S, značajno utječu na imunogeničnost samog cjepiva. Prednost ove strategije je što se ne radi s čitavim virusom, već samo njegovim fragmentom, pa je i mogućnost za ozbiljnije nuspojave značajno smanjena (Kyriakidis i sur. 2021). Ipak, ova strategija često nameće potrebu primjene dodatnih doza te korištenje adjuvanta za postizanje željenog stupnja imunizacije. Također, čitavi protein S teško je eksprimirati što utječe na prinos same proizvodnje (Amanat i sur. 2020). S druge strane, RBD lakše je eksprimirati (Krammer 2020), ali kao što je već spomenuto u poglavlju „Mete cjepiva protiv SARS-CoV-2“, zbog male molekulske mase RBD-a i imunogeničnost je nešto manja, s čime u skladu ide i niža tolerancija na potencijalne mutacije u RBD-kodirajućim sekvencijama. Cjepiva temeljena na proteinskoj podjedinici prednjače brojem kandidata u kliničkoj fazi

razvoja - ukupno ih je 36, zaključno sa 16. srpnjem 2021. Ipak, još nijedan kandidat nije autoriziran za tržište (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Trenutno u trećoj fazi kliničkog razvoja je, između ostalih, i cjepivo NVX-CoV2373 američke tvrtke Novavax. Radi se o cjepivu temeljenom na čitavom proteinu S stabiliziranom u prefuzijskoj konformaciji s dodatkom adjuvanta Matrix-M o kojem će nešto kasnije biti riječ. Rekombinantni protein S proizveden je u kulturi stanica insekata i pročišćen membranskom ekstrakcijom (Krammer 2020). Proteini su u cjepivu organizirani u micelarnu strukturu, povezani preko proteinskih hidrofobnih repova. Također, u trećoj fazi kliničkog razvoja nalazi se i cjepivo tvrtke Sanofi. Kao i u slučaju cjepiva tvrtke Novavax, Sanofi za ekspresiju rekombinantnog proteina S koristi bakuloviruse pomoću kojih antigen-kodirajuća DNA dospijeva u stanice insekata u kulturi gdje dolazi do ekspresije rekombinantnog proteina S u visokom prinosu (Kyriakidis i sur. 2021). Dodatak cjepivu je adjuvant proizvođača GSK o kojemu će biti riječ u poglavlju o adjuvantima.

5.3.2. Cjepiva temeljena na čestici nalik virusnoj

Čestice nalik virusnoj (VLP) multiproteinske su strukture koje imitiraju nativnu virusnu česticu organizacijom i konformacijom, no u sebi ne sadrže genom čime se dobiva potencijalno sigurnije cjepivo (Roldão i sur. 2010). Na površini VLP nalaze se mnogobrojne kopije virusnog antigena koji antigen-prezentirajuće stanice mogu prepoznati, fagocitirati VLP, procesirati i zatim prezentirati limfocitima T (Kyriakidis i sur. 2021). Prednost ovog cjepiva, za razliku od cjepiva s atenuiranim ili inaktiviranim virusom, u tome je što procesi atenuacije i inaktivacije kojima dolazi do modifikacije epitopa, nisu potrebni (Roldão i sur. 2010). Zbog površine VLP-a na kojoj je izuzetno velika gustoća antigena, cjepivo može izazvati snažan humoralni i stanični imunski odgovor pri čemu potreba za adjuvantom ponekad izostaje (Roldão i sur. 2010). Ipak, u COVID-19 cjepivu tvrtke Medicago, primjerice, odsustvo adjuvanta nije slučaj. Indukciji snažnog imunskog odgovora ide u prilog i to što su VLP idealne veličine za interakciju s dendritičkim stanicama koje omogućuju daljnju prezentaciju antigena T-stanicama (Grgacic i Anderson 2006). Cjepiva temeljena na VLP često su imunogeničnija od cjepiva s rekombinantnim proteinom (Grgacic i Anderson 2006). Jedan od razloga za to jest i činjenica da VLP omogućuje prezentaciju antigena vezanog za membranu, kakav se nalazi i u prirodnom virusu, što u cjepiva s rekombinantnim virusnim proteinom često nije slučaj, već je riječ o

samostalnim, topljivim antigenima. Jedna od manjkavosti ove skupine cjepiva jest zahtjevnost i kompleksnost u izradi same čestice (Kyriakidis i sur. 2021). Tvrtka koja je najdalje odmakla u razvoju cjepiva protiv SARS-CoV-2 ovom strategijom jest Medicago čije se CoVLP cjepivo nalazi u fazi 2/3 kliničkog razvoja (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Razvijena je VLP na čijoj se površini nalazi protein S stabiliziran u prefuzijskoj konformaciji (Kyriakidis i sur. 2021). Sam rekombinantni protein S proizveden je u biljci *Nicotiana benthamiana* transfeciranoj virusom koji nosi protein-kodirajuću DNA. Cjepivo sadrži i adjuvant CpG 1018 tvrtke Dynavax koji djeluje kao ligand *toll-like* receptora.

5.4 Vektorska cjepiva

Ova strategija uključuje postojanje virusnog vektora osmišljenog metodama genetičkog inženjerstva kojemu je reducirana virulencija, ali očuvana sposobnost zaraze domaćina (Kyriakidis i sur. 2021). Virusni vektor u sebi sadrži DNA koja kodira za ciljni antigen, a koji će stanica eksprimirati. O koliko novom pristupu je riječ, govori i činjenica da je prvo vektorsko cjepivo koje je pušteno na tržište, cjepivo protiv Ebole (Ervebo), dopuštenje za tržišnu proizvodnju dobilo u prosincu 2019. Najčešće korišteni virusi vektori su virusi ospica, adenovirusi te virusi vezikularnog stomatitisa. Imunosni odgovor na ciljni antigen značajno se smanjuje ukoliko u organizmu već postoji određena otpornost na virus koji je poslužio kao vektor. Korištenje vektora kojima ljudi nisu domaćini može pripomoći u izbjegavanju navedenog problema. No, u cjepiva u kojih se primjenjuje više doza, antitijela proizvedena protiv virusnog vektora nakon davanja prve doze, mogu smanjiti učinkovitost samog cjepiva tijekom primjene druge doze. Ipak, i ta prepreka može se zaobići korištenjem različitih vektora za docjepljivanje (Krammer 2020). Vektorska cjepiva dijelimo na dvije podgrupe, ovisno o tome može li se virusni vektor u domaćinskoj stanici replicirati ili ne može.

5.4.1 Cjepiva temeljena na replikacijski kompetentnom vektoru

Replikacijski kompetentni vektor može se dobiti uzgajanjem atenuiranog vektorskog soja virusa dizajniranog da eksprimira ciljni antigen, uglavnom protein šiljka (Krammer 2020). Također, i animalni virusi koji se slabije repliciraju u čovjeku mogu poslužiti kao vektori. Zbog

moćnosti replikacije vektora u domaćinu, cjepiva ove skupine u pravilu izazivaju jači imunski odgovor od cjepiva temeljenih na replikacijski nekompetentnom vektoru (Kyriakidis i sur. 2021). Zasad je pet COVID-19 cjepiva koja se nalaze u kliničkoj fazi razvoja, no nijedno od tih cjepiva nije dospjelo ni do treće faze kliničkog istraživanja (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines) što i ide u prilog tezi da je uzgoj željenih atenuiranih sojeva vremenski zahtjevan.

5.4.2 Cjepiva temeljena na replikacijski nekompetentnom vektoru

U cjepiva s replikacijski nekompetentnim vektorom, uklonjen je dio genoma koji omogućuje replikaciju vektora (Krammer 2020). Šesnaest cjepiva u kojih je korištena ova strategija nalaze se u različitim fazama kliničkog razvoja, zaključno sa 16. srpnjem 2021. (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Čak tri cjepiva puštena su u tržišnu proizvodnju. Jedno od njih jest Vaxzevria, cjepivo švedske tvrtke AstraZeneca, razvijeno u suradnji sa sveučilištem Oxford. Europska komisija je Vaxzevriju autorizirala za tržište na području Europske unije 29. siječnja 2021. otkad je, zaključno s 28.7.2021. podijeljeno više od 65 milijuna doza toga cjepiva diljem EU (<https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#distribution-tab>). Proizvođači Vaxzevrije su, kako bi riješili problem već postojeće otpornosti na ljudske adenoviruse, kao vektor koristili adenovirus ChAdOx1 čiji domaćin je čimpanza (Kyriakidis i sur.2021). Adenovirus eksprimira divlji tip proteina šiljka virusa SARS-CoV-2. Zanimljivi rezultati dobiveni su u trećoj fazi kliničkog razvoja. Istraživanja su provedena na 11 636 sudionika u Rusiji, Republici Južnoj Africi, Brazilu i Ujedinjenom Kraljevstvu kako bi se djelotvornost ispitala na kulturološki, genetički i geografski različitim skupinama (Kyriakidis i sur. 2021). Prva grupa ispitanika obuhvatila je 8895 ljudi koji su primili dvije pune doze ($\approx 5 \times 10^{10}$ virusnih čestica) u razmaku od 21 dan pri čemu je zabilježena učinkovitost cjepiva od 62,1%. S druge strane, u skupini od 2741 ispitanika koja je u istom vremenskom razmaku primila dvije doze pri čemu je u prvoj dozi prepolovljen broj virusnih čestica ($\approx 2,5 \times 10^{10}$), ispitana učinkovitost bila je 90%. Kao jedan od glavnih objašnjenja koji se navode za veliko odstupanje djelotvornosti cjepiva u dvaju skupina jest povećana imunost na adenovirusni vektor koju su ispitanici mogli razviti nakon prve doze čime je smanjena proizvodnja samog proteina S u stanici, a time i učinkovitost cjepiva. Što se tiče nuspojava

