

Razvoj cjepiva: nove tehnologije i suvremeni izazovi

Koranić, Dino

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:217:004723>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Dino Koranić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Razvoj cjepiva: nove tehnologije i suvremeni izazovi

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

29. lipnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

8. rujna 2023.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak	VI
§1.Uvod.....	1
§2. Sistematiziranje vrsta cjepiva i opis njihovih svojstva	2
2.1 Počeci razvoja cjepiva i dosadašnji načini izrade:	2
2.1.1 Atenuirani živi patogeni	2
2.1.2 Inaktivirani patogeni.....	2
2.1.3 Cjepiva na temelju podjedinicama	3
2.1.4 Toksoidna cjepiva	3
2.1.5 Genetski inženjering i razvoj virusnih vektora.....	4
2.2 Suvremene metode razvijanja novih cjepiva.....	5
2.2.1 Potrebe za novim metodama i suvremeni problemi	5
2.2.2 mRNA cjepiva	6
2.2.2.1 Opća svojstva cjepiva	6
2.2.2.2 Struktura i vrste mRNA cjepiva	7
2.2.2.3 Mehanizam unošenja cjepiva	8
2.2.4. Napredak u razvoju cjepiva	10
2.2.2.4 Sinteza i pročišćavanje cjepiva.....	12
2.2.2.5 Praktični problemi s mRNA cjepivima.....	13
2.2.3 Adenovirusna cjepiva	14
2.2.3.1 Svojstva i struktura adenovirusa.....	14
2.2.3.2 Utjecaj adenovirusnih cjepiva na imunološki sustav.....	15
2.2.3.3 Primjena i proizvodnja adenovirusnih cjepiva	16
2.2.4 Peptidna cjepiva	16
2.2.5 Čestice nalik virusima	17
2.2.6 Nanočestice i rekombinantna cjepiva	19
2.2.7 Biomaterijali kao budućnost prenositelja cjepiva.....	20
§3. Literaturni izvori.....	22

§ Sažetak

Razvoj cjepiva u 21. stoljeću doveo je do velikog napretka novih metoda proizvodnje čime su dosad samo istraživane metode dobivanja cjepiva uvedene u praktičnu uporabu. U radu dan je pregled različitih dosadašnjih metoda i donedavno eksperimentalnih metoda proizvodnje različitih cjepiva. Svako cjepivo ima svoju karakterističnu strukturu, vrstu proteina ili molekule koje koristi kao primarnu metu za dobivanje imunosti i karakterističnog prenositelja za siguran unos cjepiva u organizam. Dan je pregled proizvodnje, sastava, struktura cjepiva i prenositelja koji su potrebni za optimizaciju cjepiva i prikazane su optimizacije koje se već koriste u praksi. U radu su također navedeni neki problemi s kojima se može susresti sama proizvodnja novih cjepiva, bilo što se tiče razvijanja novog cjepiva i njegovi nedostaci ili širi problemi s kojima se čovječanstvo susreće nakon kontakta s novom bolešću.

§1.Uvod

Bolest je sastavni dio života s kojim se svi ljudi susreću. Uzrokovane virusom ili bakterijom, u prošlosti su bolesti često značile sigurnu smrt za čovjeka. Razvojem medicine ljudi su s vremenom imali sve više oruđa kojim bi se suprotstavili bolestima. Razvojem medicine, biologije i kemije shvaćen je sastav i djelovanje nekog patogena pa su se tako i stvorile različite vrste cjepiva protiv njih. Cjepiva su farmaceutski pripravci sa svrhom stjecanja parcijalne ili potpune imunosti na određene bolesti. Organizam pomoću bijelih krvnih stanica ili leukocita pamti određene karakteristike pojedinog virusa po kojima ih detektira i priprema za uklanjanje iz organizma. Cjepiva su u potpunosti obranila ljude od nekih bolesti, a u nekim slučajevima bolest je potpuno izumrla, kao što je slučaj s velikim boginjama. Za veliki broj bolesti danas postoji cjepivo, no ipak postoji još veći broj bolesti bez formuliranih cjepiva, te se pojavljuju nove zarazne bolesti, zbog čega se i danas razvijaju nova, bolja i sigurnija cjepiva.^{1,2,3}

Budući da je u 21. stojeću populacija masovno cijepljena, strah od masovnog oboljenja ljudi nije bio previše prisutan. Pojava virusa COVID-19 u 2019. godini pokazala je kako još uvijek postoje bolesti koje mogu zaprijetiti čovječanstvu. Takav događaj dodatno je pobudio interes za razvoj i istraživanje u novih načina proizvodnje cjepiva, takva bi se cjepiva mogla brzo proizvoditi usred epidemija ili stvoriti cjepiva za bolesti koje ga još nemaju. Nove tehnologije omogućuju detaljni uvid u mehanizme s kojima se ljudsko tijelo bori protiv bolesti, čime se mogu stvoriti cjepiva koje bolje potiču odziv imunološkog sustava ljudi. Nadalje zbog nove tehnologije u mogućnosti smo stvoriti specifična cjepiva, bazirana samo na nukleinskim kiselinama kao što je RNA, što prije nije bilo moguće jer sredstva za manipulaciju s takvim molekulama nisu postojala. No usprkos novoj tehnologiji i znanju o patogenima, razvoj novih cjepiva nailazi na niz problema. Poteškoće u razvoju mogu biti vezane za prirodu samog patogena ili imaju veze s ukupnom proizvodnjom i primjenom cjepiva. Usprkos svemu sve je veći napredak u razvoju cjepiva i nove tehnologije pomažu u borbi protiv novih te već postojećih bolesti.^{12,3}

U ovom radu prikazane su različite vrste cjepiva koje su se dosada koristile i različite vrste cjepiva u razvoju. Svrha je prikazati pregled samih cjepiva, s naglaskom na metode koje su odnedavno se počele razvijati i primjenjivati. Cilj rada je prikazati načine rada pojedinih cjepiva i istražiti njihov razvoj. Također, cilj je prikazati probleme s kojima se susreće proizvodnja novih cjepiva, utvrditi potencijalne nedostatke tih metoda i utvrditi potencijalna rješenja za optimiziranje djelovanja cjepiva.

§2. Sistematiziranje vrsta cjepiva i opis njihovih svojstva

2.1 Počeci razvoja cjepiva i dosadašnji načini izrade:

2.1.1 Atenuirani živi patogeni

Početak cjepiva kao zaštita od bolesti je ideja, da će tada poznati virusi koji zahvaćaju životinje imati drugačije ili slabije djelovanje od onog kada se unose u čovjeka i obrnuto. U početku se radilo se samo o hipotezi, a prva istraživanja prema ovoj hipotezi učinio je francuski znanstvenik Luis Pasteur kada je istraživao djelovanje pileće kolere *Pasteurella multacida*, kao i antraks u ovaca te bolest bjesnoće kod ljudi i životinja u 19. stoljeću. Pokus se sastojao od patogena ostavljenog na zraku preko ljeta, koji je naknadno inokuliran u kokoš pri čemu nije došlo do pojave bolesti. Pripravom svježe kulture patogena i inokulacijom u istu kokoš također nije došlo do pojave bolesti. Ti rezultati pokazali su mogućnost patogena da izgube svoju infektivnu moć uslijed nepovoljnih uvjeta za život.^{1,2,3}

Važan značaj za razvoj atenuiranih živih cjepiva bio je razvoj metode kulture stanica sredinom 20. stoljeća, metoda bitna za uzgoj novih virusa u laboratoriju. Otkriveno je kako uzgajanjem više generacija patogena *in vitro* i odabirom onih kolonija s mutacijom za polju prilagodbu u novom mediju, zbog čega gube prilagodbe za život u ljudskom organizmu. Tako prilagođeni virus nakon unosa u čovjeka, može izazvati imunološku reakciju bez izazivanja bolesti. Prednost ove metode je da korištenje živog patogena, dovodi do dobrog imunološkog odaziva i očuvanja informacija o virusu u organizmu te je za potpunu imunost dovoljna jedna doza cjepiva. Zbog dobrih rezultata cijepljenja metoda atenuiranja živih patogena uvelike se koristila za razvoj novih cjepiva i većina dosadašnjih cjepiva bila je ove vrste, što je vidljivo u Tablici 1.^{1,2,3}

2.1.2 Inaktivirani patogeni

Razvoj cjepiva protiv bolesti uzrokovanih bakterijama bazirao se na inaktiviranju štetnog djelovanja bakterija, izlaganjem bakterija visokoj temperaturi ili kemijskom tretmanu. U Tablici 1 prikazano je kako razvoj cjepiva s inaktiviranim patogenima bio je paralelan s razvojem atenuiranih cjepiva, a ovisno o državi porijekla inaktiviranih cjepiva koristile su se različite metode inaktivacije. Novija istraživanja početkom 20. stoljeća pokazala su mogućnost tretmana nekih toksina, kao što su difterija, kojima se potpuno ukloni toksičnost molekula, dok te iste molekule zadržavaju mogućnost induciranja antitijela koji neutraliziraju toksine. Kasnije se pokazalo da se slične metode mogu primijeniti na virusima. Zbog jednostavnih metoda

inaktivacije patogena mogu se proizvesti velike količine cjepiva, no izazivaju nešto slabiju imunološku reakciju zbog čega se moraju primati u više doza. Čest problem kod inaktiviranih patogena je parcijalna inaktivacija, pa unošenjem cjepiva ipak dolazi do neke slabije infekcije. Uz to se tijekom proizvodnje moraju provoditi striktnije kontrole, potrebno je pripremiti brojne kulture za uzgoj patogena, što povećava rizik od zaraze ljudi koji proizvode cjepivo i samo saniranje otpadnih stanica patogena postaje mnogo kompliciranije.^{1,2,3}

