

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Vid Mirošević

RAZVOJ CJEPIVA ZA SARS-COV-2

Diplomski rad



Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Vid Mirošević

RAZVOJ CJEPIVA ZA SARS-COV-2

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Klinici za internu, Zavod za kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Roberta Likića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

ACE	Angiotenzin-konvertirajući enzim
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
MERS-CoV	Bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirus
mRNA	Glasnička ribonukleinska kiselina
ORF	Otvoreni okvir za čitanje
RNA	Ribonukleinska kiselina
SARS-CoV	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD	1
1.1 SARS-CoV-2 i COVID-19 pandemija	1
2. SARS-CoV-2 virologija	3
3. Patogeneza SARS-CoV-2 infekcije	4
4. Imunologija SARS-CoV-2 infekcije	5
4.1 Urođeni imunosni odgovor	5
4.2 Humoralna imunost	6
4.3 Stanična imunost	8
5. Klinički i epidemiološki aspekti SARS-CoV-2 infekcije	9
5.1 Klinička slika pacijenata koji boluju od COVIDa-19	10
5.2 Dijagnostika COVIDa-19	10
5.3 Terapijske opcije u liječenju COVIDa-19	11
5.4 Epidemiološke osobitosti SARS-CoV infekcije	13
6. Općenito o cjepivu za SARS-CoV-2 i design cjepiva	14
7. Izbor antigena u razvoju cjepiva	15
7.1 S protein kao izbor antigena kod cjepiva za SARS-CoV-2	16
8. Različite platforme za razvoj cjepiva za SARS-CoV-2	17
8.1 Proteinska cjepiva za SARS-CoV-2	17
8.2 Nanočestice i „Virus like particles“ cjepiva za SARS-CoV-2	18

8.3 Peptidna cjepiva za SARS-CoV-2	19
8.4 Inaktivirana cjepiva za SARS-CoV-2	20
8.5 Živo atenuirano cjepivo za SARS-CoV-2	21
8.6 Vektorska cjepiva za SARS-CoV-2	22
8.6.1 Nereplicirajuća vektorska cjepiva za SARS-CoV-2	22
8.6.2 Replicirajuća vektorska cjepiva za SARS-CoV-2	23
8.7 Cjepiva za SARS-CoV-2 bazirana na nukleinskim kiselinama	24
8.7.1 DNA cjepiva za SARS-CoV-2	24
8.7.2 RNA cjepiva protiv SARS-CoV-2	25
9. Prednosti i nedostaci različitih platformi za razvoj cjepiva	
protiv SARS-CoV-2	27
10. Ostali faktori u razvoju cjepiva	28
11. Oblici cijepljenja u svrhu poticanja nespecifičnog imunskog odgovora	29
12. Diskusija – je li cjepivo uistinu dovoljan čimbenik	
da prebrodimo pandemiju?	30
13. Zaključak	31
ZAHVALE	33
LITERATURA	34
ŽIVOTOPIS	50

SAŽETAK

NASLOV RADA: Razvoj cjepiva za SARS-CoV-2

AUTOR: Vid Mirošević

Pojavom pandemije COVID-19, uzrokovane virusom SARS-CoV-2 svijet je ušao u jedno novo, izazovno razdoblje gdje su ljudi morali mijenjati svoje životne navike kako bi zaštitili sebe i druge. S obzirom na oskudne metode liječenja, a tešku kliničku sliku razvoj cjepiva protiv SARS-CoV-2 se istaknuo kao najvažniji faktor u suzbijanju pandemije. U različite faze kliničkog istraživanja je ušao veliki broj cjepiva baziranih na različitim platformama uključujući neke pristupe koji prethodno nisu bili licencirani za klinička istraživanja na ljudima. Brzo otkrivanje molekularnih karakteristika SARS-CoV-2, iscrpna analiza patogeneze bolesti i njezine kliničke slike te oskudne terapijske mogućnosti omogućili su izrazito brz napredak u razvoju cjepiva uz pomoć velikih financijskih sredstava. Pregled karakteristika različitih platformi za razvoj cjepiva te razumijevanje načina na koji se stvara imunosni odgovor su ključni kako bi naša struka mogla biti vodeći pokretač masovnog cijepljenja protiv ovog opasnog patogena, uz pomoć svih ostalih organizacija. Problemi s kojima se suočavamo tijekom ove pandemije i platforme koje se razvijaju za njezino rješavanje također će biti od neprocjenjive vrijednosti za bržu reakciju na različite potencijalne pandemije u budućnosti. Također je od izrazite važnosti u ovome preglednom radu pokazati zašto su neke platforme pogodnije od drugih odnosno koje su prednosti, a koji nedostaci pojedinih platformi u razvoju cjepiva za SARS-CoV-2.

Ključne riječi: SARS-CoV-2, cjepivo, razvoj, platforme za razvoj cjepiva

SUMMARY

TITLE: The Development of SARS-CoV-2 Vaccine

AUTHOR: Vid Mirošević

With the advent of the COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, the world entered a new, challenging era where people had to change their life habits to protect themselves and others. Given the lacking treatment methods and the clinical manifestations of the disease the development of SARS-CoV-2 vaccine was designated as the most important factor in controlling the pandemic. A large number of vaccines based on different platforms are under development and at different stages of clinical research, including some candidates that were manufactured by use of technologies not previously utilized for vaccine production. Rapid detection of the molecular characteristics of SARS-CoV-2, comprehensive analysis of the pathogenesis of the disease and its clinical manifestation, and scarce therapeutic options have enabled extremely rapid progress in vaccine development, also aided by large financial resources. Reviewing the characteristics of different vaccine development platforms, understanding the way an immune response is generated remains key for the mass vaccination against this dangerous pathogen. The problems we are facing today will also be important for responding more quickly to various potential pandemics in the future. In this review, an emphasis is placed on showing why some platforms are more suitable than others, that is, to explain what are the advantages that some platforms have in comparison to others when it comes to developing SARS-CoV-2 vaccines.

Key words: SARS-CoV-2, vaccine, development, platforms for vaccine development

1. UVOD

1.1 SARS-CoV-2 i COVID-19 pandemija

SARS-CoV-2 je prvi puta identificiran kao etiološki čimbenik odgovoran za razvoj izrazito teške pneumonije u Wuhanu u Kini u prosincu 2019 (1). 11. ožujka 2020. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) proglasila je SARS-CoV-2 globalnom pandemijom, a bolest koju virus izaziva nazvana je COVID-19 (2). Do 23. listopada 2020. SARS-CoV-2 infekcija zahvatila je više od 9.678.494 ljudi širom svijeta, što je doprinijelo više od 1.143.357 smrtnih slučajeva, sa stopom smrtnosti od 2,72% (3). Od samog početka pandemije sve države su nastojale uvođenjem različitih mjera suzbiti transmisiju SARS-CoV-2 te na taj način smanjiti broj oboljelih. Kao odgovor na pandemiju, industrija, vlade, nevladine organizacije i akademske zajednice diljem svijeta surađuju na razvoju terapijskih i preventivnih mjera (4). S obzirom da se infekcija širi najviše putem aerosola i kapljičnim prijenosom, neke od istaknutih mjera koje su stupile na snagu svugdje u svijetu pa tako i u Hrvatskoj su bile poticanje fizičkog distanciranja, nošenje maske pogotovo u zatvorenim prostorima, zabrana okupljanja sa više ljudi te različite mjere samoizolacije i karantene. Te mjere su od osobite važnosti jer su terapijske mjere koje su nam dostupne u borbi protiv ove izrazito teške bolesti oskudne. S druge strane, sve te mjere koje su na snazi uvelike utječu na naš svakodnevni život. Prema istraživanju o ponašanju ljudi u karanteni vidljivo je da ono znatno utječe na emocionalno i mentalno zdravlje te da potencijalno može dovesti do različitih psihičkih oboljenja uključujući depresiju, generaliziranu anksioznost, nesanicu i posttraumatski stres (5). Osim samog ponašanja ljudi, fizičko distanciranje i samoizolacija snažno su utjecali na prehrambene navike i dnevnu dozu fizičke aktivnosti kod ljudi (6). Prehrana, vježbanje, kognitivni trening i upravljanje metaboličkim i vaskularnim čimbenicima rizika važni su za održavanje kognitivnog funkcioniranja i smanjenje rizika od razvoja kroničnih bolesti kod starijih osoba (7).