Vaxzevrije, kao veoma uobičajene (one koje su pojavljuju u više od jedne osobe na 10) izdvajaju se bol, crvenilo i toplina na mjestu injekcije, slabost, umor, blaga vrućica, bol u mišićima i zglobovima, mučnina, glavobolja itd. (www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca). Od uobičajenih nuspojava (pogađa do jednu od 10 osoba) ističu se proljev, povraćanje, blaga trombocitopenija, vrućica, oticanje na mjestu injekcije... Među neuobičajenim nuspojavama (pogađa do jednu od 100 osoba) navode se svrbež, osip, pretjerano znojenje, vrtoglavica, povećani limfni čvorovi, pospanost, smanjeni apetit itd. Nijedna se nuspojava ne navodi kao rijetka (pogađa do jednu od 1000 osoba), a kao vrlo rijetka (pogađa do jednu od 10 000 osoba) javlja se tromboza praćena trombocitopenijom. Zaključno s 27. lipnjem 2021., u trenutku kada je već bilo podijeljeno više od 50 milijuna doza Vaxzevrije diljem Europe, potvrđeno je 479 slučajeva tromboze praćene trombocitopenijom povezanih s AstraZenecinim cjepivom (www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca). Prijavljeno je i 227 slučajeva Guillain-Barréova sindroma nakon cijepljenja Vaxzevrijom za koje se ne može ni potvrditi ni opovrgnuti da su posljedica cjepiva. S veoma niskom učestalošću zabilježeni su i slučajevi perikarditisa i miokarditisa kojima nije utvrđen uzrok. Riječ je o izrazito rijetkim pojavama koje se ni ne mogu detektirati u kliničkim studijama koje obuhvaćaju nekoliko desetaka tisuća ljudi.

Nadalje, drugo cjepivo ove skupine koje se nalazi na tržištu je i cjepivo razvijeno u nizozemskoj tvrtki Janssen, podružnici američke tvrtke Johnson & Johnson. Adenovirusni vektor koji je korišten je adenovirus vrste D serotipa 26 koji eksprimira rekombinantni protein S virusa SARS-CoV-2 stabiliziran u prefuzijskoj konformaciji (Kyriakidis i sur. 2021) što mu daje prednost u odnosu na druga vektorska cjepiva s divljim tipom proteina S. Niska prevalencija toga serotipa u ljudskoj populaciji ključna je za izbjegavanje već postojeće imunosti na određene adenoviruse u ljudi (Kyriakidis i sur. 2021). S druge strane, u cjepiva tvrtke CanSino Biologics, razvijenog u suradnji s Beijing Institute of Technology, kao adenovirusni vektor korišten je visoko seroprevalentni adenovirus vrste C serotipa 5 što je i razlog zašto u starijih ljudi, u kojih je postojala veća vjerojatnost tijekom života da steknu imunost na navedeni serotip, uočena je manja učinkovitost cjepiva nego u mlađih ljudi (Krammer 2020). Prednost Janssenova cjepiva je, kao i cjepiva tvrtke AstraZeneca, što omogućuje pohranu do 6 mjeseci na temperaturi 2-8 °C što uvelike olakšava transport i skladištenje cjepiva (AboulFotouh i sur.

2021). Također, povoljno je što u jednoj dozi izaziva željenu količinu imunosti. U trećoj fazi kliničkih studija, u kojoj je ispitano 39 321 ljudi negativnih na COVID-19 uoči primanja cjepiva/placeba, utvrđena je efikasnost cjepiva protiv umjerene bolesti od 66% 14 dana nakon primanja doze te 67% nakon 28 dana (Sadoff i sur. 2021). Oko 3000 pojedinaca praćeno je 11 tjedana nakon primjene cjepiva, te 1000 nakon 15 tjedana, te je ustanovljeno kako nakon tih vremenskih perioda ne dolazi do opadanja efikasnosti cjepiva. Od vrlo uobičajenih nuspojava cjepiva navode se glavobolja, umor, mučnina, bol u mišićima te bol na mjestu injekcije, od uobičajenih kašalj, bol u zglobovima, povišena tjelesna temperatura te oticanje na mjestu injekcije (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-janssen>). Kao neuobičajene nuspojave izdvajaju se drhtavica, kihanje, pretjerano znojenje, osip, slabost itd., a kao rijetke i vrlo rijetke kronični osip i hipersenzitivnost, odnosno, Guillain-Barréov sindrom i tromboza praćena trombocitopenijom.

Iako je u upotrebi u 70 država diljem svijeta (Nogrady 2021), rusko cjepivo Sputnik V, razvijeno u suradnji s Gamaleya Research Institute i Ministarstvom zdravlja Ruske Federacije, Svjetska zdravstvena organizacija još uvijek nije odobrila, a cjepivo se službeno nalazi u trećoj fazi kliničkog razvoja (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Sputnik V je Ministarstvo zdravlja Ruske Federacije autoriziralo za upotrebu u kolovozu 2020. iako ni podatci prve i druge faze kliničkog razvoja tada nisu bili objavljeni (Nogrady 2021). Rezultati treće faze kliničkog razvoja izneseni u veljači 2021. tvrde da cjepivo sprečava simptomatsku zarazu u 91,6% slučajeva. Ipak, mnogi su kritizirali te rezultate napominjući kako rezultati ranijih faza studija nisu bili u potpunosti objavljeni te kako su neki od podataka nekonzistentni. Proizvođači Sputnika V koristili su već spomenuti pristup korištenja dvaju različitih adenovirusnih vektora kako imunost razvijena na adenovirusni vektor nakon primanja prve doze ne bi utjecala na učinkovitost druge doze (Kyriakidis i sur. 2021). To, primjerice, nije bio slučaj u prva dva navedena vektorska cjepiva. Sputnik V koristi adenovirus serotipa 26 kao vektor za primjenu prve doze, a adenovirus serotipa 5 kao vektor za drugu dozu pri čemu oba nose informaciju za protein šiljka virusa SARS-CoV-2.

5.5 Cjepiva temeljena na nukleinskoj kiselini

Rastući trend u svijetu cjepiva svakako su cjepiva temeljena na nukleinskoj kiselini. Uoči pandemije virusa SARS-CoV-2 nije postojalo nijedno mRNA ni DNA cjepivo licencirano za ljudsku upotrebu (Kyriakidis i sur. 2021). Ipak, postoji nekoliko DNA cjepiva na tržištu za životinjsku upotrebu, kao što je, primjerice, konjsko cjepivo protiv virusa zapadnog Nila (Hobernik i Bros 2018). Velika brzina razvoja ovog cjepiva zasnovana je na činjenici da je za cjepivo potrebna jedino nukleinska kiselina koja kodira za željeni antigen te često i nanočestica pomoću koje će nukleinska kiselina biti dostavljena u stanicu (Kyriakidis i sur. 2021). Ta značajka je u razdoblju pandemije od presudne koristi. Još jedna prednost ovih cjepiva je to što se antigen proizvodi u domaćinskoj stanici pa zbog toga prolazi i sve posttranslacijske modifikacije koje prolazi kada se u stanici proizvodi zbog prirodne infekcije (Verbeke i sur. 2021). Ovisno o tome koji tip nukleinske kiseline je sastojak cjepiva, mRNA ili DNA, različiti su izazovi u razvoju cjepiva, a u konačnici i mehanizmi imunizacije, pa govorimo o DNA ili o mRNA cjepivima.

5.5.1 DNA cjepiva

DNA cjepiva vrlo su fleksibilna jer mogu nositi DNA koja kodira za jedan ili više virusnih proteina, a sve je to moguće varijacijom DNA sekvencija (Kutzler i Weiner 2008). Lako se proizvode u velikom broju, stabilna su te jednostavna za skladištenje. DNA željene antigenske sekvencije dobiva se sintetički ili lančanom reakcijom polimerazom pri čemu se dobivena DNA klonira u plazmidni kalup koji se umnaža u kulturi. Dobiveni produkt nakon pročišćavanja spreman je za inokulaciju. Nakon inokulacije, staničnim mehanizmima DNA dopijeva u okolne stanice, uključujući i antigen-prezentirajuće stanice. Plazmidna DNA u stanicama se eksprimira pri čemu se proizvodi antigen. Antigen-prezentirajuće stanice putuju u limfne čvorove gdje pomoću svojih MHC kompleksa prezentiraju prethodno fragmentirane i modificirane antigene T-stanicama. To omogućuje indukciju imunogenog odgovora proizvodnjom dodatnih T-stanica ili pak aktivacijom B-stanica što u konačnici rezultira proizvodnjom specifičnih protutijela. Dakle, dolazi do aktivacije stanične i humoralne imunosti.