2.1.3 Cjepiva na temelju podjedinicama

Tip cjepiva koja u sebi sadrži dio patogena, u odnosu na prethodna koja su sadržavala potpuni patogen, su tzv. cjepiva temeljena na podjedinicama. Razvoj bakteriologije i proučavanje struktura bakterija i njihovih ovojnica dovelo je do novog načina istraživanja mogućnosti borbe protiv bolesti. Rano u povijesti bakteriologije morfološka istraživanja i kemijska analiza pokazale su da su mnogi patogeni obavijeni polisaharidnom kapsulom i da antitijela protiv te ovojnice promoviraju fagocitozu.¹ Takva istraživanja dovela su do izrade polisaharidnih cjepiva, koja bakterije s polisaharidnom kapsulom mogu izolirati u serumu pomoću različitih antitijela. Prva takva cjepiva ušla su u uporabu početkom 20. stoljeća, vidljivo u Tablici 1. Problem je što ekspresija antitijela uzrokovana cjepivom se ne može izazvati bez prisutnosti B-stanica u krvnom serumu, zbog čega se cjepivo ne može koristiti kod dojenčadi koja još nisu razvila sposobnost da izazovu odaziv B-stanica, a taj problem se riješio konjugiranjem polisaharidnog niza iz bakterije na protein-nosač. Bakterije često na vanjskoj ovojnici sadrže polisaharidne nizove kao obranu od imunološkog sustava u koji ulaze. Cjepivo se izrađuje pomoću istog polisaharidnog niza vezanog na konjugirani protein, koji disocira u tijelu i polisaharid prepoznaju B-stanice uz pomoć stanice imunih pomagača ili T-stanice. Slično prethodnom mogu se koristiti izolirani proteini koji se nalaze na površini virusa ili bakterija koji izazivaju odaziv kod imunološkog sustava. Prednost takvih cjepiva je korištenje samo karakterističnog dijela nekog patogena, što smanjuje vjerojatnost za zarazu prisutnog kod cjepiva koja koriste umrtvljeni patogen. Tako su takva cjepiva prikladnija za ljude kojima nije moguće dati cjepiva sa „živim“ patogenima kao što su djeca, ljudi starije dobi ili ljudi kojima je imunološki sustav oslabljen.^{1,2,3}

2.1.4 Toksoidna cjepiva

Kao još jedna vrsta štete koju bakterije mogu nanijeti organizmu su različiti toksini koji bakterije proizvode a oštećuju organizam. Cilj je proizvesti cjepivo nalik toksinu koji bakterija izlučuje, no u obliku inaktiviranog oblika koji ne može ući u stanice i učiniti štetu pod nazivom toksoid. Takva cjepiva uzrokuju imunost na toksoid, a ne na samu bakteriju. Cjepiva se najčešće

izrađuju protiv nekih specifičnih upala kao što su tetanus ili difterija i potrebno je češće primati dozu zbog specifičnosti prema toksinu, a ne bakterija koja toksin proizvodi. Razvoj ovih cjepiva započeo je u slično vrijeme kao i cjepiva na bazi podjedinica, a prva cjepiva vidljiva su u Tablici 1.^{1,2}

2.1.5 Genetski inženjering i razvoj virusnih vektora

Sljedeći veliki tehnološki napredak u razvoju novih cjepiva vezan je uz razvoj molekularne biologije i genetskog inženjersva. Potpuno razumijevanje, analiza i sinteza inaktiviranih dijelova nekog patogena dobre su polazne točke za proizvodnju cjepiva, no to nije nužno primjenjivo na sve vrste patogena. Istraživanja su zato dovela do toga, da se može manipulirati sa samim genskim kodom bakterija i virusa. Zbog toga prva takva cjepiva ušla su u uporabu tek krajem 20. stoljeća, vidljivo u Tablici 1. Koristeći različite metode manipuliranja s DNA i RNA moguće je stvoriti produkte slične patogenim elementima, koji su na neki način inaktivirani ili daju odaziv imunog sustava bez mogućnosti pojave pripadajuće bolesti. Tako se mogu promjenom genoma stvoriti više vrsta različitih antigena ili mutacijom dovesti do atenuiranja samog patogena. Prvi pothvat korištenja genetskog inženjersva za dobivanje cjepiva bio je proizvodnja cjepiva za hepatitis B iz rekombiniranih stanica kvasca koji su nosili gene za S protein. Do tada se koristila metoda proizvodnje cjepiva koja se bazirala na pročišćavanju S-čestica iz plazme zaražene osobe. Unošenjem različitih gena u kvasac ili bakterije *E. coli* omogućile su nastanak različitih rekombiniranih proteina, a ti rezultati pomogli su u stvaranju cjepiva na temelju modificiranog genoma. Još jedan od načina proizvodnje cjepiva je pomoću korištenja živih patogena koji su avirulentni. Koristeći atenuirane patogene ili slične, za ljude bezopasne patogene kao temelj za unos novih gena može poslužiti kao dobra polazna točka za proizvodnju cjepiva za mnoštvo različitih bolesti.^{1,2,3}

Cjepiva bazirana na takvim genetskim promjenama baziraju se na metodi unošenja živih, mutiranih stanica patogena u organizam kao vektor za unošenje i ekspresiju gena za nastanak odgovarajućih proteina koji su analogni pravom patogenu, ali ne pokazuju istu infektivnu prirodu i zbog toga potječe naziv „virusni vektori“. Tako nastali produkti translacije detektiraju se kao strana tijela u organizmu pomoću stanica imunog pomagača i označuju se pomoću odgovarajućih antitijela, iz čega će u konačnici stanica u kojoj se nalazi modificirani genom biti uništena. Virusni vektori zbog toga često izazivaju jaki odaziv imunog sustava i često je dovoljna jedna doza cjepiva do pojave imunosti, uz mogućnost primanja dodatne doze cjepiva radi osiguravanja imunosti.^{1,3}

Tablica 1. Različiti patogeni i načini na koji su dobivena cjepiva te godina u kojoj je proizvedeno prvo cjepivo, preuzeto i prevedeno iz „*History of vaccines*“²

Atenuirani živi patogeni	Inaktivirani patogeni	Pročišćeni proteini ili polisaharidi	Genetski inženjering
18. stoljeće			
Velike boginje (1798.)			
19. stoljeće			
Bjesnoća (1885.)	Tifus (1896.) Kolera (1896.) Kuga (1897.)		
Prva polovica 20. stoljeća			
Tuberkuloza (bacil) (1927.)	Hripavac (1926.)	Diferijski toksoid (1923.)	
Žuta groznica (1935.)	Gripa (1936.) Rahitis (1938.)	Tetanus toksoid (1926.)	
Druga polovica 20. stoljeća			
Poliomijelitis (oralno) (1963.)	Poliomijelitis (primjena injekcijom) (1955.)	Proteini izlučeni iz antraksa (1970.)	Rekombinant površinskog antigena Hepatitisa B (1986.)
Ospice(1963.)	Bjesnoća (kultura stanica) (1980.)	Polisaharidi iz meningokoka (1974.)	Vanjski površinski protein lajm-bolesti (1998.)
Mups (1967.)	Japanski encefalitis (iz mišjeg mozga) (1992.)	Polisaharidi iz pneumokoka (1977.)	Rekombinanti toksin B iz kolere (1993.)
Rubeola (1969.)	Encefalitis iz krpelja (1981.)	Polisaharid iz <i>Haemophilus</i> gripe tipa B (1985.)	
Adenovirus (1980.)	Hepatitis A (1996.)	Konjugati <i>H. gripe</i> tipa B (1987.)	
Tifus (<i>Salmonella</i> TY21a) (1989.)	Kolera (WC-rBS) (1991.)	Polisaharidi tifusa (VI) (1994.)	
Vodene kozice (1995.)	Meningokokalni konjugat (grupa C) (1999.)	Acelularni hripavac (1996.)	
Rotavirus (1999.)		Hepatitis B (dobiven iz plazme) (1981.)	
Kolera (atenuirana, 1994.)			
Gripa prilagođena na hladnoću (1999.)			
21. stoljeće			
Rotavirus (atenuirani i novi rekombinanti)(2006.)	Japanski encefalitis (Vero stanice) (2009.)	Pneumokokni konjugati (hepatovalent) (2000.)	Rekombinantni humani papiloma virus (tetravalant) (2006.)
Zoster (2006.)	Kolera (oralna primjena) (2009.)	Meningokokni konjugati (tetravalent) (2005.) Pneumokokni konjugati (13-valentni) (2010.)	Rekombinantni humani papiloma virus (bivalant) (2009.) Proteini meningokoka grupe B (2013.)

