

mRNA cjepiva protiv bolesti COVID-19

Montan, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:017138>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-20**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Andrea Montan
mRNA cjepiva protiv bolesti COVID-19
Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Andrea Montan
mRNA cjepiva protiv bolesti COVID-19
Završni rad

Rijeka, 2022.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate programme
„Biotechnology and drug research“

Andrea Montan
mRNA vaccines against COVID-19
Bachelor thesis

Rijeka, 2022.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Završni rad obranjen je dana 27.07.2022.

pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Igor Jurak
2. doc. dr. sc. Ilija Brizić
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Rad ima 33 stranice, 7 slika i 42 literaturna navoda

Sažetak

Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2, virus je koji se pojavio krajem 2019. godine u Wuhanu, proširio svijetom i uzrokovao pandemiju koronavirusne bolesti 19. Zbog brzog širenja virusa i često eksponencijalnog rasta zaraženih, javili su se brojni problemi u zdravstvu, ali i svjetskoj ekonomiji i gospodarstvu. Kako bi se spriječilo širenje virusa i smanjio broj pacijenata većina država uvodila je stroge epidemiološke mjere te je zatvarala svoje granice. Pandemija COVID-19 zahtijevala je brzu reakciju znanstvenika te su nekoliko dana nakon sekvenciranja genoma virusa započela brojna istraživanja usmjerena razumijevanju biologije virusa te terapijskim i preventivnim pristupima protiv COVID-19 bolesti. Pritom su uspješno iskorištena prethodna znanja o cjepivima i modernoj mRNA tehnologiji te je upravo mRNA cjepivo bilo prvo odobreno cjepivo protiv koronavirusne bolesti. mRNA tehnologija u posljednjih deset godina doživjela je velik razvoj te je danas često korištena tehnika u eksperimentalnim pristupima liječenju raka. mRNA molekule za cjepiva se sintetiziraju *in vitro* na temelju sekvence genoma ciljanog patogena te se cijepljenjem unose u organizam nakon čega aktiviraju urođeni i stečeni imunosni odgovor. Stoga se mRNA tehnologija ubraja u važne pristupe prevencije COVID-19 bolesti te se očekuje da će pridonijeti završetku pandemije COVID-19.

Ključne riječi:

SARS-CoV-2 virus, pandemija COVID-19, mRNA tehnologija, mRNA cjepiva, Pfizer, Moderna

Summary

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, appeared in late 2019. in Wuhan, spread around the world and caused coronavirus pandemic. Due to rapid spread of the virus and almost an exponential growth of those infected individuals, numerous problems arose in healthcare, as well as in the world economy. In order to prevent spread of the virus and reduce the number of patients, most states introduced strict epidemiological measures. The COVID-19 pandemic required a quick response from scientists, so few days after sequencing of the virus genome, intense research began to understand the biology of the virus, and preventive and therapeutic measures against COVID-19 infection. Previous knowledge of vaccines and modern mRNA technology has been used and mRNA vaccine became first approved vaccine against coronavirus disease. mRNA technology had a major development in the last ten years and today it is often used technique in experimental tumor targetting. mRNA molecules are synthesized *in vitro* based on the pathogen genome sequence and are introduced into the body by vaccination. After vaccination they stimulate a protective immune response. mRNA technology is one of the major upcoming therapeutic approaches and will likely contribute to ending COVID-19 pandemic.

Key words:

SARS-CoV-2 virus, coronavirus disease, pandemic, mRNA technology, mRNA vaccines

SADRŽAJ:

1.	Uvod	1
2.	Svrha rada	3
3.	SARS-CoV-2 – uzročnik pandemije	4
3.1.	Otkriće virusa i tijek pandemije	4
3.2.	Općenito o virusima: građa i receptori	6
3.3.	Put infekcije i imunosni odgovor	9
3.4.	Varijante virusa.....	11
4.	mRNA cjepiva	12
4.1.	Općenito o cjepivima.....	12
4.2.	Općenito o mRNA tehnologiji	13
4.3.	Dizajn mRNA cjepiva.....	15
4.4.	Farmakologija i unod mRNA cjepiva u stanice	17
4.5.	Prekretnica pandemije: razvoj mRNA cjepiva protiv bolesti COVID-19	18
4.6.	BioNTech/Pfizer i Moderna cjepiva.....	20
5.	Važnost cjepiva i popularizacija znanosti	22
5.1.	Post Covid sindrom i utjecaj virusa na društvo	22
5.2.	Mitovi o cijepljenju.....	23
6.	Literatura	24

1. Uvod

Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2, prema eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) je virus koji se pojavio krajem 2019. godine u Wuhanu, proširio svijetom i uzrokovao pandemiju koronavirusne bolesti 19 (COVID-19, prema eng. Coronavirus disease 2019). Do travnja 2022. godine, zabilježeno je 485 milijuna slučajeva i oko 6 milijuna umrlih, no taj se broj svakodnevno povećava¹.

Virus je prvi puta opisan u prosincu 2019. godine kao uzročnik bolesti respiratornog sustava, a koji se po građi i načinu infekcije razlikuje od do sada poznatih srodnih virusa, specifično koronavirusa koji uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom (SARS-CoV-1, prema eng. severe acute respiratory syndrome coronavirus 1) i koronavirusa koji uzrokuje bliskoistočni respiratorni sindrom (MERS-CoV, prema eng. Middle East respiratory syndrome coronavirus). Ubrzo nakon što su znanstvenici izolirali novi virus, WHO (prema eng. World Health Organization) i međunarodni centar za taksonomiju virusa (prema eng. International Committee on Taxonomy of Viruses) dodijelili su ime sedmom koronavirusu koji inficira ljude². SARS-CoV-2 prema Baltimorovoj podijeli pripada četvrtoj skupini virusa; to su virusi koji kao genetski materijal imaju pozitivnu jednolančanu molekulu RNA (eng. +ssRNA). Pojam koronavirus dolazi od latinske riječi „corona“, a odnosi se na viruse koji pod elektronskim mikroskopom imaju karakterističan izgled krune. SARS-CoV-2 pripada skupini beta koronavirusa koji inficiraju ljude, a mogu se prenositi i putem životinja. Ipak, najčešći način prijenosa je interakcijom između ljudi, kapljicama koje se raspršuju kašljanjem ili kihanjem. Genetski materijal obavljen je nukleoproteinima koji čine kapsidu. Genom ovih virusa visoko je očuvan, a karakterizira ga prisustvo RNA polimeraza (RdRp, prema eng. RNA-dependent RNA polymerase) kao replikacijskih gena³. Koronavirusi kodiraju za četiri strukturna proteina; protein šiljka (S, prema eng. spike), protein ovojnice (E, prema eng. envelope), protein nukleokapside (N, prema eng. nucleokapsid) i protein membrane (M, prema eng. membrane)⁴. S protein nalazi se na površini kapsule virusa, a služi za prihvatanje i ulazak virusa u stanice. Detaljnije o načinu prihvatanja i putu infekcije pisat ću dalje u ovom radu. Proteini M i E odgovorni su za formaciju lipidne ovojnice virusa dok protein N služi za stabilizaciju nukleokapside. Vezanjem za ljudski angiotenzin konvertirajući 2 receptor (ACE-2, prema eng. angiotensin converting enyzme-2) virusu je omogućen ulazak u stanice. Nakon što uđe u stanice, SARS-CoV-2 kreće u replikaciju svog genoma. Virus sadrži i dvije do tri proteaze koje stvaraju inicijalni poliprotein za koji se zatim vežu ne-strukturni proteini i tvore kompleks replikaza-transkriptaza koji posreduje u replikaciji i transkripciji virusnog genoma.

Ulaskom virusa u stanicu, različiti receptori za obrasce patogena (PRR, prema eng. pattern recognition receptor) i receptori slični Tollu (TLR, prema eng. Toll-like receptors) prepoznaju oštećenja (DAMP-ove, prema eng. damage-associated molecular patterns) i virusnu RNA (PAMP-ove, prema eng. pathogen-associated molecular patterns) te stanice domaćina započinju s proizvodnjom interferona tipa 1 (IFN-1). Aktivacijom stanica urođene imunosti kreće lučenje citokina, a potom i aktivacija stanica stečene imunosti. Ovisno o brzini replikacije virusa unutar stanice i jačini imunskog sustava pojedinca, simptomi COVID-19 bolesti različito se manifestiraju. Posebno osjetljiva skupina su starije osobe i ljudi s drugim kroničnim bolestima. Simptome možemo podijeliti u četiri skupine: to su blagi simptomi, umjereni, teški i posebno teški s potrebom za hospitalizacijom³. U epitelu pluća i ostalim dijelovima respiratornog sustava prisutna je značajnija količina ACE-2 receptora pa virus prvo zahvaća te dijelove organizma. Osim respiratornog sustava, virus inficira i kardiovaskularni, gastrointestinalni, bubrežni i živčani sustav. Jedni od prvih simptoma bolesti su povišena tjelesna temperatura (javlja se u otprilike 85% slučajeva), neproduktivni kašalj, otežano disanje i opća slabost⁴. Od ostalih simptoma mogu se javiti glavobolje, mučnine i bol u mišićima. Kod nekih osoba zaraza može biti asimptomatska, odnosno bez manifestacije simptoma, ali usprkos tome, one mogu širiti infekciju⁵.