Dug je put koji plazmidni vektor mora proći kako bi dospio do jezgre stanice. Mora proći kroz staničnu membranu endocitozom, potom izbjeći degradaciju lizosomom te osloboditi se endosoma procesom endosomalnog bijega, zatim izbjeći djelovanje citosolnih DNaza te, konačno, uspješno proći jezgrinu ovojnicu (Suschak i sur. 2017). Nadalje, tijekom inokulacije

cjepiva iglom velika količina DNA uopće ne doprije u stanicu, već završi u međustaničnom prostoru. Iz tog razloga, razvijene su mnoge kemijske i mehaničke metode pomoću kojih će dostava cjepiva u stanice od interesa biti djelotvornija. Naprimjer, primjenom električnog impulsa postupkom elektroporacije tijekom inokulacije cjepiva, unos DNA u stanice koje se nalaze u neposrednoj blizini, povećava se za 500 puta (Lambricht i sur. 2015). Još jedna mehanička metoda koja pospješuje transfekciju jest metoda *gene gun* pomoću koje, pod utjecajem visokog tlaka, DNA penetrira u citoplazmu i jezgru stanice nošena mikronosačem koji je najčešće ništa drugo doli čestica zlata (Raska i Turanek 2015). Što se tiče kemijskih metoda, cjepivo se ne mora u primatelja unijeti u obliku „gole“ DNA, već DNA može biti omeđena, primjerice, nanočesticom. Ona omogućuje zaštitu od enzimske razgradnje DNA, a i njeno usmjeravanje u antigen-prezentirajuće stanice (Hobernik i Bros 2018). Stupanj i oblik interakcije nanočestice s određenom stanicom ovisi o naboju, veličini, obliku te hidrofилnosti/hidrofobnosti vanjske površine nanočestice. Smještanje određenih molekula na površinu nanočestice, koje su ligandi antigen-prezentirajućih stanica *in vivo*, može značajno doprinijeti specifičnosti ulaska DNA u stanice. Nanočestice u konačnici dopijaju u stanice penetracijom kroz tranzijentne rupe koje se nalaze u staničnoj membrani ili endocitozom posredovanom receptorom. Treba uzeti u obzir i da konačni konstrukt mora biti stabilan uslijed silnih interakcija sa serumskim proteinima. Budući da DNA mora završiti u jezgri kako bi se transkribirala, njen transport može se pospješiti uključivanjem NLS-a na površinu nanočestica.

Česta je primjena plazmida koji kodiraju za antigensku DNA zajedno s plazmidima koji kodiraju za razne citokine, kemokine i ostale imunostimulatorne molekule (Suschak i sur. 2017). Stanice u koje je dospio plazmid s adjuvantom ekspimiraju plazmidne gene te, posljedično, secerniraju adjuvantne molekule koje stimuliraju lokalne antigen-prezentirajuće stanice te stanice u limfnim čvorovima.

Plazmidna DNA sadrži određene dijelove koji su potrebni dok se plazmid proizvodi u bakteriji, no kasnije mogu negativno utjecati na učinkovitost i sigurnost cjepiva (Hobernik i Bros 2018). Jedan od takvih plazmidnih elemenata je i gen za rezistenciju na antibiotik. Također, istraživanja su pokazala kako je veličina samog vektora obrnuto razmjerna uspješnosti transfekcije. Stoga, razvijena je metoda pomoću koje je moguće, nakon umnažanja plazmidne DNA u bakterijskim stanicama, ukloniti prokariotske dijelove koji su nepotrebni u daljnjoj manipulaciji cjepivom. Rezultantni vektor naziva se *minicircle* plazmidom.

Potencijalni sigurnosni problemi koji se tiču ovog cjepiva uključuju moguću integraciju plazmidne DNA u genom, izazivanje autoimunosti te mogućnost otpornosti na antibiotik (Kutzler i Weiner 2008). DNA cjepiva koja su bila ispitivana u trenutku pisanja Kutzler i Weiner (2008), nisu pokazivala relevantnu stopu ugradnje u kromosomsku DNA. Čvrsti dokazi da se unesena plazmidna DNA ne ugrađuje u kromosomsku od iznimne su važnosti s obzirom na to što bi insercijom moglo doći do inaktivacije tumor-supresorskih gena, aktivacije onkogenih te, u konačnici, do kromosomske nestabilnosti. Što se tiče potencijalne autoimunosti, u ispitanicima kliničkih studija nisu uočeni njeni simptomi, a i praćenjem laboratorijskih markera autoimunosti nisu zabilježene anomalije. Treća stavka koja se navodi kao problematična jest postojanje gena za rezistenciju na antibiotik u konačnom plazmidu koji služi za selekciju bakterijskih kolonija od interesa tijekom razvoja samog cjepiva. Moguće je da bi bakterije koje se nalaze u organizmu primatelja cjepiva, mogle preuzeti taj gen i tako same postati rezistentne.

Sedam je DNA cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2 koja se nalaze u različitim fazama kliničkog istraživanja, a zasad je samo jedno cjepivo doseglo treću kliničku fazu (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines), zaključno sa 16. srpnjem 2021. Primjerice, INO-4800, američko cjepivo tvrtke Inovio, nalazi se u fazi 2/3 kliničkog razvoja. Cjepivo se u tijelo unosi intradermalno pomoću uređaja „Cellecra 2000“ koji funkcionira kao elektroporator (Kyriakidis i sur. 2021). Cjepivo sadrži plazmidni vektor pGX9501 čiji je dio i sintetički generirana sekvencija za virusni protein S optimizirana *in silico*, algoritmom za gensku optimizaciju tvrtke Inovio, s ciljem jače ekspresije proteina u stanici (Tebas i sur. 2021). Kandidat treće faze je indijsko cjepivo tvrtke Zydus Cadila. Riječ je o cjepivu koje se primjenjuje u čak tri doze s vremenskim razmakom od tri tjedna. Unosi se intradermalno, bez upotrebe igala, pomoću injektora, koji djeluje na principu stvaranja visokotlačne tekućine koja velikom brzinom penetrira do 2 mm ispod kože primatelja cjepiva što rezultira uniformnom disperzijom cjepiva i veoma djelotvornom transfekcijom stanica (Dey i sur. 2021). U pretkliničkoj fazi istraživanja uočen je značajan odgovor stanične i humoralne imunosti. U istraživanjima provedenim na miševima mjerene su razine antitijela 28, 42 i 126 dana nakon primanja treće doze te je utvrđeno kako su one u svakom navedenom vremenskom periodu ostale na visokoj razini (Dey i sur. 2021). U miševima je izmjerena i visoka razina ekspresije interleukina γ , indikatora snažnog odgovora pomoćničkih T-stanica, 28 i 42

dana nakon primjene treće doze cjepiva, što upućuje na snažnu indukciju stanične imunosti. Valja spomenuti kako je mjerena i prisutnost plazmidne DNA metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (qPCR), 2, 24, 168, 336 i 672 h nakon primjene cjepiva, u krvi, plućima, srcu, slezeni, crijevima, bubrezima i koži. Nakon 336 h (14 dana), plazmidna DNA bila je prisutna samo na mjestu injekcije u koži, u maloj količini, a nakon 672 h (28 dana) ni u jednom ispitivanom dijelu tijela nije registrirana prisutnost plazmida.

5.5.2 mRNA cjepiva

Najranija istraživanja povezana s razvojem mRNA cjepiva nisu ulijevala previše optimizma: RNA molekule izazivale su jak odgovor nespecifične imunosti, neefikasna je bila dostava RNA u stanice, a i znalo se kako je RNA poprilično nestabilna molekula (Pardi i sur. 2018). Po pitanju navedenih zapreka učinjen je ogroman napredak. Otkriveno je kako tijekom virusne infekcije stanice domaćina prepoznaju virusne nukleinske kiseline svojim *toll-like* receptorima i staničnim RNA sensorima što rezultira proizvodnjom upalnih citokina s ciljem sprečavanja translacije virusne RNA, a time i proizvodnje novih virusnih čestica (Verbeke i sur. 2021). *In vitro* transkribirana RNA također podliježe istim procesima, a utvrđeno je kako modifikacije uočene na prirodnoj RNA služe imunskom sustavu kao temelj razlikovanja strane RNA od vlastite. Na osnovu toga izveden je zaključak kako bi uključivanje modificiranih ribonukleotida, kao što su pseudouridin i N1-metilpseudouridin (Pardi i sur. 2018), u *in vitro* transkribiranu RNA, značajno pomoglo u smanjivanju odgovora nespecifične imunosti (Verbeke i sur. 2021). Nadalje, otkriveno je kako i uklanjanje molekula dvolančane RNA, nužnih nusprodukata *in vitro* transkripcije, znatno doprinosi redukciji indukcije nespecifične imunosti (Verbeke i sur. 2021). Razvijeni su brojni protokoli za uklanjanje dvolančane RNA koji uglavnom uključuju kromatografske metode, npr. tekućinsku kromatografiju brzih proteina (Pardi i sur. 2018). U jednom istraživanju utvrđeno je kako se proizvodnja proteina iz *in vitro* transkribirane RNA povećala za 1000 puta nakon pročišćavanja spomenutom metodom (Karikó i sur. 2011).