2.2 Suvremene metode razvijanja novih cjepiva

2.2.1 Potrebe za novim metodama i suvremeni problemi

Do sada smo spomenuli mnoštvo različitih tehnika i načina na koji su razvijene nove tehnologije i metode rada s patogenima, no uz sve različite tehnike i vrste cjepiva koje čovječanstvo posjeduje, ipak postoji potreba za razvojem novih metoda. Zbog česte prenapučenosti u nekim regijama svijeta, može doći do lake zaraze poglavito zbog lošijih uvjeta životnih uvjeta i međusobnog kontakta velikog broja ljudi. Međunarodni tranzit također je problem, ljudi često putuju na različite kontinente iz poslovnih ili turističkih razloga, pa je zbog toga povećana vjerojatnost prenošenja patogena na druge kontinente. Zbog ekonomskih ili geografskih razloga smrtnost nekog patogena će biti veća, s obzirom na to da mogućnost za dobivanjem medicinske pomoći nije uvijek jednaka, smrtnost uslijed zaraze može biti znatno viša.^{2,3,9}

Epidemija virusa COVID-19 posljednji je primjer važnosti brzog i pouzdanog istraživanja te proizvodnje cjepiva. Problem kod već spomenutih metoda je da korištenjem istih često potrebno dulje vrijeme za proizvodnju cjepiva. U primjeru atenuiranih živih patogena potrebno je više puta provesti kroz neku kulturu, što zahtjeva dulje istraživanje potrebno za izradu cjepiva i nepraktično je prilikom brze potrebe za cjepivom. Većina vremena koristi se za

uzgoj više generacija patogena, a često su novije generacija još infektivne za ljude. Samo istraživanje karakterističnih svojstava i strukture virusa zahtjeva dulje vrijeme proučavanja i formuliranja ideje o vrsti cjepiva koje bi se koristilo u borbi protiv novog virusa. Također, zbog velike povezanosti modernog svijeta, virus često može doći do regija gdje ljudi imaju posve različitu genetiku, od ljudi gdje je isprva došlo do pojave epidemije. Zbog toga se mogu često pojaviti različiti sojevi samog virusa, što zahtjeva posve nova cjepiva ili modifikacije u cjepivima koja su u pripremi.^{2,3,9,18}

Također jedan od najvećih faktora koji utječe na uspješnost proizvodnje novi cjepiva je novac. U slučajima većih epidemija ili kao što je bio slučaj s pandemijom virusa COVID-19 bilo je važno da se proizvede što više cjepiva u najkraćem vremenu, kako bi se moglo administrirati na skali od milijun ljudi. U ovom slučaju problem je više logistički orijentiran, jer prenošenje cjepiva zahtjeva posebne strategije, kako u međuvremenu cjepivo ne bi oslabilo ili potpuno se inaktiviralo. Logistički problemi su često prisutni, potrebno je više stotina različitih prijevoznih sredstava i ponekad je potrebno preoceansko prenošenje cjepiva, zbog položaja samih istraživačkih centara. Zbog prethodno navedenog u današnje vrijeme potrebno je brzo razvijanje cjepiva koje se lako proizvodi i učinkovitog je djelovanja.^{2,3,9,17}

2.2.2 mRNA cjepiva

2.2.2.1 Opća svojstva cjepiva

Jedna od metoda koja dominira u istraživanjima su novih cjepiva je korištenje mRNA kao vektora za nova cjepiva. Takav tip cjepiva bazira se na unošenju transkripta koji sadrži informacije za sintezu proteina koji će biti analogan proteinu kojega proizvodi patogen bez izazivanja bolesti. Translatirani protein uzrokuje imunološku reakciju stvaranja antitijela na nastali protein, što je baza za djelovanje kao cjepivo i osigurava da će organizam zapamtiti strukturu nastalog proteina i spriječiti infekciju ukoliko dođe do pojave proteina iz patogena. Prednost mRNA cjepiva nad cjepivima koji koriste inaktivirane viruse je da mRNA cjepiva ne koriste nikakve infektivne elemente tijekom proizvodnje jer se RNA spontano i prirodno razgrađuje nakon ekspresije proteina. U odnosu na toksoidna cjepiva ili cjepiva kod kojih dolazi do prepoznavanja određenog dijela patogena, mRNA cjepiva proizvode karakteristične proteine unutar stanice, u odnosu na direktno unašanje u organizam putem cijepljenja što osigurava bolji odaziv i dulje trajanje cjepiva. Zbog toga mRNA cjepiva ne uzrokuju imunost koja specifično napada vektor, pa problemi s već postojećom imunosti na specifični vektor ne utječu na samu kvalitetu cjepiva. Velika prednost mRNA cjepiva je što ne koristi stanice samog patogena i čini proces proizvodnje sigurnijim, a samo cjepivo može se dodatno modificirati kako bi uklonila

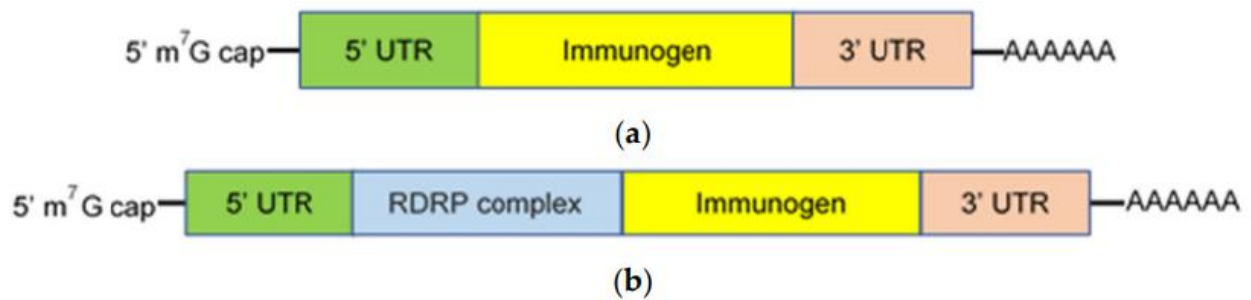
neke nuspojave ili poboljšala imunološku reakciju sintetiziranog proteina. Sveukupni proces je zbog toga u teoriji skraćen na periodu od nekoliko mjeseci, što ovu vrstu cjepiva čini pogodnu kod pojava epidemija.^{2,4,6,9}

2.2.2.2 Struktura i vrste mRNA cjepiva

Sama struktura mRNA cjepiva sadrži u sebi sintetiziranu mRNA okruženu s zaštitnom kapsulom, koja omogućuje unos transkripta u stanicu. mRNA nastaje reakcijom transkripcije molekule DNA uz pomoć enzima RNA-polimeraze. Kod eukariotske transkripcije primarni transkript se dodatno još modificira i izrezuju se pripadni introni. Kod mRNA cjepiva koriste se laboratorijski sintetizirane molekule DNA iz koje nastaje pripadna mRNA koja se dalje modificira. Proizvodnja cjepiva iz sintetski dobivene molekule DNA daje veliku prednost u proizvodnji, jer se sekvenca DNA može lakše manipulirati od sekvence u patogenim stanicama i ista sekvenca može se digitalnim putem lako prenijeti u druge laboratorije koji u kraćem vremenu mogu dobiti svoju mRNA. Cjepiva temeljena na RNA mogu se podijeliti na replicirajuće i nereplicirajuće vrste, a strukture ovih dviju vrsta ilustrirano su prikazane na Slici 1.^{4,5}

Nereplicirajuće vrste u strukturi ne sadrže nikakve dodatne proteine koji bi izazvali bilo kakvu neželjenu imunološku reakciju. U svom sastavu sadrže regiju za sintezu traženog imunogenog proteina, a uzvodno i nizvodno dodatno sadrže netranslatirane regije (5' UTR i 3' UTR) koje imaju dodatne uloge i promoviraju ekspresiju proteina. Ispred same 5' UTR-a sadrži kapu sastavljenu od 7-metilgvanozina (m^7G cap) koja sprječava detekciju od citoplazmatskih senzora za strane tvari, sprječava degradaciju i na sebe veže dodatne faktore za bolju inicijaciju translacije. Na 3' kraju se nalazi poliadenilni rep koji je ključan za zaustavljanje translacije i djeluje kao zaštita od dodatne degradacije..^{4,5,9}

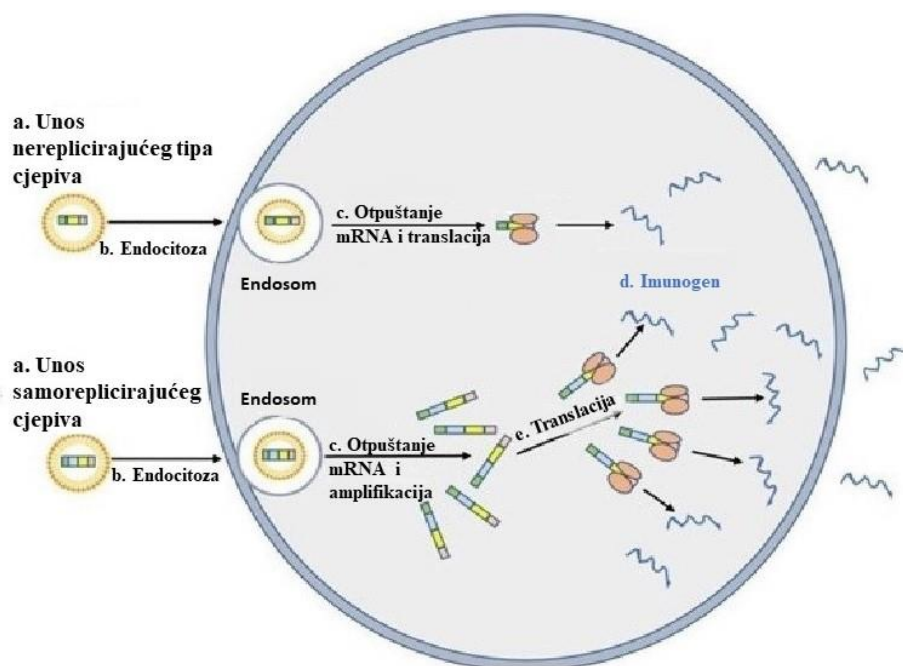
Samoreplicirajuće vrste slične nereplicirajućim vrstama, samo što one imaju dodatnu kodirajuću regiju između 5' UTR slijeda i kodirajućeg slijeda za antigen, koji kodira dodatni kompleks koji se zove RNA-ovisna RNA polimeraza (RDRP). Prednost samoreplicirajućih vrsta je dulja izloženost imunogenom proteinu zbog veće i dugotrajnije ekspresije, koja kao posljedicu ima jači odaziv imunološkog sustava i dulje trajanje. Problem je što, za razliku od nereplicirajućih mRNA, samoreplicirajuća RNA sadrži u pravilu dvostruko više baza u odnosu na nereplicirajuće RNA i podložnije su mehaničkom oštećenju. Također, zbog sinteze RDRP-a može doći do dodatne imunološke reakcije čime se utišava translacija imunogenog proteina.^{4,5}