Iz toga proizlazi da bi dugotrajni utjecaj pandemije mogao negativno utjecati na zdravlje ljudi i dovesti do povećanja broja oboljelih od raznih kroničnih nezaraznih bolesti. S obzirom na to, ističe se da je nužno što prije suzbiti ovu pandemiju i vratiti svijet u stanje kakvo je bilo prije pandemije.

Stoga je bilo nužno pronaći najbolji način za suzbijanje bolesti, a tu se upravo kao najbolja opcija istaknulo cjepivo. Od pojave bolesti COVID-19, uzrokovane virusom SARS-CoV-2, došlo je do eksplozije razvoja cjepiva. Do 24. rujna 2020. veliki broj cjepiva (više od 200) započeo je preklinički razvoj, od kojih je 43 ušlo u klinička ispitivanja, uključujući neke pristupe koji prethodno nisu bili korišteni kod proizvodnje cjepiva ljudi (8). Ovaj brzi razvoj uglavnom je posljedica snažnog utjecaja akademske zajednice, industrije i političara te ogromnih financijskih sredstava za projekte cjepiva (9).

U skladu s takvim razmatranjima, cilj ovoga preglednoga rada je opisati najvažnije elemente vezane uz način na koji SARS-CoV-2 dovodi do infekcije te na osnovu dosadašnjih pokazatelja i znanstvenih istraživanja dati pregled kako se cjepivom stvara imunost u borbi protiv te iste infekcije. Rad također želi predstaviti kliničku pozadinu bolesti COVID-19, koja je važna za razumijevanje važnosti cjepiva u borbi protiv ovog izrazito opasnog patogena. Također će biti predstavljene različite platforme u razvoju cjepiva te njihove prednosti i nedostaci što je ključno u razumijevanju kompleksnosti razvoja cjepiva.

2. SARS-CoV-2 virologija

SARS-CoV-2 član je obitelji Coronaviridae, zajedno sa koronavirusom povezanim s akutnim respiratornim sindromom (SARS-CoV) i koronavirusom respiratornog sindroma Bliskog istoka (MERS-CoV) kao koronavirusi koji uzrokuju ozbiljnije bolesti u ljudi. Koronavirusi su jednolančani, pozitivni RNA virusi koji kodiraju četiri glavna strukturalna proteina: glikoprotein korona izdanka (S), protein ovojnice (E), protein membrane (M) i nukleokapsidu (N), kao i višestruke nestrukturalne proteine (10). Genom SARS-CoV-2 kodira 11 otvorenih okvira za čitanje (ORF), pri čemu većina njih ima nepoznatu funkciju. ORF1a i ORF1b kodiraju poliproteine, koji se cijepaju u višestruke nestrukturalne proteine. ORF4 kodira protein ovojnice, viroporin, a ORF5 membranski protein (11). ORF9 kodira nukleokapsidni (N) protein. ORF2 se ističe kao najvažniji dio genoma s obzirom da kodira glikoprotein korona izdanka (S) odnosno „spike“ protein, koji je glavni protein koji posreduje ulazak virusa u stanicu (12) i također je ključna antigenska determinanta. Ulazak u stanice S protein vrši preko receptora za angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2) (13). ACE2 se u velikom broju nalazi u dišnim putevima, na stanicama pneumocita tipa II. SARS-CoV-2 ima 10–20 puta veći afinitet za ACE2 od srodnog koronavirusa SARS-CoV-1 (14), što nam ukazuje zašto je baš SARS-CoV-2 doveo do nastanka pandemije. SARS-CoV-2 je također sposoban vezati ACE2 iz širokog spektra sisavaca (15). Upravo taj širok spektar sisavaca na koji imaju ACE2 receptore, implicira da SARS-CoV-2 može imati širok raspon domaćina, a sama razina ekspresije ACE2 u različitim životinja ukazuje na njihovu različitu osjetljivost na SARS-CoV-2 infekciju. Nakon što je vezao ACE2, S protein se cijepa proteinazom koja je vezana uz stanicu domaćina. Najvažnije proteinaze su Furin i TMPRSS2. Podaci o sekvenciranju RNA pokazali su da je TMPRSS2 visoko eksprimiran u nekoliko tkiva i na mjestima na tijelu te se koeksprimira s ACE2 u epitelnim stanicama nosa, plućima i bronhijalnim granama, što bi nam

moglo objasniti trpoizam SARS-CoV-2 infekcije prema nekim tkivima (16). Na taj način se omogućuje ulazak virusne kapside u stanicu. S1 podjedinica S-proteina podijeljena je na dvije funkcionalne domene, N-terminalnu domenu i C-terminalnu domenu. Strukturne i biokemijske analize identificirale su 211 aminokiselina (aminokiseline 319-529) na S1 C-terminalnoj domeni SARS-CoV-2 kao mjesta koja se vežu na ACE2 receptor, a upravo ta mjesta imaju ključnu ulogu u unosu virusa u stanicu. Osim tih strukturnih proteina, kao što je već navedeno razlikujemo i veći broj nestrukturnih proteina točnije njih 16 tzv. Nsp. Njihova uloga u razvoju infekcije je izrazito raznolika. Poznato je da tijekom infekcije SARS-CoV-2, NSP16 veže domene mRNA Un i U2 snRNA i na taj način suzbija „splicing“ mRNA. NSP8 i NSP9 vežu se za 7SL RNA i na taj način ometaju promet proteina kroz staničnu membranu što suzbija obrambeni sustav domaćina (17). NSP1 ima također veliku ulogu u razvoju infekcije, jer se veže na 18S ribosomsku RNA u ulaznom kanalu ribosoma i dovodi do inhibicije translacije mRNA. Iz svega ovoga je vidljivo da virus pokazuje izraziti potencijal za razvoj infekcije kako zbog činjenice velikog potencijala za vezanje na ACE2 receptore koji su rasprostranjeni u cijelom organizmu, tako i zbog funkcije različitih nestrukturnih proteina koji suzbijaju obrambene sustave domaćina.

3. Patogeneza SARS-CoV-2 infekcije

Patogeneza infekcije SARS-CoV-2 kod ljudi očituje se od blagih simptoma pretežno gornjih dišnih sustava do ozbiljne respiratorne insuficijencije. Nakon što se vezao za epitelne stanice u respiratornom traktu, SARS-CoV-2 počinje se replicirati i migrirati prema donjim dišnim putevima i te ulazi u epitelne stanice alveola. Brza replikacija SARS-CoV-2 u plućima može potaknuti izrazito snažan imunološki odgovor. Taj snažan imunološki odgovor uzrokuje sindrom citokinske oluje koji dovodi do akutnog respiratornog distress sindroma i razvija zatajenje

respiracije, što se smatra glavnim uzrokom smrti u bolesnika s COVID-19 (18). Pacijenti starije dobi (> 60 godina) i s ozbiljnim komorbiditetima imaju veći rizik od razvoja akutnog respiratornog distres sindroma i smrti (19). Također je u nekim slučajevima COVIDa-19 zabilježeno i višestruko zatajivanje organa (20). Najznačajnije histopatološke promjene događaju su na plućima. Na plućima je vidljivo obostrano difuzno oštećenje alveola, stvaranje hijalinske membrane, deskvamacija pneumocita i stvaranje naslaga fibrina kod bolesnika s teškom infekcijom. U nekim je slučajevima također prikazana eksudativna upala.

4. Imunologija SARS-CoV-2 infekcije

Od izrazite važnosti je spomenuti kako dolazi do imunološkog odgovora organizma na infekciju ne samo zato jer je poznavanje imunološkog odgovora od ključne važnosti u razvoju cjepiva za SARS-CoV-2, već nam može pružiti neke odgovore vezano uz farmaceutske i imunološke mogućnosti liječenja.