Također, učinjeno je mnogo i na polju dostave mRNA u stanicu što je izuzetno bitno uzevši u obzir da će se u primatelju cjepiva stvoriti onoliko antigena koliko mRNA završi u stanici (Verbeke i sur. 2021), a gola RNA veoma je podložna djelovanju izvanstaničnih RNaza (Pardi i sur. 2018). Razvijene su, primjerice, lipidne nanočestice. One se uglavnom sastoje od glavnog lipida koji se može protonirati i deprotonirati te pomoćnih lipida koji potpomažu

stabilnost lipidnih nanočestica te potiču endosomalni bijeg (Verbeke i sur. 2021). Sastavljanje lipidnih nanočestica odvija se pri niskom pH što potiče protonaciju lipida, a time i povoljnu interakciju negativno nabijene RNA i, u tim uvjetima, pozitivnih lipidnih čestica. Smjesa se u konačnici neutralizira, procesom dijalize, naprimjer. U sastav cjepiva s lipidnim nanočesticama često se uključuje i polietilen glikol koji sprečava agregaciju nanočestica tijekom proizvodnje i pohrane. Lipidne nanočestice u stanice ulaze endocitozom pri čemu sadržaj najvećeg broja nastalih endosoma biva razgrađen u lizosomu dok se manja količina uspije otpustiti iz endosoma procesom endosomalnog bijega. Iako još nije posve jasno kako se endosomalni bijeg odvija, pretpostavlja se da se kationski lipidi nanočestice protoniraju zbog niskog endosomalnog pH te da zbog toga dolazi do lipidne izmjene između nanočestice te dvosloja endosoma. Pritom, lipidi iz nanočestica prelaze iz lamelarne u heksagonalnu fazu, a mRNA ih tada mogu napustiti. Moguće je kako navedeni procesi utječu i na stabilnost endosomalne membrane pa da mRNA može izaći i iz endosoma i tako konačno dospjeti u citoplazmu. No, dostava mRNA u stanice može se obaviti i *ex vivo* (Pardi i sur. 2018). Dendritičke stanice uzete iz pacijenta podvrgavaju se elektroporaciji za vrijeme koje mRNA ulazi kroz membranske pore, nakon čega se transfecirane stanice ubrizgavaju u pacijenta. Ovaj pristup dopušta unos gole mRNA čuvajući visoku djelotvornost transfekcije, no istovremeno je to jedan skup i kompliciran proces. Od ostalih načina unosa mRNA cjepiva ističu se *in vivo* elektroporacija te metoda *gene gun* koji su objašnjeni u potpoglavlju o DNA cjepivima.

Kako bi se željena mRNA uopće proizvela *in vitro* prvo se pripadajuća DNA mora proizvesti u *E. coli*, a zatim izolirati i linearizirati restrikcijskim enzimima kako bi poslužila kao kalup za DNA-ovisnu RNA polimerazu koja stvara transkripte s poli-A repom (Pardi i sur. 2018). Alternativno, poli-A rep može se dodati naknadno djelovanjem poli-A polimeraze (Verbeke i sur. 2021). Potom, DNA kalup uklanja se inkubacijom u prisustvu DNaze (Pardi i sur. 2018). Zatim se enzimski ili kemijski na 5' kraj transkripta dodaje kapa. Dobivena RNA na kraju prolazi različite postupke pročišćavanja koji mogu uključivati i spomenuto uklanjanje dvolančane RNA. Konačna RNA, otopljena u puferu koji često sadrži inhibitore RNaza, poput helatora, prolazi filter-sterilizaciju kako bi se oslobodila potencijalnih kontaminanata. Uključivanje te dizajn nekodirajućih elemenata poput 5' kape, poli-A repa i netranslatirajućih regija (UTR) u strukturu mRNA pozitivno utječu na razinu translacije mRNA te na vrijeme poluživota. S ciljem

povećanja antigenskog prinosa, često se, pri dizajnu željene mRNA, poseže i za kodonskom optimizacijom (Verbeke i sur. 2021).

Osim klasičnih RNA cjepiva u kojima RNA kodira za antigen, proučavaju se i samoreplicirajuća RNA cjepiva u kojima RNA, osim za antigen, kodira i za replikacijsku mašineriju virusa (Pardi i sur. 2018). Budući da se u samoreplicirajućih RNA cjepiva RNA iznova proizvodi replikacijom, za postizanje željenog efekta potrebna je puno manja doza u usporedbi s nereplicirajućim RNA cjepivima.

Cjepivo zasnovano na mRNA, za razliku od DNA cjepiva, ne mora dospjeti u jezgru kako bi ispunilo svoju funkciju, već je za translaciju dovoljno da mRNA stigne do ribosoma koji se nalaze u citoplazmi ili na endoplazmatskom retikulumu (Kyriakidis i sur. 2021). Velika prednost mRNA cjepiva u odnosu na DNA cjepiva leži i u tome što ne postoji opasnost od insercijske mutageneze jer se mRNA ne ugrađuje u genom (Pardi i sur. 2018). Također, RNA se u stanicama razgrađuje normalnim prirodnim procesima, a njen stanični poluživot može se regulirati raznim modifikacijama molekule i načinom dostave mRNA u stanicu. Ipak, treba imati na umu kako je RNA nestabilnija molekula od DNA pa se, za dužu pohranu, mRNA cjepiva moraju čuvati uglavnom na temperaturama između -20 i -70 °C što značajno otežava distribuciju cjepiva (Kyriakidis i sur. 2021).

Zaključno s 27. srpnjem 2021., 18 je RNA cjepiva protiv SARS-CoV-2 u kliničkoj fazi razvoja, a dva cjepiva puštena su na tržište: cjepivo Spikevax tvrtke Moderna razvijeno u suradnji s National Institute of Allergy and Infectious Diseases te cjepivo Comirnaty tvrtki Pfizer i BioNTech (www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Iako su oba cjepiva temeljena na mRNA koja kodira za rekombinantni protein S stabiliziran u prefuzijskoj konformaciji, ona se razlikuju u mnogobrojnim značajkama kao što su sastav lipidne nanočestice, kodonska optimizacija, slijed 5'-UTR i 3'-UTR itd. (Xia 2021). Primjerice, u Moderninu cjepivu kao 3'-UTR poslužilo je 110 nukleotida iz 3' netranslatirajuće regije α -globinskog gena na temelju jake i djelotvorne ekspresije toga gena u ljudskim stanicama. S druge strane, kod dizajna 3' netranslatirajuće regije koja je korištena u cjepivu Comirnaty, cilj je bio pronaći RNA segmente koji se pojavljuju u prirodi, a koji imaju bolje karakteristike od 3'-UTR-a ljudskog β -globinskog gena. U tu svrhu korištena je „cell culture-based method for the systematic enrichment of naturally occurring RNA sequences that improve the kinetics of gene-encoding mRNA *in vitro* and *in vivo* when used as 3' UTRs“

(Orlandini von Niessen i sur. 2019). Dva su segmenta koja su pokazala bolje značajke od 3'-UTR-a ljudskog β -globinskog gena, a pripadaju slijedovima iz ljudske mitohondrijske 12S rRNA te ljudskog gena *AES/TLE5* (Xia 2021). Na osnovu toga, razvijena je 3'-UTR cjepiva Comirnaty, a koja je sazdana od 136 nukleotida dugog segmenta iz gena *AES/TLE5* nakon kojeg slijedi segment od 139 nukleotida iz mitohondrijske 12S rRNA.