Zbog brzine širenja i mogućnosti mutacije, virus se brzo proširio svijetom i uzrokovao probleme u zdravstvenom i ekonomskom sustavu gotovo svih zemalja. Nakon identifikacije novog virusa, znanstvenici su krenuli s istraživanjima strukture virusa, načina i puta infekcije i mehanizma djelovanja na organizam kako bi razvili odgovarajuće lijekove i cjepiva kojima bi zaustavili širenje ove pandemije. Pronašli su razne terapijske mete na koje bi mogli djelovati. Neke od njih su sprječavanje vezanja SARS-CoV-2 za receptore, inhibicija sinteze i replikacije virusne RNA i modulacija imunskog odgovora domaćina putem cjepiva. Otkriće i pokretanje proizvodnje cjepiva značajno je promijenilo tok pandemije COVID-a. Danas na tržištu EU postoji 7 vrsta cjepiva protiv ove bolesti, a možemo ih podijeliti u 3 skupine. To su rekombinantna proteinska cjepiva, DNA cjepiva bazirana na adenovirusnim vektorima te mRNA cjepiva⁶. mRNA tehnologija razvija se već dugi niz godina i eksperimentalno se koristila u cjepivima protiv raznih zaraznih bolesti kao što je gripa, imunoterapiji kod karcinoma, terapiji za ublažavanje simptoma alergija i mnogim drugim terapijama. Ova tehnologija značajnije je ubrzala proces razvoja cjepiva što je i dokazano 2020. godine tijekom pandemije. Klasična cjepiva koja sadrže cijele patogene, ali često i rekombinantna proteinska cjepiva potrebno je razvijati dugi niz godina dok je za moderna cjepiva na bazi nukleinskih kiselina potrebno samo izolirati dio sekvence genoma patogena, čime se ubrzava proces razvoja i proizvodnje. Nakon unosa nukleinske kiseline putem mRNA cjepiva, primatelj izražava kodirane antigene na površini stanica te se oni

prezentiraju na antigen prezentirajućim stanicama, preko molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti tipa I (MHC, prema eng. major histocompatibility complex) čime se posljedično aktiviraju stanice humoralne i stanične imunosti⁷.

2. Svrha rada

Nedugo nakon što je sekvenciran genom SARS-CoV-2 virusa krenuo je razvoj cjepiva te je upravo mRNA bilo prvo licencirano cjepivo u prevenciji ove bolesti. U ovom radu, osim građom i sposobnostima SARS-CoV-2 virusa, bavit ću se mRNA tehnologijom i cjepivima nove generacije koja bi potencijalno mogla donijeti kraj pandemiji COVID-19. U radu ću sažeto prikazati dosadašnja otkrića u strukturi i karakteristikama virusa i znanja o novo razvijenim cjepiva u svrhu popularizacije znanosti i edukacije ljudi o mRNA cjepivima i općenito, pandemiji COVID-19.

3. SARS-CoV-2 – uzročnik pandemije

3.1. Otkriće virusa i tijek pandemije

31. prosinca 2019. godine, „Wuhan Municipal Health Commission“ zabilježio je prvih 27 slučajeva netipične upale pluća u Wuhanu, u provinciji Hubei⁸. Ubrzo nakon toga znanstvenici su izolirali i sekvencirali genom te imenovali uzročnika bolesti. Prve slučajeve COVID-19 bolesti liječnici su povezali s tržnicom morskih plodova u Wuhanu. Iako znanstvenici to ne mogu sa sigurnošću potvrditi, ta tržnica se smatra potencijalnom lokacijom iz koje je krenuo prijenos SARS-CoV-2 virusa s životinje na čovjeka. Kao mogući prenositelji novog koronavirusa smatraju se šišmiši, zečevi, štakori i zmije³. 2019. godine u Kini, znanstvenici su pronašli koronavirus srodne SARS-CoV-2 virusu kod vrste Malajskog ljuskavca (lat. *Malayan pangolis*), gdje se genom podudara od 85,5% do 92,4% te kod Malajskog šišmiša (lat. *Rhinolophus malayanus*) s podudarnosti genoma od čak 97,2%⁹. Srodne vrste koronavirusa pronađene su i u ostalim dijelovima Azije zbog čega je teško utvrditi točan postanak i razvoj SARS-CoV-2 virusa. Nakon identifikacije, virus se počeo širiti u obiteljima i preko kontakta prvih pacijenata zbog čega je dokazan put prijenosa s čovjeka na čovjeka. Tijekom kineske Nove godine virus se iz Wuhana velikom brzinom proširio u okolne gradove. Iako su vlasti 23. siječnja 2020. godine donijele zabranu putovanja, zbog velike brzine replikacije, virus se već proširio cijelom državom¹⁰.

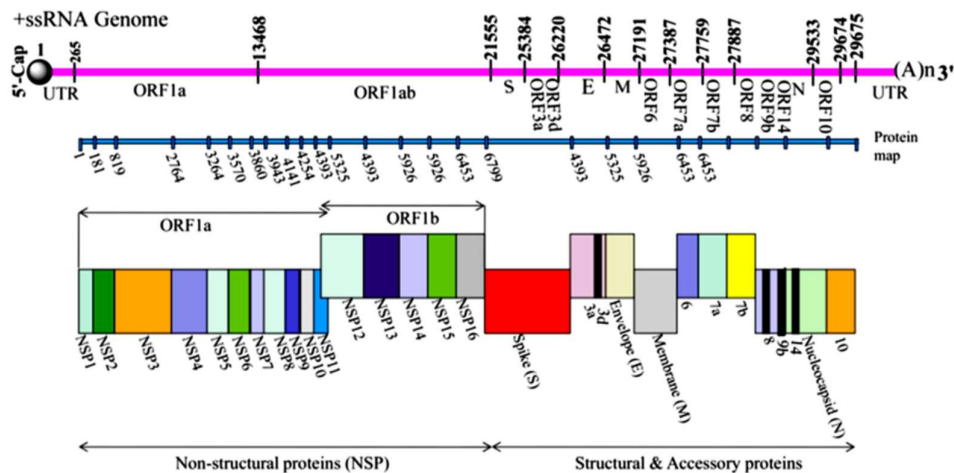
U prvoj fazi pandemije, tijekom prva dva tjedna, putnici su napuštali Wuhan i odlazili u zemlje Europe i SAD-a gdje su nakon nekoliko dana počele prijave prvih slučajeva. Od sredine veljače do sredine ožujka 2020. godine zbog internacionalnih putovanja epicentar virusa preselio se na Europu (Italija, Francuska, Španjolska) i Bliski Istok. Sjeverna regija Italije bila je najgore pogođeno područje Europe s brzo rastućim, eksponencijalnim brojem slučajeva. Do kraja 2020. godine u Italiji je zabilježeno preko milijun zaraženih s oko 45 tisuća smrtnih slučajeva¹¹. Mjere obaveznog testiranja u zračnim lukama i 14-dnevna karantena značajno su smanjile širenje virusa u druge države no nažalost to nije bilo dovoljno te je 11. ožujka 2020. godine proglašena pandemija COVID-19. Do kraja ožujka, globalni epicentar postaje Sjeverna Amerika. U SAD-u je do kraja godine zabilježeno preko 20 milijuna slučajeva i 350 tisuća umrlih¹². Tijekom prvog vala sve su države svijeta uvele mjere koje su poboljšale epidemiološku situaciju; obavezno nošenje maski, socijalnu distancu, dezinficiranje prostora. Gotovo sve su zemlje proglasile karantenu, zatvorile svoje granice, uvele obavezna testiranja i ograničile sva događanja unutar države. Do ljeta 2020. godine situacija se poboljšala zbog čega su i epidemiološke mjere popustile. Nažalost, nakon popuštanja mjera ponovo su krenule migracije

stanovništva, a s njima i širenje mutirane varijante SARS-CoV-2 virusa. Novi, drugi val pandemije krenuo je u listopadu 2020. godine. Države su ušle u drugu karantenu, opet su uvele stroge epidemiološke mjere, a pritisak na zdravstvo i ekonomiju postao je još veći. Nova varijanta virusa imala je veću transmisiju pa su i posljedice bile teže. Do veljače 2021. godine potvrđeno je 103 milijuna slučajeva i više od 2 milijuna umrlih ¹³. Sve ove brojke bile bi još veće da WHO nije odobrio prvo cjepivo protiv SARS-CoV-2 virusa- BioNTech/Pfizer mRNA cjepivo. Tijekom prva četiri mjeseca 2021. godine u Europi je odobreno još jedno mRNA cjepivo tvrtke Moderna i dva adenovirusna cjepiva tvrtki AstraZeneca i Johnson&Johnson. U veljači 2021. godine kreće masovna proizvodnja i distribucija cjepiva u većinu država svijeta^{14,15}. Nakon toga kreću cijepljenja populacije; prvo starijeg i visokorizičnog stanovništva, a zatim i ostalih. Prevencija cijepljenjem i održavanje epidemioloških mjera znatno su usporile širenje virusa, smanjile pritisak na zdravstveni sustav i smanjile stopu smrtnosti. Nažalost, zbog mutacija virusa, u drugoj polovici 2021. godine identificirane su nove varijante, omikron i delta te kreće novi val pandemije. Mutacije koje su najviše utjecale na vezanje virusa za receptor su mutacije na S proteinu. Mutacije virusu omogućuju lakšu transmisiju i veću otpornost na cjepiva. U trećem valu pandemije i cijepljene osobe bile su zaražene SARS-CoV-2 virusom ali s blažim simptomima i kraćim trajanjem bolesti. Bez obzira na to liječnici su poticali na cijepljenje zbog prevencije bolesti, smanjenja hospitalizacija i kako bi potencijalno mogli proglasiti kraj pandemije. Do travnja 2022. godine 65,5% stanovništva primilo je barem jednu dozu cjepiva, a sveukupno je administrirano oko 11,6 milijardi doza ¹⁶. Do svibnja 2022. godine, još uvijek nije proglašen kraj pandemije ali cijepljenje i ostale mjere zasigurno su doprinijele poboljšanju epidemiološke situacije i smanjenom broju pacijenata. Ne zna se hoće li virus u budućnosti još mutirati, no znanstvenici predviđaju da će simptomi bolesti postati kao kod prehlade i da će se ubrzo proglasiti kraj pandemije COVID-19.