4.1 Urođeni imunosni odgovor

Trenutne spoznaje o SARS-CoV-2 sugeriraju da je imunološki odgovor na SARS-COV-2 sličan u nekoliko aspekata na odgovor na SARS-COV-1 ili MERS-CoV dva koronavirusa odgovorna za razvoj epidemije u periodu od 2002. do 2004 u slučaju SARS-CoV-1 i 2012. u slučaju MERS-CoV. Poput SARS-COV-a i MERS-CoV, SARS-Cov-2 potiskuje aktivaciju urođenog imunološkog sustava, uključujući dendritičke stanice i odgovor interferona 1 i 3. Ova sposobnost SARS-COV-2 da utišava urođeni imunološki odgovor može objasniti dugu inkubaciju ili presimptomatsko razdoblje od 2-14 dana kod COVID-19 bolesti u odnosu na period inkubacije od 1-4 dana za gripu. Iz toga proizlazi da suzbijanje urođenog imunološkog odgovora protiv

SARS-CoV-2 na početku infekcije vjerojatno pridonosi disregulaciji upalnog odgovora, osobito u klinički teških pacijenata. Kod pacijenata s težom kliničkom slikom, pronađen je značajno povećani broj upalnih monocita i neutrofila u krvi (21) te povećane sistemske razine upalnih citokina i kemokina (22). Dakle neuspjeh imunskog sustava da suzbije infekciju u ranoj fazi vjerojatno rezultira povećanjem virusnog opterećenja, ali i disregulacijom imunskog odgovora s posljedičnom teškom imunopatologijom, uključujući i onu najtežu odnosno akutni respiratorni distress sindrom o čemu će biti više kasnije u tekstu. Upravo iz tog razloga su stariji ljudi i oni s različitim komorbiditetima, odnosno ljudi koji već imaju disregulaciju imunološkog sustava, podložniji razvoju teške kliničke slike. Zato u razvoju cjepiva ne bih trebalo zanemariti mehanizam urođene imunosti u borbi protiv COVID-a kao jedne od determinanti koje reguliraju težinu kliničke slike.

4.2 Humoralna imunost

Razumijevanje imunoloških reakcija nakon prirodne infekcije presudno je za predviđanje tijeka pandemije, pri čemu se osobiti naglasak stavlja na serokonverziju i seroreverziju, pošto oni direktno utječu na potencijalni razvoj imuniteta krda, što nam ukazuje i na potencijalni značaj humoralne imunosti pri cijepljenju. Što se serokonverzije tiče, prema jednoj od ranijih studija provedenoj u Wuhanu, 285 kineskih bolesnika s COVID-19 ispitivano je na akutni odgovor antitijela na virusne S i N antigene. Tri tjedna nakon pojave simptoma, 100% pacijenata pokazalo je IgG antitijela. Od tih bolesnika, 63 bolesnika praćeno je s više uzoraka krvi: 31% je bilo IgG pozitivno unutar 4 dana nakon pojave simptoma. Ta se prevalencija povećala na 69% nakon 1 tjedna i 90% nakon 2 tjedna. Prevalencija i titar IgM antitijela bili su niži od titra IgG antitijela, a IgM nije prethodio povećanju IgG antitijela. Pacijenti s ozbiljnom bolešću imali su veću razinu IgG protutijela od onih s umjerenom bolešću (23). 3 mjeseca od pojave simptoma COVID-19

bolesti, kliničari iz Londona istraživali su odgovor na antivirusna antitijela u 65 hospitaliziranih pacijenata s dokazanom infekcijom SARS-CoV-2 i kod 31 zaraženih zdravstvenih radnika. IgG i IgM antitijela protiv S i N antigena, primijećeni su u više od 90% ispitanika, IgA odgovor bio je rjeđi. Nagli pad IgM i IgA odgovora zabilježen je unutar 30 dana nakon infekcije, dok je IgG odgovor ostao visok i do 90 dana. Vršni titar neutralizirajućih antitijela primijećen je nakon 23 dana kada je 8% imalo niske, 11% srednje, 19% visoke i 60% izrazito visoke neutralizacijske titre (24). Ovo je izrazito važno u planiranju razvoja cjepiva pošto iz dotičnog možemo zaključiti kako IgA protutijela koja su pretežno smještena na sluznicama respiratornog trakta ne pružaju dovoljnu zaštitu od potencijalnog razvoja infekcije, što potom postavlja pitanje o tome stvara li se pneumonija kod SARS-CoV-2 infekcije putem viremije ili spuštanjem iz gornjih dijelova respiratornog trakta. Što se seroreverzije tiče, provedeno je istraživanje u SAD-u na COVID pacijentima, pri čemu su ti pacijenti bili praćeni kroz 122 dana nakon pojave simptoma bolesti. Povratak u seronegativni status primijećen je nakon 50 dana za IgM i nakon 70 dana za IgA, dok su samo tri pacijenta postala negativna na IgG protiv nakon 122 dana. Važno je naglasti da su ta tri pacijenta od početka imala nizak IgG, a jedan je pacijent bio imunosuprimiran (25). Također titar IgG pokazao je dobru korelaciju s neutralizirajućim protutijelima, a praktički su svi pacijenti pokazali dobar titar neutralizirajućih antitijela 2 mjeseca nakon pojave simptoma. Nije uočena unakrsna reaktivnost sa sezonskim koronavirusima. Na kraju bitno je još pojasniti što se događa u prirodnom tijeku bolesti kod imunokompromitiranih pacijenata. Humoralni odgovori u bolesnika s COVID-19 često su ograničeni. B-stanice drugotrajne memorije i visoko specifična antitijela sazrijevaju unutar germinativnih centara u sekundarnim limfoidnim organima (26). Američki imunolozi izvršili su analizu na posmrtnim uzorcima torakalnih limfnih čvorova i slezene od fatalnih infekcija COVID-19 (27). Oni su ispitali arhitekturu limfnog čvora i populacije limfocita

kod preminulih od COVID-a. Primijetili su odsutnost germinativnih centara i zapanjujuće smanjenje B stanica Bcl-6 + unutar germinativnih centara. Odsutnost germinativnih centara korelirala je s ranim specifičnim blokom u diferencijaciji Bcl-6 + stanica. Paralelno s tim, opažene su obilne stanice Th1 i aberantna proizvodnja tumorskog faktora nekroze alfa (TNF-a) u limfnim čvorovima COVID-19 pacijenata. Gubitak germinativnih centara doveo je do akumulacije aktiviranih B stanica koje nisu nastale unutar germinativnog centra. Aktivacija B-staničnog odgovora koji nije porijeklom iz germinativnog centra ne dovodi do dugovječne memorije i stvaranja visokospecifičnih protutijela.

4.3 Stanična imunost

Njemački su istraživači istražili stanični imunološki odgovor kod 18 pacijenata s COVIDom-19 izolirajući mononuklearne stanice iz njihove periferne krvi i stimulirajući ih većim količinama peptida S-proteina (28). U 67% i 83% bolesnika s COVIDom-19 otkrili su CD4 + T stanice koje reagiraju na N-terminalni, odnosno na C-terminalni dio peptida. Značajno je da većina bolesnika s COVID-19 koji su imali tešku kliničku sliku nije pokazala reaktivnost na N-terminalne peptide ,koji sadrže domenu za vezanje receptora u interakciji s ACE-2 receptorima, što može upućivati na zaštitnu ulogu staničnog imunološkog odgovora protiv dijela S-proteina koji sadrži odgovarajuću domenu. Neočekivano otkriće viđeno je kod zdravih darivatelja krvi koji nisu bili zaraženi sa SARS-CoV-2, što je dokazano negativnim protutijelima i negativnom RNA na virus. U 68 negativnih kontrola, 35% je imalo T stanice koje su aktivirane, iako na nižoj frekvenciji, a bile su potaknute terminalnim C krajem virusnih peptida. S obzirom da C-kraj S-proteina SARS-CoV-2 pokazuje veću homologiju s ljudskim 'prehladnim' koronavirusima (HCoV), istraživače je zanimalo jesu li zapravo pronašli križno reaktivne T stanice.. Na kraju se ispostavilo da su uistinu T stanice iz tih kontrola bile stimulirane peptidima iz sezonskih koronavirusa. Tu se ključnim

pokazalo da CD4 + T stanice osoba koje su prebolile COVID-19 izražavaju CD38, HLA-DR i Ki-67, biljege koji ukazuju na efektorski odgovor T-stanica tijekom akutnih virusnih infekcija. T stanice kod zdravih osoba nisu pokazivale ove markere, što nam zapravo znači kako su te T-stanice bile aktivirane negdje u prošlosti. Ovo zapažanje nam može ukazivati na križnu reaktivnost T-stanica kod osoba koje su prebolile prehladu sezonskim koronavirusom, prema SARS-CoV-2 infekciji. HCoV ili sezonski koronavirusi čine oko 20% infekcija gornjih dišnih putova i obično se pojavljuju zimi. Kao što je već objašnjeno, humoralna imunost nestaje u roku od nekoliko mjeseci nakon SARS-CoV-2 infekcije, a kod HCoV traje još kraće. Unatoč tome, ponovna infekcija uzrokuje mnogo manju replikaciju i širenje virusa, što ukazuje na zaštitnu ulogu dugotrajnijeg staničnog imuniteta, koji očito također pokazuje unakrsnu reaktivnost s proteinom S iz SARS-CoV-2. Zanimljivo, autori spominju da bi upravo ta unakrsna reakcija T stanica mogla objasniti otpornost djece na kliničke simptome COVIDa-19, jer su djeca imala „svježije“ infekcije sezonskim koronavirusima od odraslih.