S ciljem izbjegavanja odgovora nespecifične imunosti preko smanjenja aktivacije *toll-like* receptora i staničnih RNA senzora, u oba cjepiva svi su uridini zamijenjeni N1-metil-pseudouridinom, a iz istog razloga u pripremi cjepiva uključen je i korak pročišćavanja jednolančane RNA od dvolančane (Verbeke i sur. 2021). Oba cjepiva kao platformu za unos mRNA u stanice koriste lipidne nanočestice građene od glavnog lipida i pomoćnih lipida sličnog kemijskog sastava. Ipak, valja reći kako mala nepodudaranja u strukturi lipidnih nanočestica mogu rezultirati u značajnim razlikama u djelotvornosti dostave mRNA u citoplazmu i imunogeničnosti. U Moderninu cjepiva glavni lipidni sastojak jest lipid SM-102, a u Pfizer-BioNTechovu cjepivu lipid ALC-0315. Od pomoćnih lipida, u oba cjepiva nalaze se, između ostalih, i različiti derivati ranije spomenutog polietilen-glikola. Što se tiče poticanja stanične imunosti, u kliničkim fazama razvoja utvrđeno je kako oba cjepiva induciraju proizvodnju CD4⁺ stanica specifičnih za regije S1 i S2 proteina S. Pfizer-BioNTechovo cjepivo izazvalo je i proizvodnju značajnih razina specifičnih CD8⁺ stanica u više od 90% ispitanika dok je u Modernina cjepiva proizvodnja istih stanica zanemariva. Kad je riječ o humoralnoj imunosti, u oba cjepiva zabilježen je viši titar antitijela nego u osoba koji su preboljeli COVID-19. Oba cjepiva zasad se primjenjuju u dvije doze, sa 100 μ g cjepiva po dozi, u slučaju Modernina cjepiva, te 30 μ g, u slučaju Pfizer-BioNTechova cjepiva. Velika logistička manjkavost ovih dvaju cjepiva jest temperatura skladištenja: za Modernino cjepivo -20 °C te za Pfizer-BioNTechovo cjepivo čak -70 °C (AboulFotouh i sur. 2021). Zaključno s 28. srpnjem 2021., Pfizer-BioNTechovo cjepivo prednjači s više od 327 milijuna doza podijeljenih na području EU (<https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#distribution-tab>). Prema istom izvoru, podijeljeno je više od 42 milijuna Modernina cjepiva. Kao veoma uobičajene nuspojave Pfizer-BioNTechova cjepiva navode se bol i oticanje na mjestu injekcije, glavobolja, umor, vrućica, bol u mišićima itd. dok kao uobičajene nuspojave ističu se mučnina, povraćanje te crvenilo oko mjesta injekcije (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>). Među neuobičajenim

nuspojavama prisutni su povećanje limfnih čvorova, nesanica, alergijske reakcije poput osipa i svrbež, a među rijetkim npr. alergijske reakcije poput oticanja lica. Prema izvještaju Europske agenciju za lijekove, s Pfizer-BioNTechovim cjepivom povezano je 145 slučajeva miokarditisa te 138 slučajeva perikarditisa, zaključno s 31. svibnjem 2021., kada je na europskom području bilo podijeljeno nešto manje od 180 milijuna doza cjepiva (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>). Pet slučajeva završilo je smrtnim ishodom. Prema istom izvješću, zaključno s 4. srpnjem 2021., kada je na području EU bilo primijenjeno nešto više od 275 milijuna doza Pfizer-BioNTechova cjepiva, prijavljeno je 3848 smrtnih slučajeva koji su uslijedili nakon administracije cjepiva. To naravno ne potvrđuje, ali i ne isključuje cjepivo kao uzrok tih smrti. Kad je u pitanju Modernino cjepivo, kao veoma uobičajene nuspojave ističu se bol i oticanje na mjestu injekcije, povećani limfni čvorovi, bol u mišićima i zglobovima, mučnina, povraćanje, glavobolja, vrućica itd. Od uobičajenih nuspojava pojavljuju se, primjerice, osip, od neuobičajenih vrtoglavica i svrbež na mjestu injekcije, a od rijetkih oticanje lica (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna>). Nakon primanja Modernina cjepiva mogući su slučajevi perikarditisa i miokarditisa sa sličnim frekvencijama kao i u Pfizer-BioNTechova cjepiva.

6. Važnost adjuvanata kao sastavnica cjepiva

Adjuvanti su agensi koji se dodaju u cjepiva s ciljem povećanja i modulacije imunogeničnosti antigena koji se nalaze u cjepivu (Garçon i Friede 2018) iako sami nemaju antigenična svojstva (Warren i Leclerc 1998), a to uglavnom čine aktivirajući dodatne stanične receptore (Chung i sur. 2020). Upotrebom adjuvanata u cjepivima smanjuje se broj potrebnih doza za uspostavu odgovarajuće zaštite, produžuje se trajanje imunosti, omogućuje se proširenje imunogenog odgovora na veći broj antigena te se pojačava imunogeni odgovor u organizama sa slabijim imunogenim sustavom kao što su, primjerice, ljudi starije životne dobi (Garçon i Friede 2018).

Cjepiva protiv virusa SARS-CoV-2 također zahtijevaju upotrebu određenih adjuvanata za uspostavu odgovarajućeg tipa i jačine imunogenog odgovora. Ovisno o vrsti adjuvanta koji se dodaje u cjepivo, isti antigeni daju različite imunogenne profile (Liang i sur. 2020). U mRNA cjepiva te cjepiva s adenovirusnim vektorom često nije potrebno dodati adjuvant jer mRNA, odnosno adenovirusna čestica koja sadrži DNA, same sadrže imunostimulativna svojstva dovoljna za poticanje zadovoljavajućeg imunogenog odgovora (Teijaro i Farber 2021). Moguće je, u mRNA cjepiva, kako se i sama lipidna nanočestica, koja sačinjava kapsulu oko mRNA molekule, ponaša kao adjuvant (Chung i sur. 2020). Stoga, zbog intrinzičnih imunostimulativnih svojstava njihovih komponenti, jasno je zašto u mRNA cjepiva tvrtki Moderna i Pfizer-BioNTech, te cjepiva s adenovirusnim vektorom tvrtke AstraZeneca, nije navedeno prisustvo dodatnih adjuvanata. Ulogu adjuvanta u već spomenutom cjepivu tvrtke Novavax, primjerice, ima Matrix-M, supstancija zasnovana na saponinu, koja povećava imunogeničnost cjepiva mobilizirajući antigen-prezentirajuće stanice na mjesto injekcije što stimulira indukciju stanične imunosti (<https://ir.novavax.com/press-releases>). Cjepivo je prvi put ispitivano na životinjama poput miševa i babuna, u pretkliničkim fazama razvoja, u kojima je i dokazano kako dodatak Matrix-M adjuvanta značajno povećava titar proizvedenih antitijela te snažno inducira proizvodnju T-stanica (Kyriakidis i sur. 2021). Covax-19, cjepivo tvrtke Vaxine pak, temeljeno na rekombinantnom proteinu S, kao adjuvant koristi Advax – polisaharidnu mikročesticu koja, za razliku od drugih adjuvanata, potiče imunostimulativnu

prirodu samog antigena koji se nalazi u cjepivu (Hayashi i sur. 2017). Cjepivo Covax-19 30. lipnja 2021. ušlo je u prvu fazu kliničkog ispitivanja (<https://vaxine.net/projects/>). Tvrtka GlaxoSmithKline (GSK), primjerice, svoj je proizvod, adjuvant AS03, nudila drugim tvrtkama kako bi ga potencijalno uključile u svoje cjepivo (Liang i sur. 2020). Adjuvant AS03 sastoji se od skvalena, polisorbata 80 i α -tokoferola u *oil-in-water* emulziji (Garçon i sur. 2012). On pripada većoj skupini emulzijskih adjuvanata koji potiču preuzimanje antigena, migraciju antigen-prezentirajućih stanica te mobilizaciju imunskih stanica koje posreduju u aktivaciji stanične imunosti (Liang i sur. 2020). GSK je, između ostalih, uspostavio suradnju i s tvrtkom Sanofi u razvoju cjepiva temeljenog na rekombinantnom proteinu S, koje je 27. svibnja 2021. ušlo u treću fazu kliničkog ispitivanja (www.sanofi.com/en/our-covid-19-vaccine-candidates/recombinant-vaccine). U dvama kineskim cjepivima spomenutim ranije, CoronaVac i BBIBP-CorV, „alum“ je naveden kao korišteni adjuvant. Riječ je o velikoj skupini adjuvanata temeljenih na aluminijevim solima. Iako su u upotrebi već dugi niz godina, mehanizam njihova adjuvantnog djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen (De Gregorio i sur. 2008). Pretpostavlja se da aluminijeve soli potiču oštećenje staničja na mjestu injekcije što dovodi do otpuštanja molekularnih obrazaca koji privlače neutrofile, eozinofile i limfocite (Tizard 2021). Neutrofili otpuštaju ekstracelularne zamke (komplekse kromosomske DNA, histona i granularnih proteina) koje osnažuju djelovanje antigen-prezentirajućih stanica. Aluminijeve soli utječu i na migraciju antigen-prezentirajućih stanica prema limfnim čvorovima. Indirektno, aluminijeve soli potiču aktivaciju T_H2 -stanica koje imaju značajnu ulogu u razvijanju humoralne imunosti. Ipak, aluminijeve soli nemaju svoj doprinos u izazivanju stanične imunosti, za razliku od emulzijskih adjuvanata. Još jedna važna skupina adjuvanata jesu i ligandi *toll-like* receptora koji sudjeluju u prepoznavanju molekularnih obrazaca patogenih mikroorganizama, stvaranju upalnih procesa, regulaciji ekspresije citokina, i u konačnici, u indirektnoj aktivaciji adaptivne imunosti (Khanmohammadi i Rezaei 2021). U razvitku cjepiva CoVLP tvrtke Medicago korišten je adjuvant iz te skupine, CpG.