Slika 1. Ilustrativni prikaz struktura nereplicirajuće (a) i samoreplicirajuće (b) vrsta mRNA cjepiva, preuzeto iz „*mRNA based vaccines*“⁴

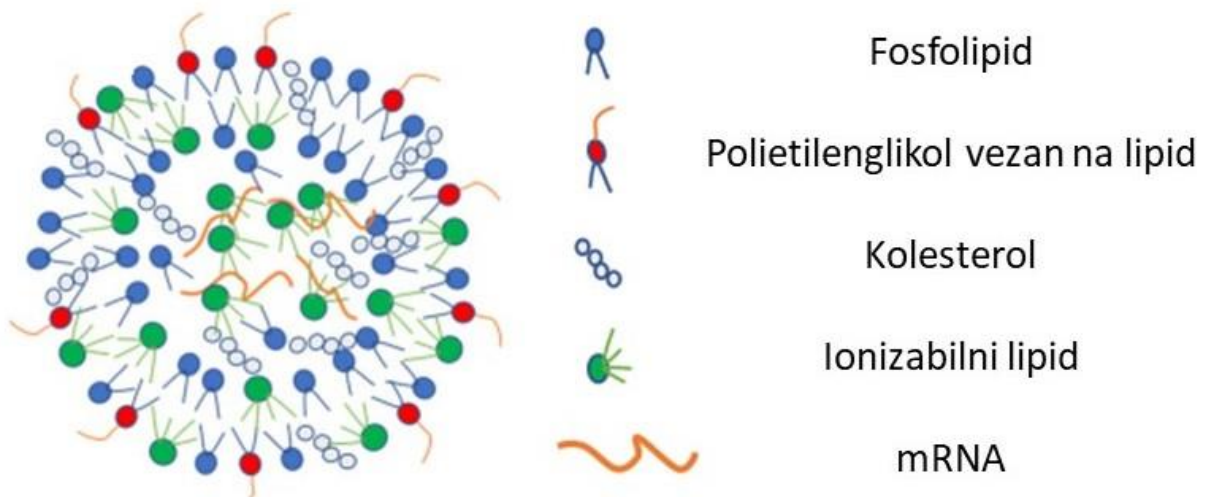
2.2.2.3 Mehanizam unošenja cjepiva

Unošenje cjepiva najčešće se sastoji od jednostavnog ubrizgavanja sadržaja otopine cjepiva pomoću igle u ruku osobe koja prima cjepivo. To nije problem za većinu cjepiva koje sadrže inaktivirane patogene zbog njihove stabilnosti. Mehanizam unošenja nereplicirajućih i samoreplicirajućih RNA cjepiva prikazan je na Slici 2. mRNA cjepiva se ne mogu direktno unijeti u organizam, jer je mRNA pri takvom unosu nestabilna i unošenje mRNA u stanicu može izazvati jaku imunološku reakciju čime se cjepivo uništava. Uz to mRNA je vrlo teško prijeći lipidni dvosloj zbog svoje veličine i zbog toga što negativno nabijena mRNA stvara odbojne interakcije s negativnim potencijalom na površini dvosloja.⁴ Takvi zahtjevi doveli su do stvaranja zaštitnog nosača koji bi sigurno unijela cjepivo u stanicu. Glavna uloga nosača je zaštititi unutarnju mRNA od razgradnje u međustaničnom prostoru i unošenje ciljane molekule u stanicu mehanizmom endocitoze. Nakon unosa vektora u stanicu, dalje se mora na neki način otpustiti sadržaj vektora u stanicu da bi cjepivo bilo aktivno. Izrađeni su eksperimenti u kojima su se koristili različiti polimeri i peptidi te u novije vrijeme korištene su lipidne nanočestice.⁴



Slika 2. Mehanizam kojim mRNA cjepivo ulazi u stanicu i način kako djeluje u stanici za nereplicirajući i samoreplicirajući tip mRNA cjepiva. Preuzeto i prevedeno iz „*mRNA based vaccines*“⁴

Istraživanja u kojima se koristilo različite nelipidne polimere, kao polietilamin, bila su uspješna u unosu mRNA u stanicu, no naposljetku nije došlo do kliničkih testiranja, zbog njihovih štetnih djelovanja prilikom razgradnje. Često su u polimerne nosače bili ugrađeni lipidi, kako bi se poboljšala vjerojatnost sigurne razgradnje polimera, no bez većih uspjeha. Peptidni nosači nisu bili dovoljno istraženi kao potencijalni vektori, uz iznimku peptida koji mogu prijeći staničnu ovojnicu. Pomoću svojeg aminokiselinskog slijeda peptidi kondenziraju mRNA i omogućuju prijenos kroz lipidni dvosloj te se nosač razgradi. Glavna metoda za unos mRNA u stanicu je metoda pomoću ionizabilnih nanočestica koji sadrže lipide (LNP). LNP sastoji se od sferičnih vezikula ioniziranih lipida, koji su neutralni pri fiziološkom pH, a pozitivno nabijeni pri niskim pH, što im omogućuje prijenos mRNA u citoplazmu. U pravilu su promjera oko 100 nm i slični su po veličini i sastavu lipoproteinima. Uz to često sadrže dodatne pomoćne lipide s različitim ulogama, kolesterol daje stabilnost strukturi, dok polietilenglikol služi za zaobilazak dodatnih sustava detekcije stranih tvari i struktura je vidljiva na Slici 3.⁷ Same količine određenih pomoćnih lipida još se uvelike istražuju u svrhu boljeg unosa cjepiva u stanicu. Prva uspješno dobivena cjepiva koja koriste LNP-ove kao vektore bila su cjepiva protiv gripe 2015. i 2016. godine. Nadalje do pojave pandemije COVID-19 od 8 mRNA cjepiva, 5 od njih su koristili lipidne nanočestice, a nakon početka pandemije 8 novih istraživanja u mRNA cjepiva pokrenuta su u samoj 2020. godini.^{4,5,7,9}



Slika 3. Struktura LNP vektora za unos mRNA cjepiva u organizam. Preuzeto i prevedeno iz „mRNA based vaccines“⁴

2.2.4. Napredak u razvoju cjepiva

Iako su već neka mRNA cjepiva puštena u kliničku primjenu, većina ih ipak nije odobrena za klinička testiranja. *In vitro* sinteza mRNA je jednostavna, ali sinteza kvalitetnog mRNA cjepiva bez nuspojava je veći zahtjev.⁵ Važna dostignuća u razvoju bila su primjena modificiranih nukleotida, gdje se ističe posebno modificirani uridin, i primjena HPLC metoda za uklanjanje štetnih dvolančanih RNA nastalih kao nusprodukti transkripcije. Ako se želi poboljšati učinak mRNA cjepiva, potrebna je ciljana optimizacija pojedinih komponenti koja sadrži mRNA.^{5,8}

Netranslatirane regije ili UTR kod mRNA cjepiva imaju ključnu ulogu kod ekspresije imunogenog proteina. Do sada su se koristile α - i β -globulinske regije preuzete iz ljudske mRNA radi njihove stabilnosti. Promjene u sastavu netranslatiranih regija mogu poboljšati ekspresiju imunogena, primjer kod toga su nove sekvence 3' UTR, koje pokazuju trostruko veću ekspresiju u odnosu na dosadašnje korištenje ljudskog β -globin 3' UTR-a. Korištenjem tandem ili dvostruke sekvence 3' UTR-a primijećena je stabilizacija mRNA i produljeno je njeno vrijeme poluživota. Kod 5' UTR sekvence važno je da nemamo prisutne stabilne sekundarne strukture unutar te regije, jer dolazi do slabije aktivacije ribosoma i pronalaženje START kodona.^{5,8}

Kapa koja se veže na 5'-kraju uglavnom se sastoji od metiliranog gvanozina vezanog na prvi nukleotid mRNA i karakteristika je eukariotskih organizama. Ima važnu ulogu u inicijaciji translacije, otpuštanja iz vektora i stabiliziranja strukture te je važna tijekom prepoznavanja