5. Klinički i epidemiološki aspekti SARS-CoV-2 infekcije

Za razumijevanje važnosti cijepljenja protiv ove teške bolesti nužno je poznavati kliničke aspekte SARS-CoV-2 infekcije. Zbog izrazito raznolike kliničke slike važno je pravovremeno prepoznati i postaviti dijagnozu bolesti te što ranije krenuti u liječenje bolesti. Kako je već navedeno terapijske opcije su kod teško bolesnih pacijenata izrazito ograničene te se cjepivo smatra glavnim načinom prevencije same bolesti i zaobilaženja mukotrpnog procesa liječenja tih pacijenata. Poznavanje epidemiologije je također od velikog značaja jer bi nam moglo dati odgovore na načine cijepljenja koje ćemo provoditi u budućnosti.

5.1 Klinička slika pacijenata koji boluju od COVIDa-19

Izrazito važna klinička manifestacija SARS-CoV-2 infekcije je sama raznovrsnost u pojavi simptoma. Najčešći simptomi su vrućica, umor i suhi kašalj (29). Unatoč tome neki od ostalih simptoma uključuju glavobolju, hemoptizu, proljev, anoreksiju, grlobolju, bol u prsima, jezu i mučninu i povraćanje i curenje iz nosa (30). Vidimo da upravo ta raznolikost simptoma i sustava, koji su zahvaćeni infekcijom, otežava dijagnostiku same bolesti a istovremeno u ovo doba pandemije može „maskirati“ neke druge bolesti. Unatoč tome postoji i neki simptomi koji su karakterističniji za SARS-CoV-2 infekciju. Gubitak mirisa i okusa koji je prvi put opisan kod pacijenata u Italiji (31), možda je i najistaknutiji simptom koji se osobito javlja kod mlađe populacije. Stariji muškarci (> 60 godina) s komorbiditetima imaju veću šansu razviti tešku respiratornu bolest koja zahtijeva hospitalizaciju, a isto tako često i umiru, dok većina mladih i djece ima samo blagu kliničku sliku eventualno blagu upalu pluća, a često su asimptomatski prenositelji virusa što je osobito dobar pokazatelj brzog prijenosa virusa unutar obitelji (32). Prema prvim podacima koji su došli iz Kine, 81% slučajeva klasificirano je kao blaga bolest, 14% je bilo ozbiljnih slučajeva kojima je bila potrebna ventilacija u jedinici intenzivne njege, a 5% je bilo kritično te u tu skupinu spadaju pacijenti koji su imali respiratorno zatajenje, septički šok i/ili disfunkciju ili zatajenje više organa (33).

5.2 Dijagnostika COVIDa-19

Kao što je već naglašeno postavljanje što ranije dijagnoze COVIDa-19 od ključnog je značaja za kontrolu širenja virusa. Molekularno otkrivanje nukleinske kiseline SARS-CoV-2 zlatni je standard u postavljanju dijagnoze (34). Vrijeme potrebno da se detektira virus kreće se od nekoliko minuta do sati, ovisno o tehnologiji koja se koristi (35). Preciznost detekcije ovisi o mnogo čimbenika. SARS-CoV-2 može biti izoliran iz različitih izvora unutar dišnog sustava pa se tako

mogu uzimati brisevi ždrijela, stražnja orofaringealna slina, brisevi nazofarinksa, ali je ipak najveća koncentracija virusa u uzorcima donjih dišnih putova (36). Također, virusna RNA također je izolirana iz uzoraka probavnog trakta ili krvi, čak i onda kada su uzorci iz dišnog sustava bili negativni (37). Osim toga od početka simptoma može doći do pada količine virusa u tim uzorcima pa se sukladno tome mogu javiti lažno negativni testovi te je stoga važno koristiti neke druge metode za postavljanje ispravne dijagnoze. CT prsnog koša jedna je od opcija koja se koristi u dijagnozi COVIDa-19. Jedna od glavnih karakteristika vidljivih na CT-u je pojava bilateralnog „zasjenjenja nalik na mliječno staklo“. Stoga se predlaže da se CT skeniranje provodi u kombinaciji s analizom briseva kod osoba koje imaju veliku kliničku sumnju na COVID-19, ali su bile negativne prvi prvim analizama briseva (38). Konačno, serološki testovi SARS-CoV-2 koji traže postojanje antitijela na N ili S protein koronavirusa mogu nadopuniti navedene dijagnoze, posebno u kasnim fazama nakon početka bolesti ili pri izrađivanju retrospektivnih studija. Međutim kod serologije treba biti oprezan jer se serološki testovi razlikuju u svojoj osjetljivosti i specifičnosti.

5.3 Terapijske opcije u liječenju COVIDa-19

Kao što je već naglašeno ne postoji univerzalno dokazana učinkovita terapija za COVID-19 ili antivirusno sredstvo protiv SARS-CoV-2 infekcije, iako su neki tretmani pokazali određene koristi kod nekih pacijenata ili za određene krajnje točke. Istraživači i proizvođači provode opsežna klinička ispitivanja kako bi procijenili različite terapijske mogućnosti za COVID-19. Od 2. listopada 2020. bilo je u razvoju oko 405 terapijskih lijekova za COVID-19, a gotovo 318 u kliničkim ispitivanjima na ljudima. Lijekovi se fokusiraju na različite aspekte životnog ciklusa samog virusa. Blokada ulaska virusa u stanicu nastoji se postići lijekom umifenovir koji je u in vitro uvjetima pokazao kako ima aktivnost protiv razvoja infekcije SARS-Cov-2 (39), no druga

istraživanja su pokazala da ne poboljšava prognozu kod pacijenata s umjerenom do teškom kliničkom slikom (40). Camostat je lijek koji je u Japanu odobren za liječenje pankreatitisa i postoperativnog refluksnog ezofagitisa. Mehanizam njegovog djelovanja također leži u sprječavanju ulaska SARS-CoV-2 u stanice blokirajući aktivnost TMPRSS2 (koji i naveden kao proteaza koji cijepa S protein i omogućuje ulazak virusa u stanicu) što se na miševima pokazalo efikasnim u suzbijanju razvoja težeg oblika bolesti (41).

Osim tih lijekova postoji i veliki broj lijekova koji potencijalno inhibiraju replikaciju virusa uključuju remdesivir, favilavir, ribavirin, lopinavir i ritonavir. Remdesivir je pokazao aktivnost protiv SARS-CoV-2 in vitro i in vivo. Klinička studija otkrila je manju potrebu za potpornom terapijom kisikom u bolesnika s COVID-19 koji su primili remdesivir. Remdesivir može skratiti vrijeme oporavka kod bolesnika s COVID-19 za nekoliko dana u usporedbi s placebom, ali razlika u smrtnosti nije bila statistički značajna (42). Imunomodluacijski lijekovi kao što su tocilizumab i sarilumab, odnosno antitijela protiv receptora za interleukin-6 (IL-6) koja su se ranije koristila za liječenje različitih vrsta artritisa, uključujući reumatoidni artritis, pokazale su učinkovitost u liječenju „citokinske oluje“ uzrokovane SARS-CoV-2 infekcijom s obzirom na to da SARS-CoV-2 pokreće snažni imunološki odgovor. Upravo zato bi taj prekomjerni upalni odgovor mogao biti reguliran tim lijekovima. Deksametazon također valja spomenuti kao liječenje „citokinske oluje“. Liječenje rekonvalescentnom plazmom još je jedna moguća terapija za COVID-19. Preliminarni nalazi sugeriraju poboljšanje kliničkog statusa nakon tretmana (43). Međutim, ovaj oblik liječenja može ostaviti izrazito štetne učinke na organizam kao što su akutna ozljeda pluća i alergijska transfuzijska reakcija.