3.2. Općenito o virusima: građa i receptori

SARS-CoV-2 virus pripada redu *Nidovirales*, obitelji koronavirusa (lat. *Coronaviridae*), podobitelji *Orthocoronavirinae*, rodu beta koronavirusa (lat. *Betacoronavirinae*) te podrodu *Sarbecovirus*⁴. Beta koronavirusi su skupina sferičnih virusa koji veličinom variraju od 80 do 220 nanometara³. SARS-CoV-2 pripada skupini virusa koji kao genetski materijal imaju pozitivnu jednolančanu RNA molekulu (+ssRNA). Njihov genom identičan je mRNA molekuli pa se izravno translatira u proteine u stanici domaćina. Nukleoproteini obavijaju genetski materijal i čine nukleokapsidu. Na površini kapside nalaze se proteini šiljka karakteristični za koronavirus, a koji im omogućuju lakše vezanje za stanicu domaćina. Kao i kod ostalih beta koronavirusa građa se temelji na 6 funkcionalnih otvorenih okvira čitanja (ORF, prema eng. open reading frames) koji su posloženi od 5' do 3' kraja redom; replikaza (ORF1a/ORF1b), S, E, M i N proteini². **(slika 1)** Osim ovih, građu virusa čine 9 dodatnih (eng. accessory) proteina te ne-strukturni proteini. Replikaza gen čini dvije trećine genoma virusa, a kodira za veliki poliprotein koji sudjeluje u procesu replikacije i translacije. Nakon što virus uđe u stanicu, RNA genom prepisuje se u poliproteine (pp1a i pp1b) koji se zatim procesiraju u 16 ne-strukturnih proteina (prema eng. NSP) koji tvore kompleks replikaze-transkriptaze².

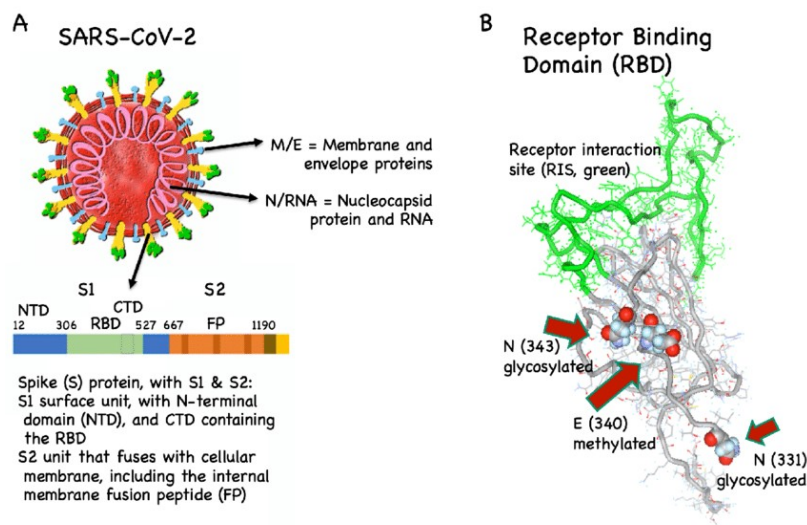
S protein je glikoprotein veličine otprilike 150 kilodaltona, a dijeli se na dvije podjedinice; S1 i S2. S1 sudjeluje u adheziji virusa za površinu stanice domaćina dok S2 pomaže u fuziji s membranom domaćina¹³. Između dvije podjedinice nalazi se umetnuta sekvenca od 4 ostatka (PRRA, prema eng. presence of four residues) koje furinu i ostalim proteazama omogućuje cijepanje S proteina. S protein sadrži brojne imunogenične epitope koncentrirane u N-terminalnoj i receptor vezujućoj domeni (RBD, prema eng. receptor binding domain), a koje virusu omogućuju vezanje za ACE-2 receptore i stvaranje konformacije kojom izbjegavaju neutralizirajuća protutijela domaćina. M protein najbrojniji je od ova 4 proteina, veličine je od 25 do 30 kDa i sastoji se od tri transmembranske domene koje daju oblik virusnoj ovojnici. Interakcija S i M proteina važna je za retenciju S proteina u prijelaznom ER-Golgi odjeljku i njegovoj ugradnji u novo replicirane viruse. M i N proteini stabiliziraju nukleokapsidu i čine srž virusne čestice. E je najmanji strukturni protein, veličine od 8 do 12 kDa te je inkorporiran u virusnu ovojnicu čime sudjeluje u građi i vezanju virusa⁴. Postoje male razlike u strukturi S proteina SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 virusa zbog čega se oni razlikuju u afinitetu vezanja za receptor. Ako gledamo cijeli genom, podudarnost genoma SARS-CoV-2 virusa s genomom SARS-CoV-1 virusa je 79% te 50% s genomom MERS-CoV virusa dok je uočena podudarnost s ova četiri glavna strukturna proteina od čak 90%¹⁷.



Slika 1: prikaz sekvenciranog genoma SARS-CoV-2 virusa, slika preuzeta iz rada Ravi,V., Basic virology of SARS-CoV-2, Indian Journal of Medical Microbiology, Feb 2022.

Koronavirusi su poznati po rekombinacijama zbog čega su česte mutacije u glikoproteinskom dijelu S proteina ali i u ostalim strukturnim i ne-strukturnim regijama. Upravo su mutacije u ovim regijama zaslužne za promjenu virulencije kod virusa te su potencijalna meta za nove COVID-19 terapije koje su trenutno u kliničkim istraživanjima (monoklonska protutijela, lopinavir)².

SARS-CoV-2 za ulazak u stanice domaćina koristi ACE-2 receptore isto kao i SARS-CoV-1 virus. Osim ljudskog ACE-2 receptora, virus prepoznaje i ACE-2 receptore šišmiša, miševa i svinja što ukazuje na širok raspon mogućih domaćina. Virus se za receptor veže pomoću receptor vezujuće domene (RBD) S proteina koja se nalazi na S1 podjedinici (**slika 2**). RBD definirana je kao mjesto na C-terminalnom kraju S1 podjedinice koje se sastoji od 211 aminokiselina te rezultira u boljoj konformaciji i jačem vezanju virusa za receptor². Znanstvenici su dokazali da su modifikacije u ovoj regiji doprinijele afinitetu vezanja jačem nego kod SARS-CoV-1 virusa.

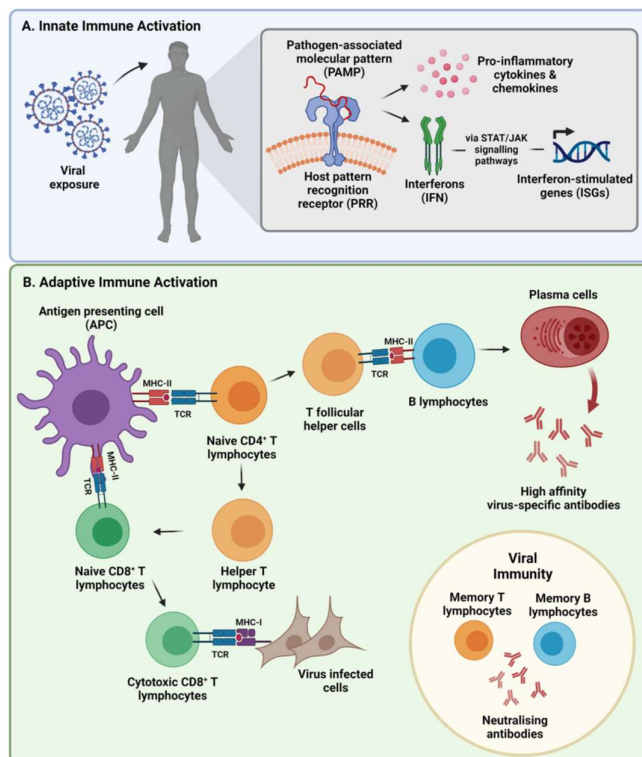


Slika 2: građa SARS-CoV-2 virusa i prikaz receptor vezujuće domene, preuzeto s: Speiser, D., Bachmann, M., COVID-19: Mechanisms of Vaccination and Immunity, Vaccines, 8. 404., 2020.

ACE-2 receptori široko su rasprostranjeni u ljudskim tkivima, a prihvaćanje SARS-CoV-2 virusa za njih ovisi o dobi, spolu i prisutnosti drugih bolesti kod pacijenata. Ulogu u razvoju COVID-19 bolesti imaju ACE-2 receptori epitelnih stanica pluća, a posebno visoku razinu ekspresije imaju pneumociti tipa II, podvrsta alveolarnih epitelnih stanica. Daljnjim istraživanjima dokazano je da osim ACE-2 receptora u prihvaćanju i ulasku virusa u stanice domaćina sudjeluju i transmembranska serin proteaza 2 (TMPRSS2), neuropilin-1 (NRP-1), CD-147, lipoprotein (HDL) i mnogi drugi integrini¹³. TMPRSS2 je zajedno s ACE-2 receptorima raspodijeljen u epitelnim stanicama nosne šupljine i pluća te u bronhiolama. Distribucija ACE-2 i ostalih receptora korelira s mjestima infekcija i simptomima COVID-19 bolesti¹⁸. Replikacija virusa unutar stanica pluća manifestira se visokom temperaturom, glavoboljom, kašljem i drugim respiratornim problemima. ACE-2 receptori crijeva, epitelnih i endotelних stanica bubrega objašnjavaju gastrointestinalne i kardiovaskularne simptome bolesti.