7. Emergencija novih varijanti virusa SARS-CoV-2

Iako je RNA virus, SARS-CoV-2 ima nisku mutacijsku stopu zahvaljujući *proofreading* aktivnosti svoje RNA polimeraze (Boehm i sur. 2021). Ipak, ogroman broj zaraženih otvara veće mogućnosti za pojavu određenih mutacija koje će se selekcijski očuvati, posebice u stanju visokog postotka preboljelih i cijepljenih (Boehm i sur. 2021). U prvom redu to su mutacije koje mijenjaju antigenski fenotip, a koje omogućuju virusu da izbjegne stečeni imunitet populacije (Harvey i sur. 2021). Tijekom pandemije COVID-19, pojavile su se i varijante virusa SARS-CoV-2 s višestrukim mutacijama koje karakteriziraju povećana prenosivost i virulencija, smanjeni odgovor na dostupnu dijagnostiku i cjepiva te drugačija klinička slika bolesnika, a klasificirane su kao varijante od značaja (www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update). Zaključno s 23. srpnjem 2021., četiri su varijante od značaja: alfa, beta, gama i delta (www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/).

Alfa varijantu, koja je poznata i kao britanska, definira 14 aminokiselinskih supstitucija, pri čemu ih se 10 nalazi u RBD, te šest aminokiselinskih delecija. Navest ću neke od značajnijih. Supstitucija aspartata glicinom na poziciji 614 (D614G) uzrokuje veću prenosivost i infektivnost virusa (Bian i sur. 2021). U pacijentima zaraženima virusom G614, u usporedbi s onima zaraženim divljim tipom, uočena je pojačana replikacija virusa u stanicama, no, ona nije rezultirala povećanjem ozbiljnosti same bolesti. Prevalencija ove mutacije do lipnja 2020. narasla je na 75 % unatoč tome što je bila nedetektabilna u siječnju 2020. Mutacijom N501Y, unutar RBD-a, povećava se virusni afinitet za receptor ACE2 što može kao izravnu posljedicu imati veću prenosivost virusa u populaciji. Tu je još, primjerice, mutacija $\Delta 69-70$ koja uzrokuje povećanu infektivnost virusa (Boehm i sur. 2021). Rezultati sugeriraju kako je prenosivost ove varijante veća za 43-82% u odnosu na divlji tip. Ipak, istraživanja su pokazala kako alfa varijanta ne rezultira ozbiljnijom bolešću, a toj tezi ide u prilog i činjenica da ova varijanta sadrži i *null* mutaciju u slijedu *orf8* koja se povezuje s blažom bolešću. Prevalencija alfa varijante u Europi tijekom lipnja i srpnja 2021. značajno je pala te je sada gotovo na ništici, no tijekom proljetnih mjeseci 2021. bila je preko 80% (https://cov-lineages.org/global_report_B.1.1.7.html).

Beta varijanta, također poznata i po svom južnoafričkom podrijetlu, sadrži 18 aminokiselinskih supstitucija te tri delecije u odnosu na divlji tip (Boehm i sur. 2021). Kao i u alfa varijante, prisutna je mutacija D614G te N501Y. Od značajnijih mutacija beta varijante koje ne sadrži alfa, tu je mutacija K417N koja pospješuje izbjegavanje protutijela povezanih sa starijim virusnim varijantama. Iako spomenuta mutacija snižava afinitet virusne čestice za stanični receptor, to je kompenzirano prisustvom mutacije N510Y. Prisutna je i mutacija E484K, povezana s povećanjem afiniteta za ACE2 receptor, te kao i K417N, s izbjegavanjem neutralizirajućih antitijela protiv ranijih varijanti virusa SARS-CoV-2. Navodi se kako je prenosivost beta varijante, u usporedbi s divljim tipom, otprilike 1,5 puta veća. Beta varijanta diljem svijeta je u padu, ali krajem 2020. i početkom 2021. sačinjavala je preko 80% slučajeva zaraze virusom SARS-CoV-2 u Africi (https://cov-lineages.org/global_report_B.1.351.html).

Treća varijanta od značaja, gama, bila je povezana sa slučajevima reinfekcije u Brazilu što sugerira da mutacije prisutne u toj varijanti omogućuju zaobilaznje imuniteta stečenog ranijim varijantama (Harvey i sur. 2021). Brazilska varijanta također sadrži mutacije D614G, N501Y i E484K (Boehm i sur. 2021). Za razliku od beta varijante u koje je lizin na poziciji 417 mutirao u asparagin, u gama varijante na istoj poziciji mjesto je ustupljeno drugoj polarnoj nenabijenoj aminokiselini – treoninu. Od mutacija koje nisu bili prisutne u prvih varijanti može se izdvojiti mutacija H655Y koja doprinosi izbjegavanju monoklonskih protutijela povezanih sa starijim varijantama virusa. Analize su utvrdile kako je prenosivost brazilske varijante, u usporedbi s divljim tipom, 1,7 do 2,4 puta veća (Harvey i sur. 2021). Točnije, utvrđeno je kako zaštita od ponovne infekcije brazilskom varijantom, u slučaju da prva infekcija nije bila uzrokovana njome, iznosi 54-79%. Gama varijanta nije se nametnula na području Europe, no na području Južne Amerike i u kolovozu 2021. zadržava visoku prevalenciju (https://cov-lineages.org/global_report_P.1.html).

Najaktualnija varijanta od značaja svakako je delta (indijska) varijanta čija se prevalencija u Europi samo od lipnja 2021. do kolovoza 2021. popela s 20% na više od 90% (https://cov-lineages.org/global_report_B.1.617.2.html). Kao i u prethodnim varijantama, prisutna je mutacija D614G. Ovu varijantu karakterizira nekoliko mutacija kojih nije bilo u prvim trima varijantama, kao što je, primjerice, P681R, za koju je pokazano da rezultira povećanom stopom replikacije, a time i koncentracije virusa u organizmu, te dovodi do porasta prenosivosti u populaciji (Boehm i sur. 2021). Količina virusa u pacijentu zaraženom

delta varijantom preko tisuću je puta veća od količine divljeg tipa virusa u pacijenata koji su bili zaraženi na početku pandemije (Reardon 2021). Kad se tome pridoda da je i inkubacijsko vrijeme delta varijante značajno kraće, ne čude procjene koje govore da je prenosivost delta varijante, u usporedbi s divljim tipom, dvaput veća. U delta varijante prisutna je i mutacija L425R koja uzrokuje smanjenje neutralizacijske aktivnosti mnogih monoklonskih antitijela u usporedbi s divljim tipom. Time ta mutacija pomaže izbjegavanju imunosnog odgovora imuniziranih i preboljelih (Harvey i sur. 2021).

Uglavnom, laboratorijske studije djelotvornosti cjepiva protiv virusnih varijanti ispituju koliko je puta neutralizacijska aktivnost seruma (koncentracija seruma pri kojoj je postignuta 50%-tna neutralizacija - naprimjer, redukcija infekcije stanica u kulturi) s varijantom veća/manja od neutralizacijske aktivnosti seruma s divljim tipom virusa, pri čemu je serum izoliran iz cijepljenih volontera (Harvey i sur. 2021). Neutralizacijska aktivnost u eksperimentu s alfa varijantom bila je 2 puta manja, u slučaju cjepiva Spikevax (proizvođača Moderna), te 1,8 puta manja u slučaju cjepiva Comirnaty (proizvođača Pfizer-BioNTech) (Wang i sur. 2021). U istoj analizi utvrđena je, u slučaju Pfizer-BioNTechova cjepiva, 6,5 puta manja neutralizacijska aktivnost u eksperimentu s beta varijantom te 8,6 puta manja, u slučaju Modernina cjepiva. U gama varijante, u usporedbi s divljim tipom, neutralizacijska aktivnost seruma iz ispitanika cijepljenih Pfizer-BioNTechovim cjepivom pada 6,7 puta, a Moderninim cjepivom 4,5 puta (Garcia-Beltran i sur. 2021). Neutralizacijska aktivnost u eksperimentu s delta varijantom, u slučaju Pfizer-BioNTechova cjepiva, 9,6 puta je manja (Davis i sur. 2021).

Osim laboratorijskih studija, postoje podatci i iz kliničkih ispitivanja o efikasnosti cjepiva protiv varijanti virusa SARS-CoV-2. Primjerice, podatci sugeriraju kako cjepivo Vaxzevria (proizvođača AstraZeneca), s učinkovitošću od samo 10,4%, ne uspijeva pružiti adekvatnu zaštitu protiv južnoafričke varijante (Harvey i sur. 2021). Isto cjepivo, s djelotvornošću od 66,1% protiv britanske i 59,8% protiv indijske varijante, ne nudi najbolju zaštitu ni od te dvije varijante (Bernal i sur. 2021). Cjepivo Comirnaty omogućuje značajno bolju zaštitu – 93,4% od britanske varijante te 87,9% od indijske (Bernal i sur. 2021). Cjepivo Janssen, s učinkovitošću od 57%, ne štiti visokom učinkovitošću protiv južnoafričke varijante (Harvey i sur. 2021).