5.4 Epidemiološke osobitosti SARS-CoV infekcije

Rani prijenos SARS-CoV-2 u Wuhanu u prosincu 2019. u početku je bio povezivan s tržnicom morskih plodova Huanan. Kasnije je neprestani prijenos s čovjeka na čovjeka propagirao stvaranje pandemije. Općenito je prihvaćeno da je SARS-CoV-2 ima veći potencijal prijenosa od SARS-CoV i MERS-CoV. Reprodukcijski broj (R_0) koji se definira kao mjera intenziteta pandemije je prema brojnim istraživanjima relativno visok za SARS-CoV-2. Procjenjuje se da R_0 iznosi oko 2,5 (raspon od 1,8 do 3,6). Značajno je da se većina prijenosa SARS-CoV-2 s čovjeka na čovjeka rano u Kini dogodila unutar obitelji, a u drugim zemljama su se velika izbijanja dogodila i u drugim sredinama, kao što su zajednice, klaonice i pogoni za pakiranje mesa, što ukazuje na nužnost izoliranja zaraženih ljudi. Nozokomijalni prijenos nije bio glavni izvor prijenosa zaraze u Kini zbog primjene mjera kontrole infekcije u kliničkim uvjetima.

Brzo širenje SARS-CoV-2 infekcije uvjetovano je molekularnim osobinama samog virusa. Količina SARS-CoV-2 virusa u uzorcima gornjih dišnih putova izrazito je velika i prije pojave samih simptoma pa je stoga rizik od prijenosa virusa bio vrlo visok (44). Isto tako se smatra da je čak 79% dokumentiranih SARS-CoV-2 infekcija, uzrokovano asimptomatskim prijenosom virusa kod osoba koje nikad nisu dokumentirano bile pozitivne na virus (45), što nam dalje objašnjava potencijal prijenosa samog virusa i težinu praćenja kontakata. Pacijent s COVID-19 šire zarazu kapljičnim putem tijekom govora. Također se odvija i aerosolni način transmisije putem aerosolnih čestica, koje imaju potencijal duže ostati u zraku a zbog svoje težine imaju i veću vjerojatnost spuštanja u donje dišne puteve (46).

6. Općenito o cjepivu za SARS-CoV-2 i design cjepiva

Nakon svega navedenog vidljivo je da je bilo nužno rano intervenirati i potaknuti što brži razvoj cjepiva kao najbolje metode prevencije razvoja bolesti. Razvoj efikasnog cjepiva protiv SARS-CoV-2 za upotrebu potrajao bi nekoliko godina i koštao više milijuna dolara, s obzirom na to da bi temelj u proizvodnji cjepiva bile nove tehnologije čija sigurnost nije iscrpno ispitana (47). Tijekom pandemije virusa gripe H1N1 2009. proizvođači cjepiva su jednostavno prebacili brzo proizvodnju s proizvodnje trovalentnih cjepiva protiv sezonske gripe na monovalentna pandemijska cjepiva (48). Grubo rečeno, osnovna ideja je bila samo promjena soja i postići kriterije koji su nužni za izbacivanje cjepiva na tržište, što je s obzirom na to da je cjepivo protiv gripe tada postojalo bilo mnogo lakše izvedivo nego u slučaju COVID-a. Unatoč tome bilo je potrebno čak šest mjeseci dok cjepivo nije bilo spremno za distribuciju i upotrebu, te je izašlo prekasno te nije uspjelo spriječiti drugi val pandemije, koji se dogodio u Sjedinjenim Državama u jesen 2009.

Ovaj put suočavamo se s novim izazovom jer se mora u što kraćem mogućem vremenu proizvesti cjepivo za SARS-CoV-2, a sam postupak će biti složeniji jer do sada nismo imali dostupnih cjepiva u borbi protiv koronavirusa. S obzirom na to nema ni mogućnosti prerade gotovih cjepiva te je nužno razvijanje novih postupaka i tehnologije, a upravo ti postupci bi mogli biti složeni, zahtjevni i dugotrajni. Dizajn cjepiva obuhvaća nekoliko glavnih čimbenika koji se moraju izrazito pomno odabrati, a to su: izbor antigena, izbor platforme odnosno mehanizma na koji će cjepivo izazivati imunost, način na koji će cjepivo biti distribuirano i režim cijepljenja. Kasnije će u tekstu biti opisivane različite platforme za razvoj cjepiva, gdje će biti vidljivo da će imunogeničnost cjepiva varirati od platforme do platforme te će o tome ovisiti koliko će dugo zaštita cjepivom trajati te hoće li cjepivu biti dodani neki adjuvansi da bi pojačali njegovu

imunogeničnost. Također će ti faktori doprinijeti put kojim će cjepivo biti distribuirano i koliko će doza biti potrebno za razvoj dostojnog imunskog odgovora.

7. Izbor antigena u razvoju cjepiva

Struktura S proteina SARS-CoV-2 riješena je u rekordnom vremenu u visokoj rezoluciji, što nam je omogućilo da upravo to bude meta cjepiva. Već su studije vezane uz razvoj cjepiva protiv SARS-CoV-1 i MERS-CoV pokazale da je S protein na površini virusa idealna meta za cjepivo. Kako kod SARS-CoV-1 tako i kod SARS-CoV-2, kao što je već navedeno ovaj protein komunicira s receptorom ACE2, a antitijela koja bi se vezala na taj protein bi shodno tome blokirala vezanje S proteina za receptor i na taj način neutralizirala virus. Pored S proteina, rane studije s SARS-CoV-1 sugerirale su da je većina zaraženih osoba razvila odgovor antitijela na N protein (49). N-protein imunizirani BALB/c miševi također su inducirali CD4 + i CD8 + T stanični odgovor (50). Unatoč tome, u pokusima na miševima, cjepiva s ekspresijom N proteina nisu uspješno postigla zaštitu od SARS-CoV, dapače primijećena je pojačana infekcija, koju je karakterizirala povećana infiltracija eozinofila u plućima (51). Kod pasivnog prijenosa anti-N antitijela nije došlo do te pojačane infekcije, što je autore navelo da vjeruju da je to stanje povezano s odgovorom T stanica. Kasnije je ta pretpostavka utvrđena ponovno u pokusu na BALB / c miševima, koji ,nakon što su cijepljeni cjepivom koje eksprimira N protein, su također razvili pojačanu virusnu infekciju nakon izlaganja SARS-CoV-u, što je bilo povezano s Th2 odgovorom s plućnom infiltracijom neutrofila, eozinofila i limfocita (52). Iz tog razloga N protein nije bio pogodan antigen za cjepiva. M i E proteini su manje bili manje zanimljivi istraživačima kao zato što nisu bili toliko imunogenični kao prethodno navedeni proteini, (53) iako se pokazalo da serum pacijenta za SARS-CoV reagirao na M peptide. Unatoč tome prema jednom istraživanju pokazalo se da E protein može biti induktor

proizvodnje IL-1 β , što posljedično vodi do jakog upalnog odgovora. Zbog te spoznaje smatra se da je E protein odgovoran za „citokinsku oluju“ u bolesnika sa SARS-COV (54). U tom slučaju E protein opet nije dobar izbor antigena jer bi bilo teško kontrolirati upalni odgovor. Od manje proučavanih proteina, pokazalo se da je ORF3a sposoban za stvaranje neutralizirajućih antitijela u zečevima (55).

7.1 S protein kao izbor antigena kod cjepiva za SARS-CoV-2

Od velikog je značaja da se S protein kao antigenska meta nalazi u svom izvornom prefuzijskom obliku. U tome pomažu strategije stabilizacije antigena. Za Mers-cov i SARS-cov, uvođenjem dviju aminokiselina prolina u S2 podjedinicu učinkovito se stabilizirao S protein u svojoj prefuzijskoj konformaciji (56). Prefuzijski stabiliziran MERS-CoV S protein generirao je više razine neutralizirajućih antitijela u usporedbi s nativnim S proteinom. Ova metoda stabilizacije je također uspješno korištena za stabilizaciju SARS-COV-2 S proteina i primijenjena je na više vrsta cjepiva za SARS-CoV-2 (57). Za razliku od SARS-COV, ali slično MERS-CoV, SARS-COV-2 posjeduje mjesto cijepanja za furin između S1 i S2 domena. Za MERS-CoV, istraživači su proveli mutacije upravo tog mjesta kako bi poboljšali homogenost i stabilnost (58). Neki istraživači također su dodali foldon trimerizacijsku domenu na C terminalni kraj S proteina, (59) i proizveli deleciju citoplazmatskog repa SARS-COV-a što je dovelo do povećanog broja neutralizirajućih antitijela. Osim tih opcija neki razmatraju uvođenje vodeće sekvence aktivatora tkivnog plazminogena (TPA) u S protein (60). Uvođenjem te sekvence TPA može se povećati izlučivanje antigena i izazvati jači humoralni imunološki odgovor što je dokazano u cjepivu protiv gripe, pri čemu je također pojačana i stanična imunost.