3.3. Put infekcije i imunosni odgovor

Najvažnija istraživanja tijekom pandemije COVID-19 bile su studije gdje se proučava povezanost imunosnog sustava i njegovog odgovora s replikacijom SARS-CoV-2 virusa unutar stanica domaćina te pronalazak odgovarajućih terapija i cjepiva. Imunosni sustav ima najvažniju ulogu u obrani organizma od patogena i o njemu ovisi kakav će biti tijek infekcije. SARS-CoV-2 virus ulazi u stanice nakon što se pomoću RBD S1 podjedinice veže za ACE-2 receptore epitelnih stanica gornjeg dišnog sustava. Nakon toga virus kreće u replikaciju svog genoma i migrira niz dišni sustav do pneumocita pluća². U potonjima kreće brza replikacija i daljnje širenje virusa te se pokreće imunosni odgovor domaćina. PRR receptori domaćina kao što su TLR-7 receptori, proteini koji kodiraju za gene retinoične kiseline (RIG-1, prema eng. retinoic acid-inducible gene I) i protein povezan s diferencijacijom melanoma (MDA-5, prema eng. melanoma differentiation-associated protein 5) prepoznaju virusom inficirane stanice preko PAMP-ova i DAMP-ova te stanice kreću s lučenjem interferona tipa 1 (IFN-I)¹⁹. Prisustvo DAMP-ova u tkivima aktivira urođeni imunosni sustav kojem pripadaju granulociti, makrofagi i antigen-prezentirajuće stanice (APC). Stanice urođene imunosti luče citokine koji kasnije aktiviraju stanice stečene imunosti. U odgovoru stečenog imunosnog sustava sudjeluju citotoksične CD8+ T stanice, pomagačke CD4+ T stanice i B stanice koje proizvode protutijela. (**slika 3**)



Slika 3 : prikaz odgovora imunosnog sustava na infekciju virusom, slika preuzeta iz: Mistry,P. et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines and Host Immunity, Frontiers in immunology, Jan,2022

Tijek COVID-19 infekcije možemo podijeliti u tri faze (I, II i III)^{3,20}. Za I. fazu karakteristična je asimptomatska pojava bolesti ili pojava blagih simptoma te inkubacijsko vrijeme koje je potrebno stečenom imunosnom sustavu da se pripremi za obranu od virusa. Prvo kreće odgovor urođenog imunosnog sustava aktivacijom TLR-3, TLR-7 i TLR-8 i proizvodnja interferona tipa 1. Stanice urođene imunosti najčešće ne uspijevaju same kontrolirati infekciju pa se 4 do 8 dana nakon infekcije pokreće stečeni imunosni sustav te započinje proizvodnja IgG i IgM protutijela protiv N i S proteina virusa. Ako je I. faza neuspješna u lokalnoj kontroli, virus kreće u daljnju replikaciju i širi se u ostale organe. U II. fazi kreće jak imunosni odgovor, nastaje jaka upala i citokinska oluja. Makrofagi i ostale imunosne stanice kreću s lučenjem puno većih količina citokina i kemokina nego u I. fazi. Kreće pojačano lučenje IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α ²⁰. U ovoj fazi COVID-19 postaje multisistemska bolest koja se mora liječiti kombinacijom anti-virusnih i anti-inflamatornih terapija. U III., najtežoj fazi dolazi do teških komplikacija i potrebe za hospitalizacijom. Citokina oluja dovodi do teških oštećenja tkiva i multisistemskog otkazivanje organa. Efikasnost i koordinacija imunosnog odgovora pojedinca, utjecati će na različit razvoj simptoma, bilo blažih ili težih te će odrediti brzinu oporavka pacijenta.

3.4. Varijante virusa

Mutacije su uobičajeni dio replikacijskog ciklusa svakog RNA virusa, a rezultiraju raznolikošću virusnih sojeva. Od početka pandemije u prosincu 2019. godine, pronađene su brojne mutacije u genomu SARS-CoV-2 virusa. Stopa mutacije procijenjena je na oko $1,1 \times 10^{-3}$ nukleotidne zamjene po mjestu godišnje¹³. Ne-strukturni protein nsp12, odnosno RNA ovisna polimeraza (RdRp) dio je virusa koji je zaslužan za rekombinacije³. Razvoj brojnih varijanta od interesa (VOIs, prema eng. Variants of Interest) i varijanta zabrinutosti (VOCs, prema eng. Variants of Concern) doprinio je globalnom širenju SARS-CoV-2 virusa te predstavlja brojne izazove za znanost i zdravstvo. Analize varijanti i sekvenciranje genoma virusa važni su kako bi se utvrdilo povećavaju li nove varijante rizik od ponovnih infekcija ali i pomoglo u donošenju epidemioloških mjera i predviđanju širenja virusa.

VOIs sadrže specifične, virusne genetičke markere koji utječu na virulenciju virusa, sposobnost na izbjegavanje antitijela domaćina i smanjenje učinkovitosti terapija i cjepiva. U tu skupinu pripadaju Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, Kappa i Lambda koronavirusi. VOCs dokazano povećavaju razinu transmisije virusa, pojačavaju simptome bolesti te također utječu na smanjenje učinkovitosti terapija i cjepiva ali i dijagnostičkih testova. Primjeri takvih koronavirusa su alfa, beta, gamma, delta i omikron varijante. Alfa varijanta (B.1.1.7) definirana je sa 17 mutacija aminokiselina od čega ih je 8 na S proteinu. Tri su mutacije od biološke važnosti; N501Y, P681H i delecija aminokiselina 69 i 70. Zbog ovih mutacija, alfa varijanta ima veći afinitet za ACE-2 receptore te je povećana razina infektivnosti koja je od 43% do 90% veća od prethodnih varijanti. Od 10.kolovoza 2021. godine alfa varijanta identificirana je u 185 država u kojima je povećala smrtnost za 32%²¹. Beta varijanta (B.1.351) prvi je puta identificirana u sjevernoj Africi u listopadu 2020.godine te je zaslužna za drugi val pandemije. Ova varijanta sadrži 9 mutacija S proteina od čega su najznačajnije tri mutacije na RBD⁴. Gama varijanta (P.1) prvi je puta identificirana u Brazilu, a sadrži 10 mutacija u S proteinu. Tri su mutacije na RBD zbog kojih virus ima veću transmisiju nego prethodna varijanta. Delta varijanta (B.1.617.2) sadrži brojne mutacije u S proteinu, supstitucije i delecije važnih položaja, a mutacijama se razvila i podvrsta „Delta plus”¹. Omikron varijanta (B.1.1.529) prvi je puta identificirana u Africi 2021. godine od kuda se proširila svijetom. Zbog visoke transmisije uzrokovane s više od 50 mutacije od kojih je 30 na S proteinu, ubrzo je postala dominantna varijanta u svijetu. Osim mutacija, na virulenciju virusa utječu i RNA modifikacije i editiranje genoma što predstavlja velik problem jer tako virus evoluirao i postaje otporniji na terapije i cjepiva²².

4. mRNA cjepiva

4.1. Općenito o cjepivima

Cijepljenje je danas jedna od najučinkovitijih preventivnih metoda zaštite zdravlja pojedinca i populacije protiv zaraznih bolesti. Cilj preventivnih cjepiva protiv zaraznih bolesti je stvaranje protektivne imunosti bez razvijanja simptoma bolesti. Kod tradicionalnih cjepiva, cijepljenjem u organizam unosimo atenuiran (koji je „živ“, tj. replicirajući) ili inaktiviran patogen nakon čega se pokreće naš imunski sustav²⁵. Postoje i rekombinantna cjepiva, koja sadrže jedan ili više proteinskih antigena izoliranih iz uzročnika bolesti ili sintetički proizvedenih antigena. Polisaharidni antigeni također se koriste u cjepivima te su osnova građe cjepiva protiv zaraznih bolesti kao što su upala pluća i meningitis²³. Cjepiva s rekombinantnim antigenima ne mogu sama potaknuti odgovor našeg imunskog sustava pa se u cjepivo dodaju i adjuvansi. Adjuvansi su agensi, pomoćne tvari koje stimuliraju pokretanje imunskog odgovora i aktivaciju stanica stečene imunosti³¹. Najčešće korišteni adjuvans je aluminij, točnije aluminijeve soli. Od 1960-ih cjepiva su uvedena u nacionalne programe javnog zdravstva većine država što je značajno smanjilo smrtnost i iskorijenilo mnoge bolesti. WHO procjenjuje da se trenutnim programima cijepljenja godišnje spasi od 2 do 3 milijuna života. U svijetu se od 1990-ih do danas smrtnost djece do 5 godina smanjila s 93 na 39 na 1000 rođene djece²³.

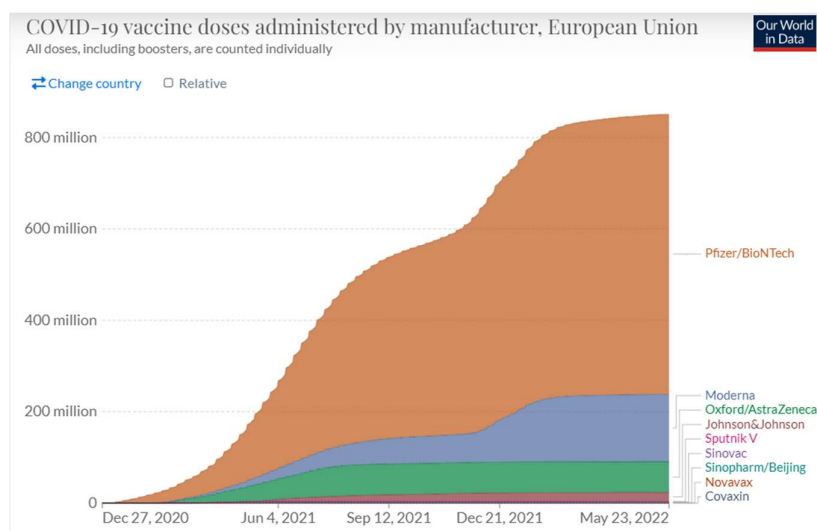
Kod razvoja cjepiva i prije njegova odobrenja za korištenje važno je uskladiti omjer učinkovitosti i sigurnosti³¹. Cjepivo bi trebalo pružati zaštitu pojedinca ali i populacije uz razvoj minimalnih nuspojava. Cjepiva odobrena od strane zdravstvenih organizacija i institucija mogu dovesti do manjih nuspojava kao što su temperatura, bol na mjestu uboda i slabost. Nakon cijepljenja aktivira se naš imunski sustav, uključujući B limfocite koji proizvode protutijela i T limfociti koji diferenciraju u citotoksične i pomagačke stanice. Aktivirane stanice stečene imunosti sudjeluju u zaštiti organizma ukoliko dođe do infekcije stanica virusom.