Očito je kako se susrećemo te ćemo se i u budućnosti susretati s pojavom novih varijanti s promijenjenom antigenošću koja rezultira određenom otpornošću na imunost

izazvanu dosadašnjim cijepljenjem. Da bi djelotvornost cjepiva kojima raspolažemo ostala na vrhunskoj razini moraju se ispitati nove strategije. Kako bi se povećale razine antitijela, razmatra se docjepljivanje jednom dozom više no što je bilo predviđeno, što podrazumijeva primjenu druge doze u slučaju Janssenova cjepiva ili treće doze u slučaju Modernina cjepiva, primjerice (Bian i sur. 2021). Analizira se i kombinacija već postojećih cjepiva različitih proizvođača. U istraživanju sveučilišta Oxford proučava se učinak Pfizer-BioNTechova cjepiva u kombinaciji s AstraZenecinim cjepivom u dvije doze u četiri moguće inačice. Jedna od atraktivnijih opcija svakako je razvoj multivalentnih cjepiva, tj. cjepiva koji uključuju antigene dvaju ili više varijanti virusa. Moderna je već razvila cjepivo protiv beta varijante (mRNA-1273.351), a u ispituje se i bivalentno cjepivo koje se sastoji od originalnog cjepiva (mRNA-1273) i spomenutog cjepiva protiv beta varijante u omjeru 1:1 (<https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-positive-initial-booster-data-against-sars-cov/>). Bilo bi od ogromne koristi razviti modele koji će moći predvidjeti evolucijske putove kojima nastaju nove varijante, kao što je to već slučaj u virusa gripe, na temelju kojih će se moći razviti dorađena cjepiva kojima su meta varijante čija je incidencija usponu (Harvey i sur. 2021).

8. Zaključak

Čovječanstvo je suočeno s pandemijom bolesti COVID-19 koja je odnijela milijune života diljem svijeta te nanijela ogromne štete na području ekonomije i društvenog života. Iako je čovječanstvo bilo primorano naviknuti se na „novo normalno“, čini se sve kako bi se uspostavio stari *status quo*. Budući da se unatoč striktnim protumjerama pandemiji ne nazire kraj, cjepivo se nameće kao jedino konačno rješenje. Na samom početku, od prijeko važnosti bilo je upoznati se s biologijom virusa SARS-CoV-2, sekvencionirati virusni genom te odabrati najbolju metu za razvoj cjepiva. U toj fazi pomogla su i znanja prikupljena tijekom emergencije dvaju betakoronavirusa (SARS-CoV-1 i MERS-CoV) ranije u ovom stoljeću. Pandemijski uvjeti natjerali su znanstveni svijet da se okrene novijim strategijama razvoja cjepiva, kao što su cjepiva temeljena na nukleinskoj kiselini čija su jednostavnost te brzina dizajna i proizvodnje od iznimnog značaja. Napredci na području znanosti, izdašne financijske potpore u razvoju i testiranju cjepiva kandidata, ulaganje u uspješnu distribuciju i primjenu cjepiva te kampanje vlada i svjetskih organizacija o presudnosti cijepljenja u suzbijanju pandemije rezultiralo je potpunim cijepljenjem više od 50% ljudi na području Europske unije u manje od dvije godine od pojave prvih registriranih slučajeva zaraze (https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL). Ipak, uvjeti visokog postotka imunosti populacije, uzrokovani bilo cijepljenjem bilo preboljenjem bolesti COVID-19, favoriziraju pojavu novih varijanti virusa koje u određenoj mjeri uspijevaju izbjeći stečeni imunitet. Stoga, morat će se razviti nove strategije i modeli u dizajnu i proizvodnji cjepiva kako bi se pravovremeno odgovorilo na nove uvjete u prevalenciji varijanti virusa SARS-CoV-2 te da bi se, u konačnici, proglasio dugo iščekivani kraj pandemije.

9. Literatura

1. AboulFotouh, K., Cui, Z. i Williams, R. O. (2021). Next-generation COVID-19 vaccines should take efficiency of distribution into consideration. *AAPS PharmSciTech*, 22(3).
2. Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S. i sur. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 26(7), 1033–1036.
3. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I. i sur. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450–452.
4. Artaud, C., Kara, L. i Launay, O. (2019). Vaccine Development: From preclinical studies to phase 1/2 clinical trials. U *Methods in Molecular Biology* (pp. 165–176). Springer New York.
5. Ball, P. (2020). The lightning-fast quest for COVID vaccines — and what it means for other diseases. *Nature*, 589(7840), 16–18.
6. Berche, P. (2012). Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 1–6.
7. Bernal, J. L., Andrews, N., Gower, C. i sur. (2021). Effectiveness of COVID-19 vaccines against the B.1.617.2 variant. Cold Spring Harbor Laboratory.
8. Bian, L., Gao, F., Zhang, J. i sur. (2021). Effects of SARS-CoV-2 variants on vaccine efficacy and response strategies. *Expert Review of Vaccines*, 20(4), 365–373.
9. Boehm, E., Kronig, I., Neher, R. A. i sur. (2021). Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(8), 1109–1117.
10. Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M. i sur. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801–8811.
11. Chi, X., Yan, R., Zhang, J. i sur. (2020). A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*, 369(6504), 650–655.
12. Chung, Y. H., Beiss, V., Fiering, S. N. i sur. (2020). COVID-19 vaccine frontrunners and their nanotechnology design. *ACS Nano*, 14(10), 12522–12537.
13. Cunningham, A. L., Garçon, N., Leo, O. i sur. (2016). Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*, 34(52), 6655–6664.
14. Dai, L. i Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 73–82.

15. Davis, C., Logan, N., Tyson, G. i sur. (2021). Reduced neutralisation of the Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2 variant of concern following vaccination. Cold Spring Harbor Laboratory.
16. De Gregorio, E., Tritto, E. i Rappuoli, R. (2008). Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *European Journal of Immunology*, 38(8), 2068–2071.
17. Deplanque, D. i Launay, O. (2021). Efficacy of COVID-19 vaccines: From clinical trials to real life. *Therapies*, 76(4), 277–283.
18. Dey, A., Chozhavel Rajanathan, T. M., Chandra, H. i sur. (2021). Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine*, 39(30), 4108–4116.
19. Eckert, D. M. i Kim, P. S. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 777–810.
20. Gao, Q., Bao, L., Mao, H. i sur. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, 369(6499), 77–81.
21. Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., St. Denis, K. i sur. (2021). Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*, 184(9), 2372–2383.
22. Garçon, N. i Friede, M. (2018). Evolution of adjuvants across the centuries. U Plotkin’s *Vaccines* (pp. 61-74.). Elsevier.
23. Garçon, N., Vaughn, D. W. i Didierlaurent, A. M. (2012). Development and evaluation of AS03, an adjuvant system containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Review of Vaccines*, 11(3), 349–366.
24. Grant, O. C., Montgomery, D., Ito, K. i sur. (2020). Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. *Scientific Reports*, 10(1).
25. Grgacic, E. V. L. i Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60–65.
26. Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I. i sur. (2020). Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 181(7), 1489–1501.
27. Harrison, S. C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology*, 479–480, 498–507.
28. Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B. i sur. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 409–424.
29. Hasan, A., Paray, B. A., Hussain, A. i sur. (2020). A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(8), 3025–3033.
30. Hayashi, M., Aoshi, T., Haseda, Y. i sur. (2017). Advax, a delta inulin microparticle, potentiates in-built adjuvant property of co-administered vaccines. *EBioMedicine*, 15, 127–136.

31. Henderson, D. A. (2011). The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future. *Vaccine*, 29, D7–D9.
32. Hobernik, D. i Bros, M. (2018). DNA vaccines—How far from clinical use? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3605.
33. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. i sur. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141–1149.
34. Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. i sur. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(21), e142.
35. Khailany, R. A., Safdar, M. i Ozaslan, M. (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*, 19, 100682.
36. Khanmohammadi, S. i Rezaei, N. (2021). Role of toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(5), 2735–2739.
37. Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, 586(7830), 516–527.
38. Kumar, A., Dowling, W. E., Román, R. G. i sur. (2021). Status report on COVID-19 vaccines development. *Current Infectious Disease Reports*, 23(6).
39. Kutzler, M. A. i Weiner, D. B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, 9(10), 776–788.
40. Kyriakidis, N. C., López-Cortés, A., González, E. V. i sur. (2021). SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *Npj Vaccines*, 6(1), 28.
41. Lambricht, L., Lopes, A., Kos, S. i sur. (2015). Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(2), 295–310.
42. Liang, Z., Zhu, H., Wang, X. i sur. (2020). Adjuvants for coronavirus vaccines. *Frontiers in Immunology*, 11, 589833.
43. Lu, R., Zhao, X., Li, J. i sur. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574.
44. Lurie, N., Saville, M., Hatchett, R. i sur. (2020). Developing COVID-19 vaccines at pandemic speed. *New England Journal of Medicine*, 382(21), 1969–1973.
45. Ma, J., Su, D., Sun, Y. i sur. (2021). Cryo-electron microscopy structure of S-trimer, a subunit vaccine candidate for COVID-19. *Journal of Virology*, 95(11).
46. MacLean, O. A., Lytras, S., Weaver, S. i sur. (2021). Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen. *Public Library of Science Biology*, 19(3),