8. Različite platforme za razvoj cjepiva za SARS-CoV-2

Postoji izrazito širok raspon cjepiva protiv SARS-CoV-2 koji su barem u nekoj od faza kliničkog ispitivanja. Tu razlikujemo tradicionalan pristup inaktiviranim, živim atenuiranim i proteinskim cjepivima i noviji pristup, koji donedavno još uopće nije bio korišten u ljudi a tu spadaju virusni vektori i nukleinske kiseline. Ovo zadnje područje se izrazito brzo razvijalo, pri čemu su neka cjepiva brže napredovala od drugih. Nekoliko čimbenika treba uzeti u obzir prije nego što bilo koje cjepivo postane široko rasprostranjeno. Najvažniji čimbenik je sigurnost cjepiva, a osim njega je važna i sama djelotvornost cjepiva. Također je i važno da proizvođač može osigurati dovoljnu količinu cjepiva za stvaranje imuniteta krda na širem području. Kako je razvoj cjepiva protiv SARS-CoV-2 usko povezan s razvojem cjepiva protiv SARS-CoV-1 i MERS-CoV pogotovo zbog svojih bioloških osobitosti ali i pokušajem uvođenja novih platformi u cijepljenje, bit će govora i o spoznajama do sada istraženim o tim cjepivima.

8.1 Proteinska cjepiva za SARS-CoV-2

Kao i kod ostalih patogena, rekombinantno proizvedeni virusni površinski proteini mogu se sigurno koristiti kao cjepiva za COVID-19. Iako proteinska cjepiva imaju dobar sigurnosni profil, mogu biti nisko imunogenična, što znači da mnogima trebaju različiti adjuvansi kako bi poboljšali svoju učinkovitost. Iako se cjepiva protiv bakterijskih proteina mogu napraviti pročišćavanjem cjelovitih bakterija, cjepiva protiv virusnih proteina zahtijevaju rekombinantni genetski inženjering. Geni koji kodiraju odabrane antigene kloniraju se ili sintetiziraju, ekspimiraju i pročišćavaju pomoću različitih ekspresijskih sustava, uključujući stanice insekata, bakterija, kvasca i sisavaca. Bakterijski sustavi za ekspresiju su često korišteni jer imaju visoku razinu ekspresije koju je relativno lagano dodatno povećati. Međutim, za virusne antigene, gdje posttranslacijska modifikacija može biti važna, upotreba stanica insekata ili stanica sisavaca može

biti bolji izbor. Do dana pisanja ovog preglednog diplomskog rada postoji osam SARS-COV-2 proteinskih cjepiva u kliničkim ispitivanjima, ali podaci tih kliničkih ispitivanja još uvijek oskudni. „Clover Biopharmaceuticals“ i Sveučilište u Queenslandu trenutno prednjače u razvoju proteinskog cjepiva. „Clover Biopharmaceuticals“ je koristio tehnologiju 'Trimeer-tag' kako bi nastao S-trimer protein. Cjepivo bi se planira davati zajedno s određenim adjuvansom, da se pojača stvaranje protutijela, ili s GSK-ovim adjuvansom AS03 ili citozin-fosfat-gvaanosinom (CPG). Sveučilište Queensland, koju je financirala „Koalicija za inovacije spremnosti za epidemiju“ razvilo je rekombinantno cjepivo koristeći protein S koji je bio održan u prefuzijskoj konformaciji korištenjem tzv. „clamp technique“.

8.2 Nanočestice i „Virus like particles“ cjepiva za SARS-CoV-2

„Virus like particles“ (VLP) cjepiva su zapravo podskup proteinskih cjepiva odnosno umjetno proizvedenih nanočestica koje imaju osobine virusa. Prednost ovog cjepiva je da umjesto pojedinačnog proteina, VLP imaju neke ili čak sve proteine koji tvore virusnu kapsidu (61). Oni imaju neke zajedničke osobine kao živo atenuirano i inaktivirano cjepivo, a mogu proizvesti izrazito jak stanični i humoralni imunološki odgovor bez rizika od razvoja bolesti, jer ne sadrže nikakav genetski materijal virusa. Taj se tip cjepiva koristi protiv različitih virusa, uključujući HPV i koristio se prekliničkim ispitivanjima za SARS-COV-1 (62). VLP nanočestice ne moraju nužno biti izvedene iz virusnih kapsidnih proteina. Novavax, koji je također financiran od strane „Koalicije za inovacije spremnosti za epidemiju“, razvio je rekombinantno nanočestično cjepivo (NVX-COV2373) koji također eksprimira S-protein SARS-CoV-2. On se proizvodi pomoću genetičkog inženjeringa bakulovirusa kojim se inficiraju SF9 stanice insekata. Prema nedavno objavljenim podacima, za kliničko ispitivanje tog cjepiva, Novavax koristi vlastiti Matrix-M adjuvans. Cjepivo se pokazalo imunogeničnim, ali je adjuvans bio nužan za postizanje 100%

serokonverzije. Nadalje bile su potrebne dvije doze za proizvodnju neutralizirajućih antitijela kod svih pojedinaca. Druga tvrtka, Medicago, koriste biljni sustav, „Nicotiana Benthamiana“, za proizvodnju VLP -a koji je trenutno u kliničkom ispitivanju u kombinaciji s CPG ili AS03 adjuvansom.

8.3 Peptidna cjepiva za SARS-CoV-2

Peptidna cjepiva temelje se na konceptu da se, indukcija t staničnog odgovora može postići djelićem virusnog proteina odnosno peptidom (63). Pravim odabirom epitopa, peptidna cjepiva mogu potencijalno izazvati imunosti odgovor širokog spektra, protiv više sojeva određenog patogena (64). Peptidi su lakši za proizvodnju od cijelih proteinskih antigena, jer se mogu proizvesti sintetički i ne zahtijevaju preklapanje u terciarnu strukturu. Međutim, peptidne cjepiva su često slabije imunogenična. Toj slaboj imunogeničnosti pridonosi nekoliko faktora od kojih je najvažniji relativno mala veličina peptida i shodno tome drugačije prepoznavanje od strane imunosti sustava. Upravo zbog toga ti peptidi moraju imati proteinske nosače ili adjuvanse (65). Postoji više različitih peptidnih cjepiva protiv SARS-COV-2, koje su u različitim fazama istraživanja. Radi se uglavnom o multi-epitopnim cjepivima koja se većinom fokusiraju na T staničnom imunosti odgovoru, a ne odgovoru B stanica. Kompanija „OSE Immunotherapeutics“ je koristila multi-epitopni peptidni pristup za indukciju T-stanične imunosti u pokusu na miševima (66). COVAXX i Medicinski centar Sveučilišta u Nebraski nedavno su ušli u prvu fazu kliničkog ispitivanja multi-epitopnog peptidnog cjepiva.

8.4 Inaktivirana cjepiva za SARS-CoV-2

Izoliranje i zatim pretvaranje virusa u inaktivni oblik, jedna je od najstarijih metoda cijepljenja. Ta metoda je bila uspješna kod stvaranja cjepiva protiv velikog broja virusa. Međutim, postojale su različiti sigurnosni problemi vezano uz razvoj cjepiva protiv SARS-COV-1 i Mers-cov inaktiviranih cjepiva, a ti problemi također postoje i kod cjepiva protiv SARS-CoV-2. Različite plućne patologije su primijećene na pokusu na životinjama koja su bila cjepiva gama zračenjem inaktiviranim mers-cov cjepivom (67) i UV zračenjem inaktiviranim SARS-COV-1 cjepivom (68). Čini se kako je ključno kod inaktiviranog cjepiva adekvatno izabrati kombinaciju adjuvansa i inaktivnog agensa jer se na taj način može postići dobar imunološki odgovor. Na primjer, formaldehidom inaktivirano mers-cov cjepivo sa CPG adjuvansom pokazao je dobru zaštitu bez induciranja plućne patologije u pokusu na miševima (69).