4.2. Općenito o mRNA tehnologiji

Uz tradicionalna, posljednjih nekoliko desetljeća razvijaju se i moderna cjepiva koja uključuju cjepiva na bazi nukleinskih kiselina (RNA i DNA) te cjepiva na bazi virusnih vektora. mRNA tehnologija prvi je puta korištena u terapijske svrhe 1989. godine nakon razvoja tehnike laboratorijske transfekcije⁷. Transfekcija je tehnika kojom se pročišćeni, virusni genetski materijal unosi u stanicu. mRNA tehnologija u posljednjih deset godina doživjela je velik razvoj te je danas često korištena metoda u razvoju cjepiva. Ova se tehnologija temelji na mRNA sintetiziranoj *in vitro* transkripcijom, a nakon čega ona prenosi u ciljani organizam. Postoje dva načina prijenosa mRNA molekula u stanice pacijenta; prvi je prijenos *ex vivo* nakon čega pacijent natrag prima stanice koje su se tehnikom transfekcije modificirale u laboratorijskim uvjetima. Ova se metoda često koristi kod genskog modificiranja, genetskog reprogramiranja i u imunoterapijama²⁵. Drugi način prijenosa je injektiranje *in vitro* transkribirane mRNA putem cjepiva.

Nakon unosa mRNA cijepljenjem, u organizmu dolazi do ekspresije proteina kodiranih unesenom mRNA te posljedično pokretanje imunosnog odgovora. Na ovoj tehnologiji temelje se mRNA cjepiva, imunoterapije za oboljele od karcinoma, terapije za liječenje alergija i mnoge druge terapije⁷. mRNA cjepiva protiv SARS-CoV-2 virusa sadrže RNA molekule dobivene *in vitro* na temelju sekvence genoma izoliranog virusa. Molekule mogu biti ne-replicirajuće (konvencionalne) i samo-replicirajuće (prema eng. self-amplifying mRNA). Nakon ulaska u stanice, mRNA molekule koriste transkripcijski kompleks domaćina za stvaranje proteina na temelju njihove sekvence. Istovremeno, virusni endosomalni i citoplazmatski senzori urođenog imunosnog sustava domaćina prepoznavanjem strane mRNA, pokreću sintezu interferona tipa I i ostalih upalnih medijatora. Nakon sinteze proteina na temelju upute unesene mRNA i predočavanja tih proteina na MHC molekulama antigen prezentirajućih stanica, aktiviraju se humoralni i stanični imunosni odgovori⁶. Tradicionalno je za razvoj cjepiva donedavno bilo potrebno provesti pretklinička i klinička istraživanja u trajanju od deset-dvadeset godina. Suprotno tome, za razvoj modernih cjepiva potreban je znatno kraći period. Pandemija COVID-19 zahtijevala je brzu intervenciju znanstvenika te je dokazala kojom brzinom napreduju znanost i tehnologija. Tijekom ove dvije godine pandemije dokazano je da je moguće razviti i proizvesti sigurno i učinkovito cjepivo unutar godine dana²⁴. Velike kompanije početkom 2020. godine krenule su s razvojem cjepiva protiv novootkrivenog virusa te je u prosincu 2020. godine krenula njihova proizvodnja. U Europi je do 2022. godine odobreno 9 cjepiva protiv bolesti COVID-19 od kojih prema broju administriranih doza predvodi cjepivo tvrtke Pfizer (**slika 4**).

Za razvoj cjepiva nove tehnologije potreban je samo dio genoma patogena što je ujedno i njihova najveća prednost u odnosu na druga cjepiva. Samo 5 dana nakon što je objavljen sekvencirani genom SARS-CoV-2 virusa prva cjepiva krenula su u pretkliničku evaluaciju. Šezdeset i šest dana nakon sekvenciranja, 16. ožujka 2020. godine prvo cjepivo krenulo je u fazu I kliničkog istraživanja²⁵. Osim brzine proizvodnje još jedna od prednosti mRNA cjepiva je da su prilagodljiva i lako se modificiraju s dolaskom novih varijanti virusa. Upravo je zbog lakoće i učinkovitosti ove tehnologije, mRNA cjepivo tvrtke Pfizer/BioNTech (BNT162b2) prvo odobreno cjepivo u prevenciji COVID-19 bolesti. Nakon njega u EU odobreno je još jedno mRNA cjepivo, tvrtke Moderna (mRNA1273).



Slika 4 : graf koji prikazuje broj administriranih doza različitih vrsta cjepiva do svibnja 2022., slika preuzeta sa stranice WHO

4.3. Dizajn mRNA cjepiva

mRNA cjepiva objedinjuju željena imunološka svojstva cjepiva, sigurnost i fleksibilnost. mRNA molekule sintetiziraju se na temelju DNA kalupa, najčešće iz plazmida (pDNA) korištenjem RNA polimeraze bakteriofaga. DNA kalup sadrži barem jedan ORF i jedinstveno restrikcijsko mjesto za linearizaciju plazmida. Uz prisustvo RNA polimeraze (iz faga T7, T3 ili Sp6) i nukleotid trifosfata dolazi do transkripcije i sinteze mRNA²⁶. mRNA dobivena *in vitro* koristi se u terapijske i preventivne svrhe te je dizajnom identična mRNA molekuli eukariota. Molekule su jednolančane i modificirane tako da na 5' kraju imaju kapu (eng. cap), a na 3' kraju poliadenilni rep (prema eng. poly(A)). Modifikacije dodatno stabiliziraju molekulu i sprječavaju njezino razgrađivanje unutar citoplazme⁷. Molekule sadrže i specifičan ORF omeđen start i stop kodonom koji kodira za protein od interesa. Uz ORF nalaze se i netranslatirajuće regije (UTR, prema eng. untranslated regions)²⁷.

→**5' Kapa.** Nakon translacije mRNA molekule potrebno je dodati kapu na 5' kraj zbog učinkovitosti kasnije translacije. U *in vitro* reakciju transkripcije dodaje se sintetički analog kape, no nedostatak ovakve reakcije je što se analog kape i GTP nukleotid natječu za isto vezno mjesto na 5' kraju pa trećina mRNA molekula završi nemetilirano, bez kape zbog čega molekule postaju translacijski neaktivne²⁷. Drugi način dodavanja kape je uz pomoć virusnog kompleksa (prema eng. Vaccinia virus capping complex). Ovaj kompleks dodaje kapu na 5'-trifosfat mRNA molekule. Nedostatak ovog pristupa je dodatan enzimatski korak čime se otežava sama proizvodnja. Jedan od najnovijih načina dodavanja kape je pomoću anti-reverznh analoga kape (ARCA, prema eng. anti-reverse cap analogs)²⁸. Prema istraživanjima ovo je najučinkovitiji način dodavanja kape jer je učinkovitost translatiranja mRNA molekule dvostruko veća nego kod drugih pristupa te je poluživot sintetiziranih molekula produžen.

→**Poliadenilni rep.** Nakon što se dodala kapa na 5' kraj, na 3' kraj mRNA molekule dodaje se poliadenilni rep koji također stabilizira molekulu i regulira kasniju translaciju. Istraživanjima učinkovitosti ovih modifikacija dokazano je da duljina repa korelira s učinkovitošću i kasnijom ekspresijom proteina. U jednom je istraživanju dokazano da se broj novo sintetiziranih proteina udvostručio kada se rep produžio s 64 na 150 ostataka. Rep se može dodati izravno, kodiranjem poliadenilnog repa DNA kalupa ili na drugi način, uz pomoć enzima poliadenilat-polimeraze²⁷.

→**UTR-ovi** su netranslatirane regije na 5' i 3' kraju mRNA molekula. Oni kao i ostale modifikacije stabiliziraju molekule i sadrže elemente koji sudjeluju u translaciji²⁴. Za postizanje najstabilnije strukture najčešće se koristi kombinacija β-globin 5'-UTR-a i α-globin 3'-UTR-a. Globinski UTR-ovi su široko korišteni, ponajviše u *in vitro* transkripciji mRNA molekula za imunoterapije. Osim ovih mogu se koristiti i ne-globinski geni iz različitih regija virusnih UTR-ova koji povećavaju učinkovitost translacije, a najčešće se koriste u preventivnim cjepivima. U jednom je istraživanju dokazano da 5'-UTR regija proteina toplinskog šoka u ljudi (eng. heat shock protein) pojačava translaciju mRNA u stanicama sisavaca⁷. Ove regije na jednostavan način reguliraju aktivnosti mRNA molekula i sudjeluju u sintezi proteina. Ukoliko želimo ograničiti trajanje translacije i sinteze na krajeve ćemo dodati UTR-ove bogate adeninom i uracilom. Ovim modifikacijama lako manipuliramo proizvodnjom i distribucijom mRNA cjepiva.