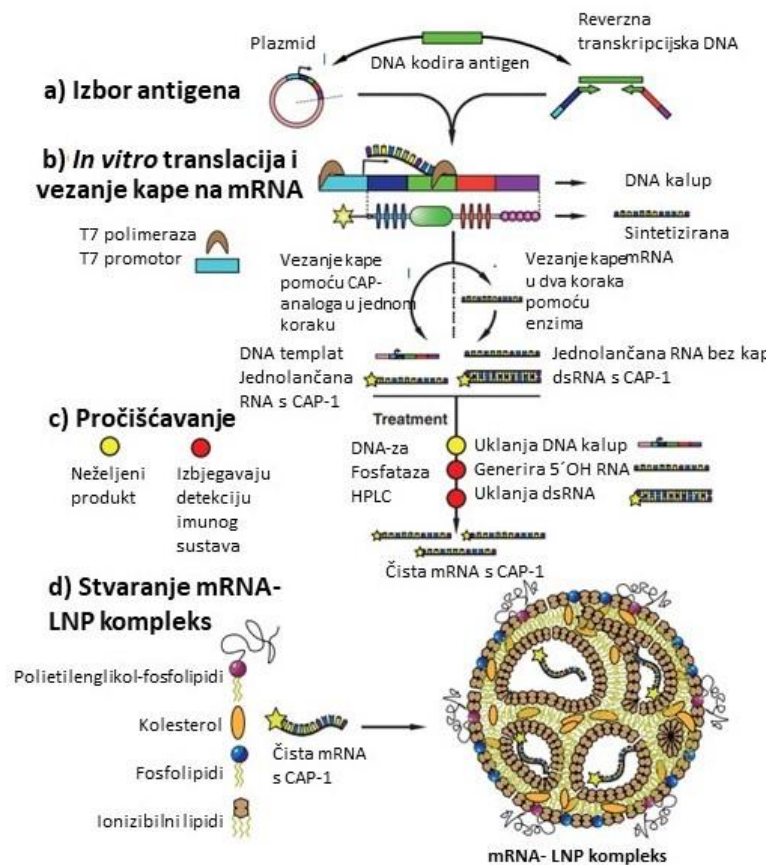
cjepiva od obrambenog sustava stanice. Naime, u citoplazme postoje sustavi za provjeru nukleotidnog slijeda, koji su dio normalnog eukariotskog imunološkog sustava i ukoliko se koristi neka nestandardna kapa za poboljšanu ekspresiju, biti će detektirana od strane obrambenog sustava i razorena. Zbog toga kapa ima važnu ulogu u prerušavanju cjepiva kao normalnog produkta stanice. Također zbog važne uloge kape kao mjesta za vezanje inicijacijskih faktora, sinteza mora biti ispravna kako bi došlo do pravilne translacije i da ne dođe do neke snažne imunološke reakcije uslijed pogrešne strukture kape ili uslijed nedostatka kape nakon transkripcije.⁸

Prilikom optimiziranja poliadenilnog repa, korišteni su dulji poliadenilni repovi radi stabilizacije cjepiva. Novija istraživanja u genima s visokom ekspresijom gena i optimalnim sljedovima kodona sadržavaju mali broj poliadenilata u svom kraju. Istraženo je kako protein koji se veže na 3' kraj, odnosno na poliadenilatni rep asocira s 5' krajem putem određenih inicijacijskih faktora, stvarajući strukturu zatvorene omče i tako poboljšava translaciju te sprječava degradaciju poliadenilatnog repa i poboljšava životni vijek mRNA. Cilj je zbog toga odrediti najoptimalniji broj adenilata u mRNA cjepivu, kako bi se pokrio zahtjev stabilnosti molekule i zahtjev faktora koji utječu na bolji stupanj translacije.⁸

Još jedna regija optimizacije mRNA cjepiva je modificiranje samog imunogenog proteina koji želimo sintetizirati u stanici i tako izazvati imunološku reakciju sa svrhom obrane od analognog produkta patogena. Cilj ovih modifikacija je pojačati efikasnost translacije i smanjiti potencijalnu reakciju imunološkog sustava usred različitih mehanizama detekcije stranih tijela. Optimizacija se bazira na modificiranju slijeda kodona u obliku korištenja parova kodona za uspješniju translaciju ili koristeći kodone koje prepoznaju tRNA koje su u većoj koncentraciji u stanici. Pokazalo se također da korištenjem nekih rjeđe prisutnih kodona može imati negativni utjecaj na ukupnu translaciju, jer dolazi do nakupljanja ribosoma na molekulu mRNA čime se usporava proces translacije. Bitno je također analizirati učinak pojedinih ribonukleotida, upotrebom više GC parova može se utjecati na ekspresiju proteina tijekom stanične diferencijacije. Važno je također da se u imunogenu ne nalaze regije bogate uridinom, jer to mogu prepoznati stanični receptori za prepoznavanje uzoraka koji daju signal za početak prekida translacije. Također, iako je bitno da sintetizirana mRNA cjepiva budu što stabilnija, izrazito stabilne sekundarne strukture u molekuli mogu utišati ekspresiju proteina, jer inhibiraju vezanje ribosoma na strukturu.^{5,8}

2.2.2.4 Sinteza i pročišćavanje cjepiva

Sinteza mRNA cjepiva započinje sintezom *in vitro* pomoću sintetske molekule DNA, koja može biti nastala reverznom transkripcijom ili se koristi linearizirani plazmid. Nakon toga slijedi transkripcija uz pomoć enzima RNA-polimeraze, pri čemu često dolazi uz sintezu jednolančane mRNA i sinteza dvolančanih RNA (dsRNA). Zatim slijedi ugradnja kape na mRNA, pri čemu se u reakcijskoj smjesi nalaze različite vrste mRNA, s i bez kape i dsRNA. Slijedi zatim pročišćavanje pomoću različitih metoda, korištenjem DNA-za uklanja se DNA-predložak, fosfatazom nastaje mRNA sa slobodnom -OH skupinom za uklanjanje jednolančane mRNA bez kape i naposljetku pomoću HPLC-a uklanja se dsRNA. Ukupni mehanizam ilustrirani je na Slici 4.^{5,8,9}



Slika 4. Prikaz sinteze, pročišćavanja i stvaranja vektora mRNA cjepiva s lipidnim nanočesticama, preuzeto i prevedeno iz „*Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response*“⁴⁸

Kako bi optimizirali sintezu mRNA, često se koriste modificirani nukleozidi. Njihovim korištenjem smanjuje se broj dsRNA nastalih tijekom translacije i sprječava prepoznavanje cjepiva kao stranog tijela. Primjer je metilirani citidin, koji ima pozitivan učinak na translaciju

u kolebljivom dijelu kodona, zbog boljeg dekodiranja od strane ribosoma, a slične takve posttranslacijske modifikacije koriste virusi poput HIV-1.⁸

Sam proces proizvodnje i pročišćavanja također je potrebno optimizirati. Proizvodnja i pročišćavanje često zahtijevaju korištenje enzimski kataliziranih reakcija za pripremu DNA kalupa, transkripcija i vezanja kape na mRNA uz pročišćavanje i odvajanje produkata prije svake nove reakcije, što zahtjeva mnogo vremena i uzrokuje gubitak dijela produkta u svakom koraku, što proces čini skupljim i onemogućuje masovnu proizvodnju cjepiva. Također pročišćavanje HPLC-om zahtijeva rad s manjim količinama produkta čime dodatno usporava cijeli proces. U te svrhe potrebno je sažeti proces u svega nekoliko enzimski kataliziranih reakcija prije pročišćavanja. Korištenjem takozvane metode „CleanCap[®]“, sintetizira se kapa na točno određenom mjestu tijekom transkripcije *in vitro*, dok su prijašnje metode koristile dodatne enzimske metode dodavanja kape ili dodavali kapu pomoću kotranskripcije, pri čemu kao nusprodukt nastaju dsRNA. Alternativno, razvijeni su procesi uklanjanja dsRNA HPLC-om pomoću adsorpcije na celulozu. Ovu metodu razvila je tvrtka Bayersdorfer i predstavlja jednostavniju i jeftiniju metodu koja se može izvesti na puno većoj skali.⁵

2.2.2.5 Praktični problemi s mRNA cjepivima

mRNA cjepiva pokazala su veliki potencijal u kliničkoj primjeni i načinima na koje se mogu optimizirati proizvodnja i pročišćavanje. Još jedna važna barijera koja može zaustaviti razvijanje cjepiva su klinički testovi. Cjepivo mora zadovoljiti ne samo kriterij dobre ekspresije unutar stanice i ne smije biti uklonjen iz stanice kao strano tijelo, već ne smije uzrokovati specifične reakcije kod osoba s posebnim imunološkim problemima ili kod ljudi starije dobi, što može dovesti do štetnih posljedica. Nadalje, samo čuvanje pripremljenog i odobrenog cjepiva također je problem. Cjepiva se u pravilu mogu čuvati pri temperaturi od -80 °C, potom se odmrzavaju i mogu se klinički primijeniti. Problem postaje kada dođe do velike potražnje za cjepivom, kao što je bio slučaj kod pandemije COVID-19 pri čemu se otežava efikasno skladištenje cjepiva. Također, postoje različite vrste mRNA cjepiva, koje proizvode različite farmaceutske kompanije, kao što su cjepiva *Pfizera*, *Moderne* i *Cure Vaca*, koji imaju različite stabilnosti i temperature na kojima se optimalno mogu čuvati dulje vrijeme, prikazano u Tablici 2. Za mRNA cjepiva zbog nagle potražnje i masovne primjene nisu u potpunosti opisani parametri stabilnosti cjepiva u vodenim otopinama i pri različitim temperaturama. Ta testiranja nisu odrađena pa nisu pronađeni optimalni uvjeti za skladištenje cjepiva. Nakon proglašenja kraja pandemije COVID-19 takvi podaci nisu bili od velike važnosti, ali su zbog toga bitna daljnja istraživanja i eksperimenti s novim, potencijalnim cjepivima za druge bolesti, a ukoliko

dode do nove pandemije, veće će biti vjerojatnosti sintetiziranja novog i kvalitetnijeg cjepiva usred novih i boljih metoda sinteze, pročišćavanja i skladištenja cjepiva.¹⁰