Pregledom literature do dana pisanja ovog preglednog rada uspio sam pronaći 4 kandidata koja imaju inaktivirano cjepivo protiv SARS-CoV-2 u nekoj od faza kliničkog ispitivanjima. „Sinovac Biotech“ koristi platformu na kojoj se prethodno razvijalo cjepivo za SARS-COV-1 (70). Virus se uzgaja u Vero stanicama (bubrežnim epitelnim stanicama zelenog majmuna) i inaktiviran je s beta-propiolaktonom. Inaktivirano cjepivo je sigurno u rezus makaki majmuna i stvara visoku razinu zaštite od Sars-Cov-2 (71). Razvijene su dvije različite verzije ovog inaktiviranog cjepiva, ovisno o tome koji je adjuvans korišten, jedan je Alum, a drugi CPG108. Ovo cjepivo je završilo fazu II kliničkog ispitivanja u 600 zdravih odraslih osoba u dobi od 18 do 59 godina pri čemu je primijećena 90% serokonverzija nakon druge doze cjepiva i stvaranje neutralizirajućih protutijela (72). Cjepivo je ušlo u klinička ispitivanja faze III u Brazilu i Indoneziji. Sinopharm, je također razvio inaktivirano cjepivo. To cjepivo je prošlo I. i II. fazu kliničkog ispitivanja. Nisu do sada uočeni nikakvi ozbiljniji štetni učinci, a kod više od 95% pojedinaca je došlo do serokonverzije s

detektiranim neutralizirajućim antitijelima u dva različita ispitivanja (73). Preostale dvije organizacije, Bharat Biotech (Indija) i Institut za medicinsku biologiju u Kini, također provode klinička ispitivanja inaktiviranih cjepiva, ali još uvijek nema dovoljno podataka o rezultatima istih.

8.5 Živo atenuirano cjepivo za SARS-CoV-2

Korištenje živog atenuiranog cjepiva izrazito podsjeća na prirodnu infekciju. Upravo zbog toga je ono često imunogenično nakon jedne primjene bez korištenja adjuvansa (74). Ono što je izrazito važno kod takvih cjepiva je postići adekvatan omjer između atenuacije (prigušenja) i replikacije, odnosno pretjerano atenuirana cjepiva ne mogu se replicirati dovoljno kako bi bila imunogenična. Ta ravnoteža može također varirati između različitih pojedinaca, posebno kod veoma mladih ljudi i imunkomprobitiranih. Atenuirani virusi mogu se stvoriti reverznom genetikom, odnosno ciljanim mutacijama gena povezanih s virulencijom. E protein je bio ciljna meta kod SARS-COV-1 i MERS-CoV (75). Međutim, ova metoda zahtijeva identifikaciju gena koji će atenuirati virusnu replikaciju i mutaciju tih gena sa očuvanom fenotipskom stabilnošću. Tu pomaže relativno nova metoda deoptimizacije kodona. Njezin cilj je sintetizirati virus koji bi sadržavao 100% aminokiselinskih sekvenci identičnih matičnom virusu, ali bi imao veći broj CPG i UPA RNA dinukleotida. Deoptimizacija kodona korištena je za atenuaciju RSV (76). Codagenix i Serum institut u Indiji razvijaju živo atenuirano SARS-COV-2 cjepivo, koristeći upravo metodu deoptimizacije kodona, prema prethodnom iskustvu atenuacije RSV-a.

8.6 Vektorska cjepiva za SARS-CoV-2

Ideja kod vektorskih cjepiva je ta da se neki ciljani antigen izražava putem nekog drugog mikroorganizma, bilo da se radi o virusu ili bakteriji. Adenovirus i VSV su neki od uobičajenih virusnih vektora. Vektori mogu biti ili nereplicirajući, pri čemu oni isporučuju željeni genetski materijal, ali se oni sami po sebi ne repliciraju ili mogu biti replicirajući.

8.6.1 Nereplicirajuća vektorska cjepiva za SARS-CoV-2

Postoji veći broj različitih ne-replicirajućih vektorskih cjepiva koje je trenutno u kliničkim ispitivanjima, i svi su vezani uz adenovirus. Adenovirusni vektori nemaju mogućnost replikacije jer im nedostaju geni E1A i E1B (77), a upravo to su geni koji su neophodni za reprodukciju virusa, i na taj način mogu dostaviti željeni antigen bez replikacije cijepljenoj osobi. Tako je poučeno na iskustvu s MERS-CoV, Sveučilište u Oxfordu razvilo čimpanzino adenovirus vektorsko cjepivo koji eksprimira divlji tip S-proteina (Chadox1 NCOV-19, poznatije kao AZD1222). AZD1222 cjepivo se prvi puta pokazalo imunogeničnim u pokusu na miševima i svinjama (78). U Rezus Makaki majmuna je smanjio broj zaraženih i teže slučaje pneumonije nakon što su bili izloženi SARS-COV-2 (79). AZD1222 cjepivo je ušlo u kliničko ispitivanje faze I 23. travnja 2020. godine gdje je sudjelovalo 543 volontera u dobi od 18 do 55 godina. U ovoj studiji je bilo primijećeno nekoliko blagih lokalnih i sistemnih nuspojava, koji su bili bez većeg problema regulirani s paracetamolom, ali ono važno je da nije bilo ozbiljnih štetnih učinaka. Cjepivo je bilo imunogenično u 91% sudionika koji su imaju neutralizirajuća antitijela nakon jedne doze i 100% nakon dvije doze. Također je primijećen i T stanični odgovor. U partnerstvu s AstraZenecom, ovo cjepivo je dobilo dodatnih 1,2 milijarde dolara investicija sa ciljem bržeg razvoja, proizvodnje i distribucije. Cjepivo je vrlo brzo napredovalo u pokuse Faze II / III u Ujedinjenom Kraljevstvu, Brazilu i Sjedinjenim Američkim Državama. „Cansino Biologics“ (Kina) razvijaju također

adenovirus vektorsko cjepivo, ovaj puta se radi o ljudskom ad5-vektorskom cjepivu. U fazi I kliničkog ispitivanja AD5 vektorsko cjepivo pokazalo se dobro podnošljivim i imunogenični 28 dana nakon cijepljenja (80). I humoralni odgovor i T stanični odgovor uočeni su u prethodno zdravih osoba 28 dana nakon cijepljenja. Prolazne i samoograničavajuće nuspojave kao što su visoka temperatura, umor i bol u mišićima prijavljene su kod većeg broja ispitanika. Te su nuspojave također bile prijavljene i u II. fazi kliničkog istraživanja (81). Težih nuspojava nije bilo. Još jedno interesantno vektorsko cjepivo koje je privuklo veliku pozornost dolazi Gamalej Istraživačkog Instituta te je dobilo popularni naziv Sputnik V. Karakteristika ovog cjepiva je da koristi dva različita adenovirusna vektora, AD26 i AD5. Prema jednom kliničkom istraživanju, kod cijepljenja sputnikom bilo kao prva doza ili druga, ponovo su primijećeni umjerene sustavnim i lokalne nuspojave, kod čega se osobito isticala bol na mjestu incizije. Ponovno nisu zabilježene teže nuspojave. Također je primijećena je 100% stopa serokonverzije.

8.6.2 Replicirajuća vektorska cjepiva za SARS-CoV-2

Ne postoji mnogo podataka o primjeni replicirajućih vektorskih cjepiva u proizvodnji cjepiva za SARS-CoV-2. Unatoč tome korištenje živog atenuiranog vektora je svakako opcija za razvoj kvalitetnog i sigurnog cjepiva. Od nekih potencijalnih kandidata svakako treba izdvojiti farmaceutsku kompaniju Themis, koja je poznata po tome što je razvila atenuirani vektor ospica izveden iz originalnog cjepiva iz 1954. godine. Themis je već prethodno koristio ovaj pristup u razvoju „Chikungunya“ cjepiva, koje je bilo sigurno i imunogenično (82). Oni su zajedno sa Sveučilištem u Pittsburghu pokrenuli klinička ispitivanja tim cjepivom.

8.7 Cjepiva za SARS-CoV-2 bazirana na nukleinskim kiselinama

Cjepiva bazirana na nukleinskim kiselinama ističu se u odnosu na ostala cjepiva zbog njihove niske cijene i sve bržeg razvoja, što je osobito važno u pandemijskim situacijama. Oni koriste plazmidnu DNA ili RNA, koja kodira određeni antigen. Nakon injekcije cjepiva, nukleinska kiselina se ulazi u stanice te one stvaraju odabrani antigen. Pandemija COVID-19 je stoga bila „povoljna“ situacija za razvoj cjepiva koja se baziraju na nukleinskim kiselinama.