→**Kombinacije dizajna.** Kako bi dobili najučinkovitije cjepivo znanstvenici su kreirali različite kombinacije modifikacija. Primjer je kapa dodana s ARCA na 5' kraj i poliadenilni rep sa 100 ostataka na 3' kraj. Testiranjem na različitim staničnim linijama dokazali su da ovakva mRNA molekula ima veću i dugotrajniju ekspresiju proteina od mRNA molekule s kraćim repom i običnim analogom 5'kape⁷. mRNA tehnologija i kombinacije različitih dizajna imaju velik potencijal i budućnost su moderne medicine.

4.4. Farmakologija i unos mRNA cjepiva u stanice

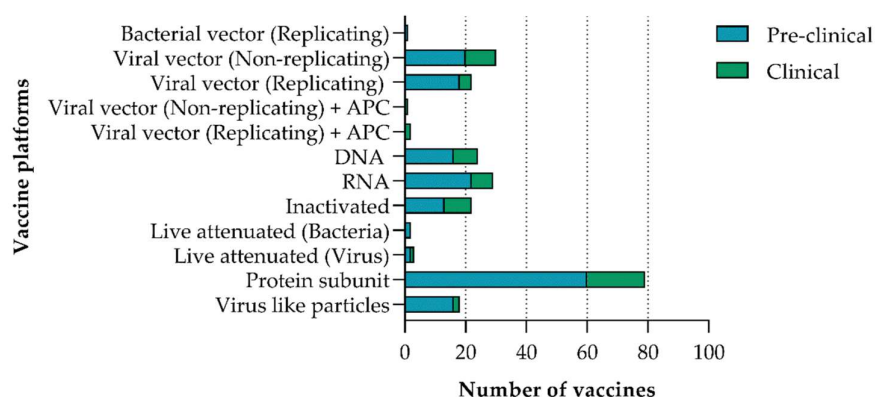
mRNA molekule transkribirane *in vitro* unose se u stanice domaćina gdje dolazi do interakcije s translacijskim kompleksom domaćina i sinteze proteina od interesa. Protein od interesa je farmakološki aktivan produkt koji se koristi za prevenciju zaraznih bolesti ili za promjenu stanja kroničnih bolesti.

mRNA molekula koja se prirodno sintetizira u stanicama ulazi u citoplazmu iz jezgre dok *in vitro* transkribirana mRNA ulazi u citoplazmu iz ekstracelularnog prostora. Citoplazma stanica domaćina važan je čimbenik za farmakodinamičku aktivnost mRNA molekula zbog čega se dizajn molekula sukladno njoj morao modificirati. mRNA molekule sintetizirane su s agensima koji ju štite od razgradnje RNazama unutar vanstaničnog prostora. Tijekom dizajna molekula treba paziti i na način ulaska u stanice kroz lipidnu staničnu barijeru²⁶. Potrebno je modificirati molekule kako bi im se omogućio olakšan prolazak kroz staničnu membranu i ulazak u citoplazmu. Doprema u stanice ovisi o veličini molekula i njihovim svojstvima pa je tako velikim negativno nabijenim molekulama mRNA otežan prolazak kroz membranu. Prilikom dizajna molekula treba omogućiti učinkovitu i brzu dopremu u stanice. Jedan od načina unosa mRNA je *ex vivo* u dendritičke stanice i zatim direktno injektiranje modificiranih stanica u pacijenta čime se osigurava direktan unos u stanice mete³⁴. Ovaj je pristup zahtjevan i ne primjenjuje se tako često za razliku od drugog pristupa gdje se transkribirana mRNA direktno, cijepljenjem injektira zajedno s proteinskim nosačima koji omogućuju unos u velik broj stanica. Zbog naboja i veličine mRNA molekule, aktivan transport bio bi neučinkovit pa je doprema do stanica najčešće na bazi kationskih lipida i polimera, doprema pomoću komercijalnih transfekcijskih reagensa, protamina, polisaharidnih čestica i nanočestica²⁷. Nakon što uđe u citoplazmu, egzogena mRNA ponaša se, djeluje i ulazi u biokemijske procese isto kao i prirodno sintetizirana mRNA²⁷. Dizajn molekula i modifikacije dobivene *in vitro* utječu na farmakokinetiku cjepiva. U citoplazmi, mRNA molekule koriste translacijski kompleks domaćina za sintezu proteina. Novo sintetizirani proteini prolaze kroz post-translacijske modifikacije, pravilno se smataju te označavaju signalnim peptidima. Signalni peptidi određuju daljnji put proteina unutar stanica. Proteini sintetizirani na temelju upute *in vitro* transkribirane mRNA cjepiva cijepaju se u proteasomima te prezentiraju pomoću antigen prezentirajućih stanica preko molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti tipa I. Prezentiranjem antigena preko MHC I aktiviraju se citotoksični CD8+ T-limfociti dok se prezentiranjem preko MHC II molekula aktiviraju pomagački CD4+ T-limfociti te oni zajedno sudjeluju u obrani organizma od patogena²². mRNA molekula u *in vitro* reakciji modificira se tako da u domaćinu postigne

imunostimulacijski učinak. mRNA cjepiva protiv SARS-CoV-2 virusa kao nosač ali i adjuvans koriste lipidnu nanočesticu (LNP, prema eng. lipid-based nanoparticle). LNP se stabiliziraju pomoću polietilen glikola te im se na taj način produžuje poluživot. U dizajn molekula najčešće se uvode modificirani nukleozidi te poliuridilat koji inducira urođeni imunosni sustav i potiče lučenje citokina. U cjepivo se umeću i različiti proteinski nosači, lipidi, kolesteroli, kalijev i natrijev klorid i saharoza koji služe kao dodatni adjuvansi te za zaštitu od razgradnje mRNA molekula³². Na ove se načine modulira imunogenost i postiže veća učinkovitost cjepiva³⁴.

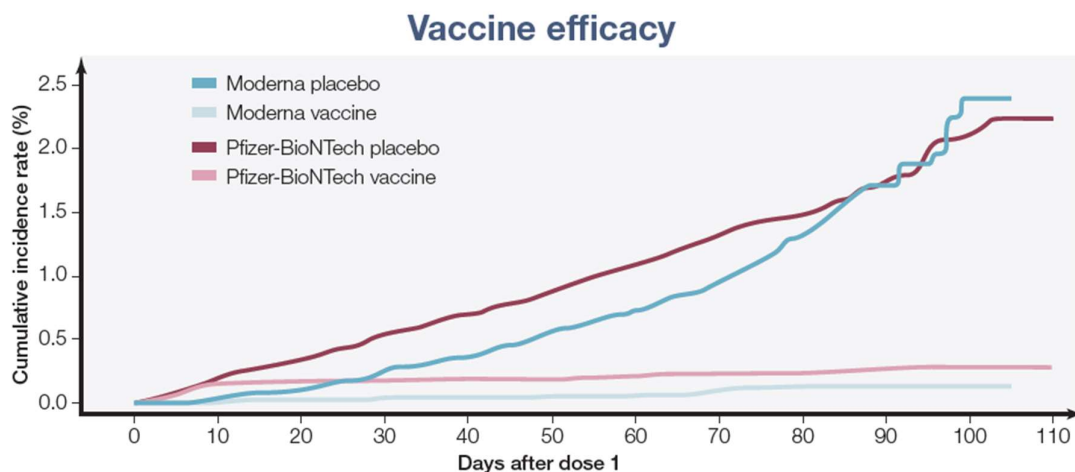
4.5. Prekretnica pandemije: razvoj mRNA cjepiva protiv bolesti COVID-19

Širenjem SARS-CoV-2 virusa i razvojem pandemije, došlo je do velikih problema u zdravstvu ali i svjetskoj ekonomiji. Već spomenute epidemiološke mjere samo su u manjoj mjeri spriječile širenje bolesti. Znanstvenici su predvidjeli da će jedino razvoj novih cjepiva protiv bolesti COVID-19 promijeniti tijek globalne dinamike širenja virusa. Cjepiva nude zaštitu/prevenciju bolesti i ublažavanje simptoma ukoliko do infekcije i dođe te su najbolja strategija u borbi protiv SARS-CoV-2 virusa. Nakon što je 10. siječnja 2020. godine objavljen prvi sekvencirani genom SARS-CoV-2 virusa, velike farmaceutske tvrtke pokreću istraživanja u svrhu pronalaska cjepiva. Do svibnja 2020. godine više od 100 cjepiva ušlo je pretkliničku i kliničku fazu razvoju od čega je 70 cjepiva bilo na temelju proteinske podjedinice (protein subunit platform), 30 adenovirusnih i 29 RNA cjepiva²⁹ (**slika 5**). Do siječnja 2021. godine bilo je 233 kandidata za razvoj novih cjepiva, 170 u pretkliničkoj i 63 u kliničkoj fazi testiranja.



Slika 5: broj COVID-19 cjepiva kandidata u 2020. godini, slika preuzeta iz: Mellet, J., Pepper, M.S., A COVID-19 Vaccine: Big Strides Come with Big Challenges, vaccines MDPI, Jan, 2021.