Tablica 2. Primjer iz 2020. godine o stabilnosti pri različitim temperaturama i dozama za prva potencijalna cjepiva protiv COVID-19 iz različitih proizvođača. Preuzeto i prevedeno iz „*Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability*“¹⁰

Proizvođač	Stabilnost u smrznutom stanju	Stabilnost pri 2-8 °C	Stabilnost pri sobnoj temperaturi	Primjenjena doza
<i>Moderna</i>	pri -20 °C, 6 mjeseci	30 dana	12 sati	100 µg (0,5 mL)
<i>Pfizer-BioNTech</i>	pri -80 do -60 °C, 6 mjeseci	do 5 dana	2 sata ili 6 sati ako je razrijeđeno	30 µg (0,3 mL)
<i>CureVac</i>	< -60 °C, barem 3 mjeseca	barem 3 mjeseca	24 sata	12 µg (bez informacije)

2.2.3 Adenovirusna cjepiva

2.2.3.1 Svojstva i struktura adenovirusa

Prilikom formuliranja cjepiva koje bi *in vitro* sintetizirala antigen, istraživanja su dovela do proučavanja prirodnih nosača genetske informacije, koji koriste stanične enzime i kofaktore za svoje razmnožavanje, kao što su virusi. Virusi imaju sposobnost ući u određene stanice, dovesti svoju genetičku informaciju u specifične dijelove stanice i omogućiti efikasnu ekspresiju virusnih proteina. Primjena prirode samih virusa i korištenje tih svojstava ideja je adenovirusnih cjepiva. Korištenje spomenutih intrinzičnih svojstava virusa temelj je izrade cjepiva i potrebne su modifikacije kako bi se uklonila štetna neželjena virusa. Pri izradi cjepiva potrebno je smanjiti mogućnosti replikacije vektora unutar stanice ili potpuno onemogućiti replikaciju, genom samog virusa mora se prilagoditi kako bi se mogao usaditi gen antigena, uz uvjet da se uvelike ne promjeni veličina genoma. Različiti tipovi virusa koristili su se u sličnim istraživanjima, kao što su citomegalovirusi, adeno- asocirani virusi, poksvirusi i herpesvirusi kao primjeri vrsta, pod zajedničkom klasifikacijom vektora naziva *Ad* vektori.⁹

Adenovirusi su vrsta virusa koji sadrže proteinsku ovojnicu obavijenu oko genoma dvostruke zavojnice DNA. Najčešće uzrokuju infekcije respiratornog sustava, ali mogu i uzrokovati teže bolesti koje zahvaćaju više organa. Isprva su se koristili kao platforma za genetsku terapiju ljudi s genetskim bolestima, na način da se inducira konstantna ekspresija gena koji u pacijentima nedostaju ili su mutirani, a razlog tome je što adenovirusi mogu ući u širok broj različitih stanica, kao što su stanice hepatocita i epitelne stanice.⁹ Genomi adenovirusa često su dobro poznati, a samo manipuliranje genomom je jednostavnije i

stabilnost novonastalih adenovirusa je često dobra. Iako, često se prilikom terapije adenovirusima mogu aktivirati imunološki receptori za detekciju stranih tijela, što opet može dovesti do upale. No usprkos tomu, adenovirusi i dalje su istraživani u svrhu stvaranja cjepiva.^{9,11}

2.2.3.2 Utjecaj adenovirusnih cjepiva na imunološki sustav

Adenovirusi korišteni tijekom genskih terapija često su imali nuspojavu aktivacije imunološkog sustava protiv *Ad* vektora, no ovo svojstvo je pogodno kod izrade cjepiva baziranog na adenovirusima. Djelovanje cjepiva ima dvostruku ulogu u pojačanju aktivnosti imunološkog sustava čovjeka aktiviranjem receptora za pronalazak stranih tijela u stanicama i stimuliranjem bijelih krvnih stanica za proizvodnju antitijela. Zbog toga *Ad* vektori mogu uzrokovati bolju retenciju imunosti, za razliku od nekih drugih vrsta cjepiva, kao što su toksoidna cjepiva i cjepiva na bazi proteina, jer oni često traže više doza cjepiva za održavanje imunosti. Još jedno svojstvo koje ih čini dobrim cjepivima, je njihova sposobnost umnožavanja u replicirajućim i nereplicirajućim stanicama. *Ad* vektori imaju intrinzičnu sposobnost da mogu ući u više različitih vrsta stanica, što povećava vjerojatnost stvaranja imunosti na zadani antigen koji se prenosi. Problem kod stvaranja imunosti pomoću *Ad* vektora može nastati usred cijepljenja adenovirusnim cjepivom nakon što je organizam prebolio neki drugi tip adenovirusa. Ukoliko kod ljudi postoji već neka manja imunost na adenoviruse, u tijelu će se sintetizirati neutralizirajuća antitijela, koja inaktiviraju cijeli *Ad* vektor.^{9,11}

Postoji više načina kako poboljšati imunološke utjecaje *Ad* vektora, a jedan od njih je korištenje specifičnih ljudskih adenovirusa. Ljudski adenovirusi klasificiraju se od A do G, svaki od kojih sadrži barem 67 različitih vrsta. Neki adenovirusi su češće prisutni poput A5 i zbog toga je imunost na taj specifični adenovirus zastupljena u većoj populaciji. Zbog toga korištenjem adenovirusa poput A26 ili A35, koji su rjeđe prisutni u odnosu na A5, može dovesti do dobre imunološke reakcije ako se koriste kao cjepiva. Na primjeru adenovirusa temeljenim na A26, istražuje se potencijalna primjena u cjepivima protiv HIV-a i potencijalno cjepivo protiv COVID-19. Drugi način dobivanja dobrih kandidata za *Ad* vektore su cjepiva bazirana na životinjskim adenovirusima, jer često imaju slična obilježja kao ljudski, bez mogućnosti postojanja imunosti na tu vrstu adenovirusa. Pri tome se najčešće koriste adenovirusi koji uzrokuju bolesti kod čovjekolikih majmuna, kao što su čimpanze ili gorile, jer su genetski i strukturno slični ljudskim adenovirusima te se adenovirusi čovjekolikih majmuna lako mogu prilagoditi u vektore za cjepivo.⁹ Neki od potencijalnih kandidata izrađenih na ovom principu su cjepiva protiv virusa Zike ili HIV-a. Treći način je primjena

genetskog inženjeringa za promjenu nekih postojećih *Ad* vektora, kako bi dobili bolju imunološku reakciju. Bijele krvne stanice najčešće napadaju strana tijela prema svojem antigenskom sastavu na vanjskoj ovojnici, pa promjenom sastava antigena moguće je izazvati nove reakcije, neovisne o prethodno stečenom imunitetu.⁹

2.2.3.3 Primjena i proizvodnja adenovirusnih cjepiva

Genom *Ad* vektora najčešće se sastoji od 34 do 43 tisuće parova baza, što ga čini relativno malim i dobrim za manipulaciju. Gen za replikaciju virusa mora se prvo ukloniti prije početka modificiranja. Tako se povećava sigurnost budućeg cjepiva i omogućuje unošenje traženog antigena. Uz to također je bitno ukloniti gene u određenim regijama koji kodiraju proteine koji sprječavaju optimalnu imunološku reakciju i uklanjanjem se optimizira djelovanje cjepiva. Nakon pripreme umjetnog genoma, genom se unosi u stanice u kojima se pakira i provode se testovi za djelovanje novonastalog cjepiva. Po završetku ispitivanja započinje proizvodnja *Ad* vektora na puno većoj skali. Budući da se tijekom pripreme soja mogu uvesti dodatne genetičke informacije u *Ad* vektore, moguća je ugradnja različitih sljedova za isti antigen i brzo identificiranje optimalnih kandidata za buduće cjepivo. Priprava *Ad* vektora također ne zahtjeva korištenje strogih kontrola za sigurnost, kao što je primjer kod vrlo infektivnih patogena prije inaktivacije, pa je sam proces proizvodnje sigurniji i brži te se može provoditi na puno većoj skali.¹⁰