47. Millet, J. K. i Whittaker, G. R. (2018). Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells. *Virology*, 517, 3–8.
48. Nogrady, B. (2021). Mounting evidence suggests Sputnik COVID vaccine is safe and effective. *Nature*, 595(7867), 339–340.
49. Orlandini von Niessen, A. G., Poleganov, M. A., Rechner, C. i sur. (2019). Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular Therapy*, 27(4), 824–836.
50. Pallesen, J., Wang, N., Corbett, K. S. i sur. (2017). Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), E7348–E7357.
51. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. i sur. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279.
52. Parrish, C. R., Holmes, E. C., Morens, D. M. i sur. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 457–470.
53. Preiss, S., Garçon, N., Cunningham, A. L. i sur. (2016). Vaccine provision: Delivering sustained & widespread use. *Vaccine*, 34(52), 6665–6671.
54. Raska, M. i Turanek, J. (2015). DNA vaccines for the induction of immune responses in mucosal tissues. *U Mucosal Immunology* (pp. 1307–1335). Elsevier.
55. Reardon, S. (2021). How the Delta variant achieves its ultrafast spread. *Nature*.
56. Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R. i sur. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176.
57. Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A. i sur. (2021). Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against COVID-19. *New England Journal of Medicine*, 384(23), 2187–2201.
58. Sariol, A. i Perlman, S. (2020). Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*, 53(2), 248–263.
59. Shin, M. D., Shukla, S., Chung, Y. H. i sur. (2020). COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. *Nature Nanotechnology*, 15(8), 646–655.
60. Stauff, C. B., Yang, C., Coleman, J. R. i sur. (2019). Live-attenuated H1N1 influenza vaccine candidate displays potent efficacy in mice and ferrets. *Public Library of Science One*, 14(10).
61. Suschak, J. J., Williams, J. A. i Schmaljohn, C. S. (2017). Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(12), 2837–2848.

62. Tebas, P., Yang, S., Boyer, J. D. i sur. (2021). Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, phase 1 clinical trial. *EClinicalMedicine*, 31, 100689.
63. Teijaro, J. R. i Farber, D. L. (2021). COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nature Reviews Immunology*, 21(4), 195–197.
64. Tizard I. R. (2021). Adjuvants and adjuvanticity. *Vaccines for Veterinarians*, 75–86.
65. Troyano-Hernández, P., Reinosá, R. i Holguín, Á. (2021). Evolution of SARS-CoV-2 envelope, membrane, nucleocapsid, and spike structural proteins from the beginning of the pandemic to September 2020: A global and regional approach by epidemiological week. *Viruses*, 13(2), 243.
66. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. i sur. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170.
67. Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C. i sur. (2021). The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *Journal of Controlled Release*, 333, 511–520.
68. Wan, Y., Shang, J., Graham, R. i sur. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7).
69. Wang, H., Zhang, Y., Huang, B. i sur. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell*, 182(3), 713-721.
70. Wang, P., Nair, M. S., Liu, L. i sur. (2021). Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*, 593(7857), 130-135.
71. Warren, H. S. i Leclerc, C. (1998). Adjuvants. U P. J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology* (pp. 36-39). Elsevier.
72. Wouters, O. J., Shadlen, K. C., Salcher-Konrad, M. i sur. (2021). Challenges in ensuring global access to COVID-19 vaccines: production, affordability, allocation, and deployment. *The Lancet*, 397(10278), 1023–1034.
73. Xia, X. (2021). Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines. *Vaccines*, 9(7), 734.
74. Xu, Z., Shi, L., Wang, Y. i sur. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(4), 420–422.
75. Yan, Y., Chang, L. i Wang, L. (2020). Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology*, 30(3).
76. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G. i sur. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273.
77. <https://covid19.who.int/> (pristupljeno 3.8.2021.)

78. https://cov-lineages.org/global_report_B.1.1.7.html (pristupljeno 1.8.2021.)
79. https://cov-lineages.org/global_report_B.1.351.html (pristupljeno 1.8.2021.)
80. https://cov-lineages.org/global_report_B.1.617.2.html (pristupljeno 1.8.2021.)
81. https://cov-lineages.org/global_report_P.1.html (pristupljeno 1.8.2021.)
82. <https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-positive-initial-booster-data-against-sars-cov/> (pristupljeno 1.8.2021.)
83. <https://ir.novavax.com/press-releases> (pristupljeno 14.7.2021.)
84. https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL (pristupljeno 12.8.2021).
85. <https://vaccinetracker.ecdc.europa.eu/public/extensions/COVID-19/vaccine-tracker.html#distribution-tab> (pristupljeno 28.7.2021.)
86. <https://vaxine.net/projects/> (pristupljeno 14.7.2021.)
87. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty> (pristupljeno 3.8.2021.)
88. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-janssen> (pristupljeno 3.8.2021.)
89. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna> (pristupljeno 3.8.2021.).
90. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca> (pristupljeno 3.8.2021.).
91. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-sinovac-covid-19-vaccine-what-you-need-to-know> (pristupljeno 16.7.2021.)
92. <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (pristupljeno 16.7.2021.)
93. www.codagenix.com/vaccine-programs/covid-19/ (pristupljeno 16.7.2021.)
94. www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Objectives-of-vaccination-strategies-against-COVID-19.pdf (pristupljeno 26.5.2021.)
95. www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines (pristupljeno 20.7.2021.)
96. www.halmed.hr/COVID-19 (pristupljeno 30.7.2021.)
97. www.meissavaccines.com/vaccine-pipeline (pristupljeno 16.7.2021.)
98. www.nature.com/subjects/recombinant-vaccine (pristupljeno 16.7.2021.)
99. www.ourworldindata.org/smallpox (pristupljeno 25.5.2021.)
100. www.sanofi.com/en/our-covid-19-vaccine-candidates/recombinant-vaccine (pristupljeno 14.7.2021.)
101. www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/ (pristupljeno 1.8.2021.)
102. www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/immunization (pristupljeno 25.5.2021.)

103. www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-are-vaccines-developed (pristupljeno 30.7.2021)
104. www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update (pristupljeno 1.8.2021.).
105. www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (pristupljeno 16.7.2021., 27.7.2021. i 12.8.2021.)

10. Sažetak

Objavom genetičke sekvencije virusa SARS-CoV-2 mnogobrojne tvrtke krenule su u razvoj cjepiva. Protein šiljka i njegova receptor-vezujuća domena, na temelju svoje imunogeničnosti, nametnuli su se kao glavne antigenske mete u razvoju cjepiva. Velik je broj strategija koje su različiti proizvođači odabrali na polju dostave odabranog antigena u stanice. Tradicionalni pristup uključuje cjepiva s inaktiviranim te oslabljenim virusom, a noviji pristup cjepiva temeljena na virusnoj podjedinici, na čestici nalik virusnoj, vektorska cjepiva, DNA te RNA cjepiva. Znanstvenoj zajednici najzanimljivija su RNA cjepiva jer su u pandemiji COVID-19, uz vektorska cjepiva, najbrže autorizirana za tržište, kao i zbog testirane sigurnosti i učinkovitosti, koja je na veoma visokoj razini. U razvoju cjepiva treba razmotriti i upotrebu adjuvanata koji povećavaju i moduliraju imunogeničnost cjepiva. Može biti riječ o agensima dodanim izvana, kao što su aluminijske soli, ali često i same sastavnice cjepiva posjeduju imunostimulativna svojstva. Zaključno s 12.8.2021., četiri su COVID-19 cjepiva licencirana za upotrebu u EU. U razdoblju visokog postotka preboljelih i cijepljenih dolazi do pojave novih varijanti virusa koje su evolucijski favorizirane jer izbjegavaju stečeni imunitet populacije. Stoga, uz razvoj cjepiva optimiziranih za zaštitu od prevalentnih varijanti, morat će se poraditi i na modelima koji bi mogli predvidjeti pojavu novih virusnih varijanti.

11. Summary

After the publication of the genetic sequence of the SARS-CoV-2 virus, numerous companies initiated vaccine development. Spike protein and its receptor-binding domain have been established as the best antigen targets for vaccine development, based on their immunogenicity. There is plethora of strategies selected by various producers, in terms of antigen delivery to the cells. Traditional approach vaccines include attenuated and inactivated virus vaccines while virus subunit vaccines, virus-like particle and viral-vectored vaccines, DNA and RNA vaccines are of a more modern approach. RNA vaccines are of most interest to the scientific community because, during COVID-19 pandemic, they have been authorised for the market in the shortest time, along with viral-vectored vaccines. Moreover, COVID-19 RNA vaccines' safety and efficacy have been proved to be on a remarkable level, too. As of August 12, 2021., four vaccines have been licensed for use in the EU. Use of adjuvants, which increase and modulate the vaccine immunogenicity, should also be considered when developing a vaccine. Adjuvant compounds can be added extrinsically, e.g. aluminium salts, but a vaccine component itself often has immunostimulatory properties. In conditions of high percentage of convalescent and vaccinated people, new virus variants emerge, which are evolutionary favoured since they escape the acquired immunity of a population. Hence, besides optimising vaccines for protection against prevalent virus variants, models that could predict emergence of new ones should be developed, as well.