Kako bi se cjepivo odobrilo za korištenje, ono mora proći kroz nekoliko faza u kojima se testira sigurnost, doza i učinkovitost. Cjepiva se prvo evaluiraju u pretkliničkoj fazi u *in vitro* testovima na ljudskim stanicama i staničnim linijama sisavaca a zatim *in vivo* na životinjskim modelima. Ukoliko cjepiva pokažu pozitivne rezultate u ovim testovima, mogu ući u kliničku fazu testiranja. Klinička faza testiranja dijeli se u 3 faze²⁹. U prvoj fazi sudjeluje mala skupina od 20 do 80 zdravih dobrovoljaca te se ispituje sigurnost i doza cjepiva. Druga faza uključuje testiranje sigurnosti i imunogeničnosti cjepiva na većoj skupini ljudi (od 100 do 300). U trećoj fazi sudjeluje najveći broj ljudi (između 1000 i 3000) i provode se posljednji testovi učinkovitosti prije nego cjepivo krene na tržište²⁹. Proces od početka laboratorijskih istraživanja do odobrenja cjepiva traje i do desetak godina, no pandemija COVID-19 zahtijevala je puno brži odgovor znanstvenika. Tijekom prvih nekoliko mjeseci od objavljivanja genoma SARS-CoV-2 virusa klinička istraživanja mRNA cjepiva pokazala su se najučinkovitija. U ožujku i svibnju 2020. godine cjepiva tvrtki Moderna i Pfizer kreću u prvu fazu kliničkog ispitivanja. Kroz četiri mjeseca proveli su ispitivanja sigurnosti i učinkovitosti te su u listopadu 2021. godine završili s trećom fazom kliničkog ispitivanja³⁰. Prvo cjepivo protiv bolesti COVID-19 odobreno je 10. prosinca 2020. godine. To je bilo mRNA cjepivo tvrtke BioNTech/Pfizer. Nekoliko dana nakon odobrenja je i cjepivo tvrtke Moderna. Prema kliničkim istraživanjima provedenim na preko 70 tisuća zdravih dobrovoljaca intramuskularno primljene dvije doze cjepiva imaju učinkovitost od oko 95% ³⁰ (**slika 6**).



Slika 6 : prikaz grafa dobivenog tijekom istraživanja efikasnosti Pfizer i Moderna cjepiva u 2020. godini. Na grafu možemo uočiti kako tijekom istraživanja učinka nakon administracije prve doze cjepiva kod placebo skupine raste stopa incidencije bolesti dok je kod skupine dobrovoljaca koji su primili cjepivo ta stopa puno manja. Također možemo uočiti kako postoji malo veća efikasnost Pfizer nego Moderna cjepiva, slika preuzeta iz: Topol, E.J., Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2, Elsevier 184, Mar 2021.

Molekularna meta, odnosno imunogen ovih cjepiva je S protein ovojnice SARS-CoV-2 virusa. Kako bi se pojačao odgovor imunosnog sustava i kako bi proizvodnja protutijela bila učinkovitija, u laboratoriju se S protein virusa modificira. Proizvođači cjepiva provode supstituciju prolina na dva mjesta (K986 i K987) S2 podjedinice kako bi nastala stabilnija konformacija S proteina najslićnija onoj SARS-CoV-2 virusa. Ovako modificiran imunogen naziva se SARS-CoV-2 S-2P antigen³⁵.

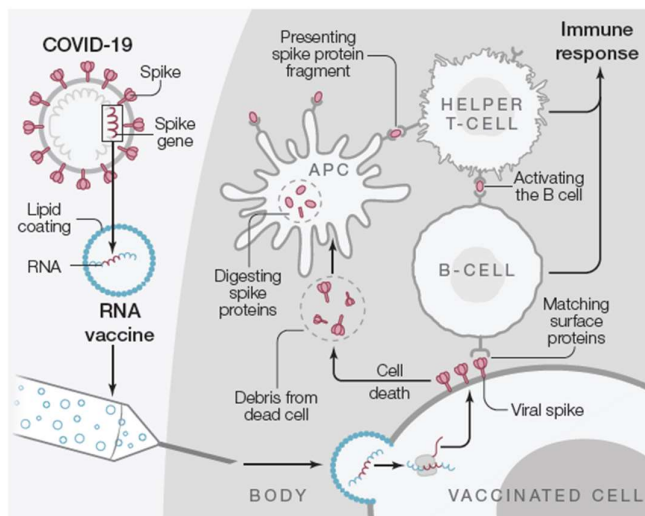
4.6. BioNTech/Pfizer i Moderna cjepiva

mRNA cjepivo tvrtke BioNTech/Pfizer odobreno je za distribuciju i korištenje 10. prosinca 2020. godine. Prije odobrenja od strane EMA (prema eng. European Medicines Agency) i FDA (prema eng. Food and Drug Administration) cjepivo je prošlo pretkliničke i kliničke testove učinkovitosti i sigurnosti. U početku, u istraživanje je bilo uključeno četiri Pfizer cjepiva kandidata, a odobreno je BNT162b2 cjepivo koje se pokazalo najučinkovitije. Oko 40 tisuća zdravih dobrovoljaca, od 16 godina na više sudjelovalo je u istraživanju. Istraživanje je bilo internacionalno te je uključivalo različite skupine ljudi koji su primili ili placebo ili dvije doze cjepiva u razmaku od 21 dan. Kroz ovo istraživanje utvrđena je učinkovitost cjepiva od oko 95% (interval je bio od 90,3 do 97,6%)⁶.

Cjepivo se administrira intramuskularno, najčešće u deltoidni mišić gornjeg dijela ruke. Nuspojave nakon cijepljenja kod većine su bile neprimjetne do blage. Sistemski štetni učinci cjepiva bili su češći nakon druge doze, uglavnom su to bile povišena tjelesna temperatura, bol na mjestu uboda, glavobolja i umor³¹. Mana ovog cjepiva je što se mora skladištiti na -70 ° stupnjeva što značajno otežava distribuciju. Nakon što se odmrzne, cjepivo se može još 5 dana čuvati u hladnjaku nakon čega je neupotrebljivo. Bez obzira na otežano skladištenje, cjepivo je pakirano i distribuirano u većinu država svijeta. Do kraja 2021. godine Pfizer je proizveo 3 milijarde doza cjepiva, a plan do kraja 2022. godine je proizvesti još 4 milijarde i distribuirati ih u slabije razvijene države. Drugo odobreno cjepivo protiv bolesti COVID-19 bilo je mRNA-1273 cjepivo Američke tvrtke Moderna. Ovo je cjepivo prvo krenulo u fazu I kliničkog testiranja, samo 66 dana nakon objavljivanja sekvenciranog genoma SARS-CoV-2 virusa. Nakon pozitivnih rezultata u kliničkim istraživanjima cjepivo je odobreno te je krenulo u

proizvodnju i distribuciju 18. prosinca 2020. godine³⁰. U randomiziranoj i placebo kontroliranoj fazi III kliničkih istraživanja sudjelovalo je oko 30 tisuća zdravih dobrovoljaca raspoređenih u 99 instituta diljem SAD-a. Istraživanjem je utvrđena djelotvornost cjepiva od 94% (interval od 89,3 do 96,8%)⁶.

Analizom je također dokazano smanjenje broja asimptomatskih infekcija između administriranja prve i druge doze. Cjepivo se administrira intramuskularno, u dvije doze od 100µg, u razmaku od 28 dana. Kod oba cjepiva mRNA molekula kodira za SARS-CoV-2 S-2P protein. mRNA molekula dobivena je u *in vitro* reakciji korištenjem DNA kalupa, uz optimiziranu T7 RNA-polimerazu. Nakon sinteze, molekula je dodatno modificirana dodavanjem 5' kape pomoću virusnog kompleksa i 3' poliadenilnog repa²⁴. mRNA molekula nalazi se unutar lipidne nanočestice koja se sastoji od četiri lipida, a služi za zaštitu i dopremu molekula do stanica. Nakon administracije mRNA se translatira pomoću translacijskog kompleksa domaćina te se sintetiziraju proteini koji se eksprimiraju na površini stanica. Antigen prezentirajuće stanice preko MHC I kompleksa sintetizirane antigene prezentiraju limfocitima. Dolazi do aktivacije stečenog imunskog sustava, aktivacije B-limfocita koji diferenciraju u plazma stanice i proizvode protutijela protiv S proteina SARS-CoV-2 virusa. Dolazi i do diferencijacije T-limfocita i stvaranja memorijskih stanica, velikog broja citotoksičnih CD8+ i pomagačkih CD4+ T-limfocita (**slika 7**). Ako se osoba zarazi i SARS-CoV-2 virus uđe u stanice novonastala protutijela neutralizirati će virus i spriječiti daljnje širenje infekcije.



Slika 7 : prikaz imunskog odgovora na mRNA cjepiva, slika preuzeta iz: Topol, E.J., Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2, Elsevier 184, Mar 2021.

5. Važnost cjepiva i popularizacija znanosti

5.1. Post Covid sindrom i utjecaj virusa na društvo

Pandemija COVID-19 donijela je brojne promjene u naše živote, od strogih epidemioloških mjera, ograničenja kretanja i prekida većine događanja te prelaska na „online” život. U populaciji, kod nekih osoba koje su preboljele bolest, otprilike 12 tjedana nakon infekcije javili su se i simptomi takozvanog „Post Covid sindroma”. Kako je ubrzano rastao broj zaraženih tako se i interes za istraživanjem dugoročnih učinaka ove bolesti povećavao. Prema podacima WHO kod 10% do 35% pacijenata koji su preboljeli COVID-19 uočeni su kronični problemi u respiratornom i kardiovaskularnom sustavu, kronični umor te neurološki problemi³⁶. Od respiratornih simptoma najčešći su kašalj i gubitak daha, dok od kardiovaskularnih simptoma prevladavaju bol u prsima, aritmije i palpitacije. Od neuroloških problema najčešći su nesanica, glavobolje i vrtoglavice te umna tromost (eng. brain fog) koja se očituje u problemima s pamćenjem, koncentracijom, rastrojenosti i anksioznosti³⁷.

U faktore rizika za razvoj Post Covid sindroma pripadaju jačina infekcije, godine, spol, stanje respiratornog sustava i prisustvo različitih komorbiditeta. Svi ovi navedeni simptomi mogu trajati i više od pola godine te negativno utječu na svakodnevni život pojedinaca. Potrebno je provesti još brojna istraživanja kako bi se razjasnio točan mehanizam nastanka i način liječenja kako Post Covid sindrom ne bi ugrožavao i smanjivao kvalitetu života.