2.2.4 Peptidna cjepiva

Kod dizajniranja novog cjepiva glavni je cilj izazvati što bolji odaziv imunološkog sustava pomoću čega će organizam zapamtiti određeni dio patogena, bilo produkt kojeg proizvodi ili određena njegova podjedinica kako bi se spriječila infekcija. Bijele krvne stanice prepoznaju određene sekvence na patogenu kao što su karakteristični proteini i nakon detekcije priprema stanicu za fagocitozu. Patogeni mogu imati i do stotine različitih proteina na površini, ali najčešće se detekcija bazira na karakterističnim proteinima i oni su meta pri izradi novih cjepiva. Već su spomenuta cjepiva na bazi podjedinicama, koji unose u organizam određeni karakteristični dio patogena. Daljnja istraživanja na tim podjedinicama pokazala su kako ti sami određeni proteini u sebi sadrže posebne aminokiselinske dijelove koje prepoznaju bijele krvne stanice i nazivaju se epitopi. Jedan takav karakteristični antigen može sadržavati stotine takvih epitopa, no ipak nisu svi potrebni za kvalitetni odaziv imunološkog sustava. Stoga je ideja peptidnih cjepiva sintetizirati peptid od 20 do 30 aminokiselina, koji je analogan epitopu imunogenog peptida nekog antigena. Nakon unosa u tijelo čovjeka takav peptid izaziva imunološki odgovor i stvaranje antitijela specifična za

izvorni antigen iz kojeg upotrijebljeni epitop potječe. Prednost peptidnih cjepiva bila bi da takvi kraći sljedovi aminokiselina trebali bi imati dobar odaziv bez izazivanja potencijalne alergijske reakcije, koje mogu imati cjepiva koja koriste više različitih proteina na površini patogena. Također, takva cjepiva bi mogla obraniti organizam od više različitih sojeva istog virusa, korištenjem modificiranih epitopa koja imaju slijed zajednički za više sojeva. Zato što se radi o manjim podjedinicama i sami po sebi imaju slabu imunološku reakciju, pa se moraju stabilizirati pomoću nosača.^{12,13}

Proizvodnja peptidnih cjepiva počinje s identificiranjem i određivanjem pojedinih epitopa u karakterističnim proteinima patogena. Epitopi prikladni za izradu cjepiva otkriveni su prema testovima s aktiviranjem bijelih krvnih stanica. Kako bi se dalje specificirali epitopi, potrebno je izolirati one koji aktiviraju T-stanice, koje služe za pohranu informacija o stranom tijelu u čiju svrhu potrebno je pronaći visoko konzervirane epitope unutar soja. Pomoću različitih bio-informatičkih metoda mogu se pripremiti simulacije koje bi dale moguće simulacije za vezanje antitijela ili simuliranje prepoznavanje određenog peptida pomoću T-stanica. Metodom masne spektroskopije mogu se prepoznati regije gdje se antitijela vežu na antigenske epitope, a potom različitim *in silico* metodama mogu se napraviti simulacije vezanja antitijela na cijelu površinu antigena. Druge metode koriste strukture antigena i kompleksa antigena s antitijelom dobivene pomoću NMR-a i rendgenske analize kristala kako bi se opisale interakcije na atomskoj razini. Nakon provedenih ispitivanja konstruiraju se prikladni antigeni s optimalnim epitopima, koji se zatim konjugira na molekule nosača, nakon čega slijede *in vitro* ispitivanja.¹²

Peptidna se cjepiva mogu na više načina unijeti u organizam pri čemu je najčešći način korištenjem liposoma, čestica koje imaju vodenu srž obavijenu lipidnim dvoslojem, koji oponaša staničnu ovojnica patogena. Prednost ovakvog nosača je što se može lako modificirati i prilagoditi boljoj detekciji peptida vezanog na površini. Slično liposomima postoje još i virosomi, koji su slična grupa građena od membranskih proteina koji omogućuju bolju detekciju cjepiva i promoviraju ulaz u citoplazmu, a građeni su većinom od fosfolipida pronađenih kod ljudskih stanica. Dodatna prednost kod virosoma je njihova dobra bio-razgradnja i svojstvo da se ne induciraju antitijela protiv samih virosoma.^{12,13}

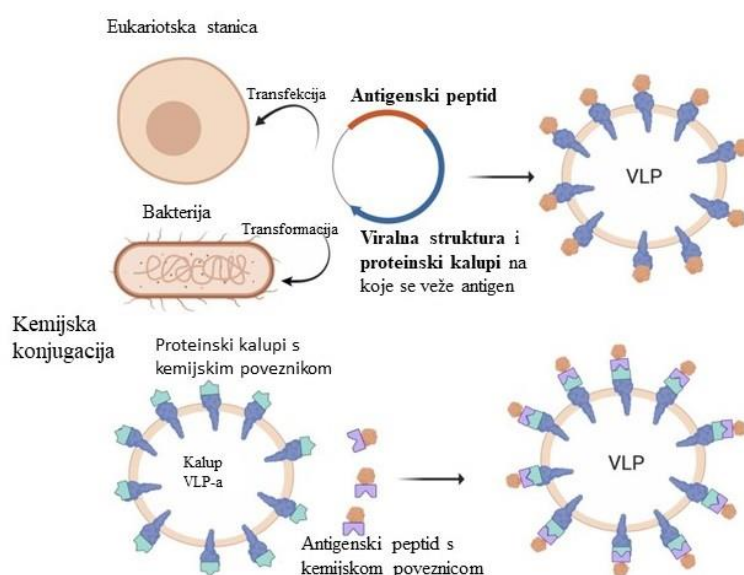
2.2.5 Čestice nalik virusima

Novi smjer razvoja cjepiva ne bazira se na korištenju nekog inaktiviranog patogena, već na korištenju nekih alternativnih metoda ili korištenje karakterističnih dijelova patogena,

što čini ukupan proces proizvodnje sigurnijim i omogućuje sintezu te pročišćavanje veće količine antigena. Ipak takva cjepiva često izazivaju slabiju imunološku reakciju, a mogu se nadomjestiti razvojem boljih sintetiziranih antigena. Čestice nalik virusima ili „virus-like particles“ (VLP) po strukturi slične pravim virusima, ali nemaju sposobnost replikacije zbog nedostatka viralnog genoma, što im daje dodatni faktor sigurnosti. Mogu se sintetizirati unošenjem plazmida u eukariotskim ili prokariotskim stanicama, od kojih su jedni produkti antigenski peptidi koji imaju sposobnost samostalnog slaganja u strukturu VLP-a na virusnu strukturu koja je također produkt istog plazmida. Taj proces naziva se proteinska fuzija, a ilustrirana je na Slici 5. Kemijska konjugacija drugi je način izrade VLP-a, a odvija se prvo sintetiziranjem praznog kalupa, na koji se naknadno vežu antigeni s dodatnim veznim podjedinicama, kao što je prikazano na Slici 5. Iako nemaju sposobnost replikacije, VLP-i su ipak pokazali jako dobre odazive od imunog sustava, naime VLP detektiraju posebne dendritne stanice u posebnim tkivima, koji aktiviraju T- stanice bijelih krvnih stanica koje detektiraju i spremaju informacije o cjepivu, prije nego dolazi do odaziva B- stanica i razaranja cjepiva. Zbog same strukture VLP-a, gdje su na površini izloženi ponavljajući sljedovi antigena, T- stanice lako mogu zapamtiti epitope u njima i zbog toga dolazi do bolje retencije imunosti.^{14,15}

Proizvodnja VLP-a

Proteinska fuzija



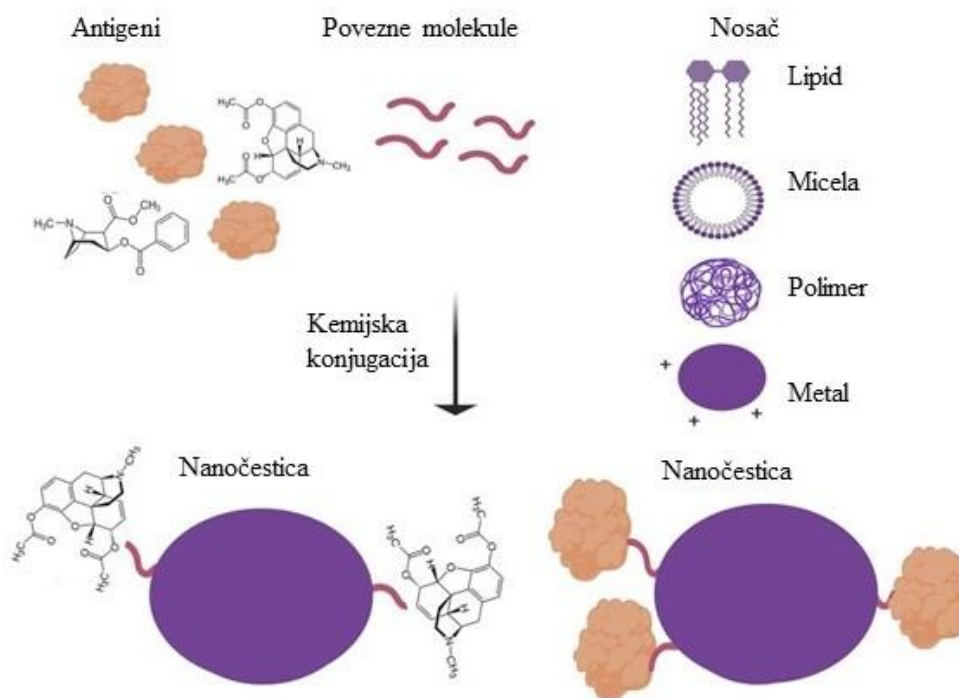
Slika 5. Shema proizvodnje čestica nalik virusima metodom *in vitro* proteinskom fuzijom i metodom spajanja kalupa i antigena kemijskom konjugacijom. Preuzeto i prevedeno iz „Emerging Concepts and technologies in Vaccine Development“¹⁴