Organizacija „European Respiratory Society” pokrenula je internacionalno istraživanje koje će objediniti podatke i znanja o dugoročnim utjecajima COVID-19 na zdravlje pojedinaca³⁸. Osim na fizičko, prema istraživanjima, pandemija je ostavila utjecaja i na mentalno zdravlje populacije. Kod ljudi se javio strah od zaraze, tjeskoba zbog socijalne distance i neizvjesnost za ekonomsku situaciju i budućnost³⁹. Socijalna isključenost jedan je od najvećih uzroka koji dovodi do razvoja psiholoških poremećaja. Najučestaliji poremećaji su anksioznosti, depresije, razvoj posttraumatskog stresnog sindroma te zlouporaba psihoaktivnih tvari. Štetni učinci pandemije na mentalno zdravlje uočeni su i kod djece i adolescenata. Kod njih se također javljaju strah, anksioznost i kronični stres zbog čega se posljedično uočavaju problemi s koncentracijom, školom i učenjem⁴⁰. Sve ove poteškoće dio su pandemije i njezinog negativnog utjecaja na društvo i svijet oko nas.

5.2. Mitovi o cijepljenju

Kako bi se usporilo širenje virusa i smanjila smrtnost u svijetu, znanstvenici su razvili cjepiva protiv SARS-CoV-2 virusa. Sva cjepiva koja su u upotrebi prošla su klinička istraživanja učinkovitosti i sigurnosti te su odobrena od strane zdravstvenih organizacija i institucija. S razvojem cjepiva i pokretanjem njegove proizvodnje i distribucije kreće i pokret protiv cijepljenja- „anti-vakcerski” pokret . Odbijanje cjepiva najčešće je rezultat neznanja i prihvatanja lažnih informacija koje se šire u medijima⁴¹. Prihvatanje cjepiva protiv bolesti COVID-19 ali i poštivanja nacionalnih programa cijepljenja velikom većinom ovise o obrazovanju. Što je društvo obrazovanije to pojedinci imaju veću sigurnost u zdravstvene radnike, vjeruju u odluke svojih zdravstvenih institucija te vjeruju u sigurnost i učinkovitost samih cjepiva. Tijekom ove pandemije, mediji su se pokazali kao vodeći pokretači anti-vakcerskog pokreta. Razne netočne činjenice o SARS-CoV-2 virusu kao i kontroverze i mitovi oko cijepljenja mjesecima su bili u naslovima raznih članaka popularnih novina i portala. Ljudi koji se protive ovom cjepivu govore da je ono štetno za zdravlje, da uzrokuje zastoje srca i začepljuje krvne žile, da uzrokuje sterilitet i da će ono promijeniti naš genetski materijal, mada ne postoje nikakvi znanstveni dokazi u prilog tim tvrdnjama⁴². Znanstvenici upozoravaju da bi širenje dezinformacija i odbijanje cijepljenja mogli biti pogubni kao i sam virus. U razvoj cjepiva uloženo je puno truda i novaca, a na nama je da iskoristimo njegov velik potencijal kako bi mogao biti proglašen kraj pandemije. Cjepivo, osim što naš štiti od infekcije i sprječava razvoj teških simptoma bolesti, smanjuje i rizik od razvoja Post- COVID-19 sindroma za gotovo 50%³⁷. Obrazovanje populacije i pokretanje masovnih kampanja za cijepljenje trebao bi biti primarni cilj većine država. Potrebno je uložiti velik trud i imati interdisciplinarni pristup obrazovanju kako bi populacija naučila vjerovati u sigurnosti i efikasnost cjepiva te kako bi se postotak cijepljenih povećao⁴¹.

6. Literatura

1. <https://covid19.who.int/>
2. Hu,B., Guo,H., Zhou,P., Shi,Z., Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19, *Nature reviews*, Oct 2020.
3. Ortega,M., An integrative look at SARS-CoV-2, *International journal of molecular medicine*, December 2020.
4. Ravi,V., Saxena,S., Panda,P.S., Basic virology of SARS-CoV-2, *Indian J Med*, March 2022.
5. Gao,Z. et al. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19, *Journal of Microbiology*, May 2020.
6. Angeli,F., Spanevello,A. et al. SARS-CoV-2 vaccines: Lights and shadows, *Elsevier*, April 2021.
7. Schlake,T., Thess,A. et al. Developing mRNA-vaccine technologies, *Landes Bioscience*, Nov 2012.
8. Li, J., Lai,S., Gao,G., Shi,W., The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2, *Nature*, Dec 2021.
9. Lam, T.T. et al. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins, *Nature*, 2020.
10. Wu,J.T., Leung,K., Leung,G.M., Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, *Lancet*, 2020.
11. [Italy: WHO Coronavirus Disease \(COVID-19\) Dashboard With Vaccination Data | WHO Coronavirus \(COVID-19\) Dashboard With Vaccination Data](#)
12. Holshue,M.L. et al. First case of 2019 novel coronavirus in the US, *New Eng.J.Med*, 2020.
Kai-Wang, K. et al. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic, *Emerging Microbes&Infections*, Dec 2021.
13. Webster,P., COVID-19 timeline of events, *Nature Medicine*, Dec 2021.
14. [Timeline of WHO's response to COVID-19](#)
15. [Coronavirus \(COVID-19\) Vaccinations - Our World in Data](#)
16. Lu, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574 (2020).
17. Cevik M, Bamford CGG, Ho A. COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians., *Clin Microbiol Infect* 2020;26:842–7.
18. Nikolich-Zugich J, Knox KS, Rios CT, Natt B, Bhattacharya D and Fain MJ: SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: What we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *Geroscience* 42: 505-514, 2020.
19. Prompetchara E, Ketloy C and Palaga T: Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol* 38, 2020.
20. Davies, N. G. et al. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature* 593, 270–274 (2021)
21. Mistry,P. et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines and Host Immunity, *Frontiers in immunology*, Jan,2022.

22. Pollard, A.J., Bijker, E.M., A guide to vaccinology: from basic principles to new developments, *Nature*, Feb 2021.
23. K. S. Corbett, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* **586**, Oct, 2020.
24. D. van Riel, E. de Wit, Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature materials*, **19**, 2020.
25. Rauch, S. et al., New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations, *frontiers in immunology* 1963, Sep 2018.
26. U. Sahin, K. Karikó, Ö. Türeci, *mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. Nature reviews Drug discovery*, **13**, 2014.
27. J. Jemielity, et al. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties. *RNA* **9**, 2003.
28. Mellet, J., Pepper, M.S., A COVID-19 Vaccine: Big Strides Come with Big Challenges, *vaccines MDPI*, Jan, 2021.
29. Topol, E.J., Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2, *Elsevier* 184, Mar 2021.
30. M. Blekić, B. Kljaić Bukvić, *Cjepiva za koronavirusnu bolest (COVID-19). Liječnički vjesnik*, **143(5-6)** 2021.
31. Khan, W.H., et al., COVID-19 Pandemic and Vaccines Update on Challenges and Resolutions, *frontiers in immunology*, vol 11, sep 2021.
32. Teo, S., P., Review of COVID-19 mRNA Vaccines, *Journal of Pharmacy Practice-SAGE*, Apr 2021.
33. N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, *mRNA vaccines — a new era in vaccinology. Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 2018.
34. Park, J.W., et al. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how, *International Journal of Biological Science*, Vol 17., Apr 2021.
35. Ružič, A., et al. Post-covid era: The new and unknown field, *Hrčak*, 2021.
36. Maltezou, H.C., et al. Post-COVID Syndrome: An Insight on Its Pathogenesis, *Vaccines* 497, May 2021.
37. [END-COVID - European respiratory Network for Data-sharing in COVID19 - ERS - European Respiratory Society \(ersnet.org\)](https://www.ersnet.org/)
38. Antičević, V., Učinci pandemije na mentalno zdravlje, stručni rad, 2020.
39. Lee, P. I., Hu, Y. L., Chen, P. Y., Huang, Y. C. i Hsueh, P. R. (2020). Are children less susceptible to COVID-19?, *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 53, 2020.
40. Ullah, I., et al. Myths and conspiracy theories on vaccines and COVID-19: Potential effect on global vaccine refusals, *Elsevier* 22(2), 2021.
41. [COVID-19 myths, conspiracies: Another unfortunate aspect of pandemic | Opinion \(dailysabah.com\)](https://dailysabah.com/Opinion/)



Andrea Montan

Državljanstvo: hrvatsko ☎ (+385) 955205873 Datum rođenja: 16/11/2000

Spol: Žensko ✉ E-adresa: andrea.montan16@gmail.com

📍 Adresa: Banjol 360, 51280 Rab (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Gimnazija

Srednja škola Markantuna de Dominisa [2015 – 2019]

Adresa: Rab,

Biotehnologija i Istraživanje lijekova

Odjel za biotehnologiju [2019 – Trenutačno]

Adresa: Rijeka,

RADNO ISKUSTVO

Stručna praksa

Medicinsko-blokemijski laboratorij Doma zdravlja PGŽ [2021]

Mjesto: Rab

DIGITALNE VJEŠTINE

Moje digitalne vještine

Microsoft Office, Microsoft Word, Microsoft Excel, Outlook, Facebook, Google / Social Media/Social Network / Molecular design software (PyMol, Avogadro, Marvin)

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **Hrvatski**

Drugi jezici:

Engleski

SLUŠANJE B2

Njemački

SLUŠANJE A2 GOVORNA INTERAKCIJA A1

VOLONTIRANJE

Projekt Studenti mentor

[Odjel za biotehnologiju, 2021 – Trenutačno]