2.2.6 Nanočestice i rekombinantna cjepiva

Cjepiva na bazi nanočestica (eng. nanoparticles, skraćeno NP) slični su prethodno opisanim VLP-ovima, sastoje se od konjugiranih jedinica antigena i nosača povezanih pomoću povezne molekule, od kojih nosači mogu biti organski na bazi lipida, anorganski na bazi metala ili polimerne građe. Sami antigeni koji se koriste imaju sličnu strukturu proteinima izloženim na vanjskoj ovojnici patogena, ali se ipak u manjoj mjeri razlikuju i nazivaju se rekombinanti proteini. Njihova struktura čini konačni produkt vrlo stabilnim, ali za razliku od VLP-a ne daju toliko jaki imunološki odaziv. Za razliku od VLP-a, NP-i ne sadrže toliko ponavljajućih proteinskih jedinica, što ih čini lakšim i sigurnijim za sintezu. Kako bi se optimizirao odaziv imunološkog sustava, istraživanja su krenula putem optimizacije interakcija između antigena i nosača, modificiranjem sastava nosača na temelju oblika nosača, naboja ili hidrofobnosti, a sami nosači ujedno mogu poboljšati interakcije između cjepiva i specifičnih antigenskih detektora, kao što je primjer kod cjepiva tvrtke Novavax, čije cjepivo koristi adjuvant „Matrix-M“ u svrhu pojačavanja signala staničnih receptora.^{14,16}

Za razliku od VLP-a, pri izradi NP-a antigeni se moraju samostalno sintetizirati. Sinteza se vrši unošenjem genetskog koda antigena u genom domaćina, primjer toga je unošenje antigenskog koda u baculovirus. Takvi virusi zatim se uzgajaju u eukariotskim stanicama, kao što su S9 stanice moljca. Zatim se virus s antigenom, pomoću enzima iz S9 stanica transkribira i translatira, pri čemu nastaje velika količina antigena koja se odvaja s površine stanica. Zatim se rekombinantni protein pročisti i uz pomoć specifične molekule poveznice veže se na molekulu nosača tvoreći nanočesticu, a cjelokupni proces prikazan je na Slici 6. Posljednju je korak klinički ispitati nastalo cjepivo, prije nego uđe u medicinsku uporabu.¹⁶

Proizvodnja nanočestičnih cjepiva (NP-a)



Slika 6. Shema proizvodnje dva različita cjepiva sintezom antigena, povezne molekule i nosača te stvaranje nanočestice konjugacijom svih triju komponenta. Preuzeto i prevedeno iz „*Emerging Concepts and technologies in Vaccine Development*“¹⁴

2.2.7 Biomaterijali kao budućnost prenositelja cjepiva

Uz istraživanja različitih načina kako izazvati reakciju imunološkog sustava, postoje i istraživanja vezana uz nosače cjepiva koja su također važna. Ukoliko postoji odlično cjepivo, no bez pripadnog nosača, cjepivo neće biti od praktične koristi. Istraživanja oko prenosioaca cjepiva započela su s istraživanjem različitih cjepiva koja ne koriste same patogene kao izvor stjecanja imunosti. Tako su za mRNA cjepiva otkriveni LNP prenositelji, a za NP cjepiva se koriste različite biološke ili modificirane molekule na koje se vežu antigeni. Korištenjem biomaterijala mogu se modificirati signali imunološkog sustava ili se mogu prilagoditi određenim vrstama stanica za bolji unos cjepiva u stanice. Što se tiče samog cjepiva, različiti biomaterijali mogu povećati stabilnost molekula antigena ili mRNA cjepiva koje prenose, zarobivši cjepivo u lipidne nosače, polimerne čestice ili vezanjem antigena na površinu određenih sfernih nosača, pri čemu se ističu zlatne nanočestice ili polistirenske kuglice.⁹

Razvoj kemije polimera pomogao je u razvoju novih nosača cjepiva, pomoću modificiranja odaziva antigena *in situ*. Brzina kojom se nakon cijepjenja u stanici proizvode antigeni i reakcije koju izaziva povezane su s odazivom imunološkog sustava, čime su se razvile metode koje mogu modificirati trajanje ili vrijeme aktivacije signala antigena. Takav je primjer kod novijih poliesterskih nosača poli (mliječna- *co*- glikolna kiselina) koriste se kao nosači lijekova i mogu se modificirati trajanje degradacije ovojnice te vrijeme otpuštanja lijeka. Eksperimenti s takvim poliesterskim nosačima pokazuju potencijalnu primjeru kontroliranog otpuštanja lijeka, što sa sobom vuče jači odaziv od imunološkog sustava i usmjerava istraživanja u praćenje veze između dizajna cjepiva i imunološkog odaziva.⁹

Također provedena su mnoga istraživanja oko nosača površinskih antigena, kao što su nosači kod VLP ili NP-a. Pomoću dizajniranja ponavljajućih sljedova više istih antigena, cjepiva mogu bolje oponašati vanjsku strukturu nekog patogena i time bolje predati informacije o patogenu obrambenom sustavu. Modificiranje broja antigena izloženih na površini nanočestica također je bitno, jer se pokazalo na cjepivima za viruse poput HIV- 1, da cjepiva s većom gustoćom ponavljajućih jedinica izazivaju jači odaziv antitijela od onih s manjom gustoćom. Daljnjim istraživanjem ovog područja dolazi se do spoznaja između rasporeda vanjskih proteinskih struktura patogen i imunološkog odaziva. Novija istraživanja pokazala su kako korištenjem posebnih adjuvanta može dovesti do specifično usmjerene detekcije antigena od bijelih krvnih stanica. Tako su daljnja istraživanja potrebna, kako bi se modificirali nosači da izazovu odaziv specifičnih imunoloških puteva i bolje uzrokovali imunost.^{9,16}

§3. Literaturni izvori

1. S. Plotkin, *History of Vaccination, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (2014) 34 12283-12287, doi: 10.1073/pnas.1400472111
2. *Understanding Six Types of Vaccine Technologies, 2023., Pfizer,*
https://www.pfizer.com/news/articles/understanding_six_types_of_vaccine_technologies (datum pristupa 28. ožujka 2023.)
3. S. A. Plotkin, *Vaccines: past, present and future, Nat. Med.* **11** (2005) 4 5-11, doi: 10.1038/nm1209
4. F. Kowalzik, D. Schreiner, C. Jensen, D. Teschner, S. Gehring, F. Zepp, *mRNA- Based Vaccines, Vaccines* **9** (2021) 390 1-12, doi: 10.3390/vaccines9040390
5. N. Pardi, M. J. Hogan, D. Weissman, *Recent advances in mRNA vaccine technology, Curr. Opin. Immunol.* **65** (2020) 14-20 , doi: 10.1016/j.coi.2020.01.008
6. *What Makes an RNA Vaccine Different From a Conventional Vaccine, 7. kolovoza 2022., Pfizer,*
https://www.pfizer.com/news/articles/what_makes_an_rna_vaccine_different_from_a_conventional_vaccine (datum pristupa 22. lipnja 2023.)
7. *Let's talk about lipid nanoparticles, Nat. Rev. Mat.* **6** (2021) 99, doi: 10.1038/s41578-021-00281-4
8. S. Linarez-Fernandez, C. Lacroix, J. Y. Exposito, B. Verrier, *Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response, Trends Mol. Med.* (2021) 1-11, doi: 10.1016/j.molmed.2019.10.002
9. M. S. Gebre, L. A. Brito, L. H. Tostanoski, D. K. Edwards, A. Carfi, D. H. Barouch, *Novel approaches for vaccine development, Cell* **184** (2021) 1583-1599, doi: 10.1016/j.cell.2021.02.030
10. A. J. A. Crommelin, T. J. Anchordoquy, D. B. Volkin, W. Jiskoot, E. Mastrobattista, *Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability, J. Pharm. Sci.* **110** (2020) 998-1001, doi: 10.1016/j.xphs.2020.12.006
11. J. Cheng, *Adenovirus Vectors: Excellent Tools for Vaccine development, Immune Net.* (2021), doi: 10.4110/in.2021.21.e6
12. W. Li, M. D. Joshi, S. Singhanian, K. H. Ramsey, A. K. Murthy, *Peptide Vaccine: Progress and Challenges, Vaccines* **2** (2014) 515-536, doi: 10.3390/vaccines2030515
13. A. Nelde, H. G. Rammensee, J. S. Waltz, *The Peptide Vaccine of the future, Mol. Cel. Proteomics* **20** (2020) 1-7, doi: 10.1074/mcp.r120.002309

14. M. Brisse, S. M. Vrba, N. Kirk, Y. Liang, H. Ly, *Emerging Concepts and technologies in Vaccine Development*, *Front. Immunol.* **11** (2020) 1-14, doi: 10.3389/fimmu.2020.583077
15. N. K. Tripathi, A. Shrivastava, *Recent Development in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines*, *Front. in Immuno.* **9** (2018) 1-11, doi: 10.3389/fimmu.2018.01919
16. *Our recombinant, protein-based nanoparticle vaccine technology*, 2023., Novavax, <https://www.novavax.com/science-technology/recombinant-protein-based-nanoparticle-vaccine-technology> (datum pristupanja 27. lipnja 2023.)
17. M. S. Diamond, T. C. Pierson, *The Challenges of Vaccine Development against a New Virus during a Pandemic*, *Cell Host Microbe* **27** (2020) 699- 703, doi: 10.1016/j.chom.2020.04.021
18. *SARS-COV-2 Variant Classifications and Definitions*, 20. ožujka 2023., Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> (datum pristupanja 28. lipnja 2023.)