8.7.1 DNA cjepiva za SARS-CoV-2

DNA cjepiva se sastoje od promijenjenog plazmida koji sadrži DNA sekvencu koja kodira željeni antigen i ekspresijskog sustava sisavca pomoću kojega se kontrolira ekspresija ciljnog antigena odnosno transgena, gena koji se želi transferirati kod cijepljene osobe. Ekspresijski sustav se sastoji promotora koji pokreće ekspresiju tog transgena, KOZAK sekvence za pokretanje translacije i 3' poli A repa. Nakon cijepljena DNA cjepivom željeni sadržaj ulazi u stanice domaćina najviše lokalno na mjestu imunizacije (83). Da bi došlo do adekvatne stečene imunološke reakcije, DNA mora ući u jezgru stanice. Tada procesom transkripcije i translacije naše stanice stvaraju željeni antigen na koji se onda pokreće imunosni odgovor. Tranzit ubrizgane „gole“ DNA do jezgre je vrlo neučinkovit proces, pri čemu većina DNA ne prelazi staničnu membranu. Kako bi se ublažio ovaj gubitak, DNA cjepiva koriste platforme za isporuku kao što su elektroporacija i bio-ubrizgavanje. Pretklinička ispitivanja na životinjama pokazala su da DNA cjepiva koja kodiraju proteine M, N, ili S virusa SARS-CoV-1 mogu izazvati imunološki odgovor (84). S protein se također eksprimira u jedinom DNA cjepivu protiv SARS-CoV-1 koje je prešlo u kliničko ispitivanje faze I te se pokazalo sigurnim i stvorilo je znatnu količinu neutralizirajućih antitijela (85). Najrazvijenije DNA cjepivo protiv MERS-CoV razvila je kompanija Inovio. Klinička ispitivanja faze I završena su 2019. godine, a cjepivo se pokazalo sigurnim i inducira

je i humoralni imunski odgovor te odgovor CD8 + T stanica (86). Upravo je to cjepivo koje je trebalo ući u fazu II kliničkog istraživanja klinička ispitivanja sada prenamijenjeno za klinička ispitivanja mogućeg cjepiva protiv SARS-CoV - 2. U pretkliničkim ispitivanjima tim cjepivom su također primijećeni i humoralni imunski odgovor i odgovor T stanica u pokusu na miševima. Kliničko ispitivanje faze I je u tijeku, ali nema još dovoljno podataka o rezultatima istraživanja.

8.7.2 RNA cjepiva protiv SARS-CoV-2

RNA cjepiva temelje se na istom principu kao i DNA cjepiva za ekspresiju željenog antigena cjepiva u stanici domaćina, ali kod njih nije potreban ulazak u jezgru te se na taj način preskače proces transkripcije i odvija se samo translacija proteina. Za razliku od DNA cjepiva, ekspresija RNA cjepiva započinje nakon što sadržaj uđe u citosol što može povećati učinkovitost ekspresije željenog antigena. Kao i kod DNA cjepiva, prisutnost „strane“ RNA detektira se već u citosolu (87), što RNA cjepivima daje isti efekt kao i primjena adjuvansa u cjepivu (88). Međutim, rano pokretanje reakcije interferom 1 može smanjiti sintezu željenog antigena (89). Taj bi se mehanizam mogao izbjeći ubacivanjem modificiranih nukleozida u željenu mRNA kako bi se stvorilo „utišano“ RNA cjepivo koje izbjegava prepoznavanje putem „Toll like receptora“ (TLR) i ne pokreće odgovor interferona tipa I (90), ali bi i dalje postojala ravnoteža između ekspresije antigena iz cjepiva i pokretanja dovoljno jakog imunskog odgovora za inudkciju imunosti kod cijepljene osobe. Ova ravnoteža bi mogla biti promijenjena s obzirom na način distribucije samog cjepiva i mogla bi varirati između različitih vrsta sisavaca, što otežava najbolji način distribucije u pretkliničkim istraživanjima. Postoje dva osnovna tipa RNA cjepiva: nereplicirajuća mRNA i samoreplicirajuća mRNA (saRNA). Nereplicirajuća mRNA cjepiva sastoje se od 5' kapice, od nekodirajućih regija (tzv. UTR) koji ograđuju sa svake strane kodirajuću regiju i poli A repa. 5' kapica ima važnu ulogu jer se pomoću nje strana mRNA može povezati s eukariotskim

translacijskim kompleksom. Nekodirajuće regije se koriste sa ciljem kontrolirane ekspresije proteina, izbjegavajući uključivanje sekvenci koje bi ometale proces translacije (91). Samoreplicirajuća RNA cjepiva su zapravo replikoni podrijetlom iz alfavirusa modificirani da kodiraju željeni antigen umjesto drugih stuktturnih proteina. Virusni replikon sadrži otvoreni okvir za čitanje (ORF) koji kodira četiri nestrukturna proteina alfavirusa (nsP1-4) i subgenomski promotor. Nestrukturani proteini tvore RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RDRP). Kompleks RDRP prepisuje više kopija željenog antigena u stanici. Upravo zbog toga saRNA stvaraju veću količinu željenog proteina i perzistiraju dulje od nereplicirajuće mRNA (92). Budući da se radi o najnovijoj tehnologiji u razvoju cjepiva, RNA cjepiva nisu razvijana protiv SARS-CoV-1. Unatoč tome velik broj RNA cjepiva je ušlo u klinička ispitivanja za SAR-CoV-2. Moderna je prva započela klinička ispitivanja 17. ožujka 2020. U kliničkom istraživanju faze I sudjelovalo je 45 dobrovoljaca, podijeljenih u tri grupe, gdje su primali različite doze cjepiva: niska (25 µg), srednja (100 µg) i visoka (250 µg). Pretklinička studija koja je koristila isto cjepivo pokazala je obećavajuću zaštitu protiv SARS-CoV-2 virusa (93). Cjepivo je bilo imunogenično s povećanjem titra antitijela s povećanjem primijenjene doze, no treba napomenuti da su tri osobe u skupini koja je primala najveću dozu prijavilo teže nuspojave, što je pokazalo kako je ipak doza cjepiva bila prejaka. Cjepivo je nakon toga otišlo u klinička istraživanja faze II i III s naglaskom da je primijenjena doza bila do 100 µg.

BioNTech je zajedno s Pfizerom radio na razvoju četiri različita cjepiva bazirana na S proteinu. Koriste mRNA modificiranu nukleozidom. Klinička ispitivanja faze I i II provodila su se u Njemačkoj i Sjedinjenim Državama. Cjepivo je induciralo stanični i humoralni odgovor kod miševa (94) i induciralo proizvodnju neutralizirajućih antitijela u kliničkoj studiji (95). I CureVac je također razvio mRNA cjepivo koje je u kliničkim ispitivanjima, ali još nisu objavljeni rezultati.

Imperial College London i njegova kompanija, VacEquity Global Health, razvijaju saRNA cjepivo koje kodira S protein. Intramuskularno ubrizgavanje inducira visok neutralizirajući titar antitijela kod miševa (96).

9. Prednosti i nedostaci različitih platformi za razvoj cjepiva protiv SARS-CoV-2

Pandemija COVID-19 omogućila je različitim platformama za razvoj cjepiva ulazak u klinička ispitivanja. Velik broj tih platformi se već pokazao u prekliničkim istraživanjima kao ohrabrujuća opcija modernog načina razvoja cjepiva, ali to nije samo po sebi bilo dovoljno atraktivna opcija za dobivanje potrebnih sredstava za ispitivanja na ljudima. Svaka od tih različitih platformi ima svoje prednosti i nedostatke, bilo da se radi o novijim ili starijim platformama. Teško je naći jednu „idealnu“ platformu za razvoj cjepiva, koja bi obuhvatila sve apozitivne aspekte cjepiva a izbacila neke neželjene nuspojave. Tako primjerice živa atenuirana cjepiva imaju tu prednost da se već dugi niz godina koriste kod u cijepljenju protiv različitih uzročnika te možemo u potpunosti garantirati njihovu učinkovitost i sigurnost. Unatoč tome u trenutnoj pandemiji ona nisu najbolji kandidat zbog dugog vremenskog perioda koje je potrebno pri prikupljanju uzoraka i ispitivanja zadovoljavajuće atenuacije. Inaktivirana cjepiva su također dugo u upotrebi i također garantiramo njihovu efikasnost i sigurnost te je njihova prednost također u tome što se brzo generiraju; međutim, ona zahtijevaju izrazito skupe uređaje za stvaranje dovoljne zalihe virusa. Također kod njih postoji i problem zbog potencijalne imunopatologije izazvane cijepljenjem s inaktiviranim cjepivom, što se osobito vidi u prekliničkim istraživanjima na SARS-CoV-1. Rekombinantna proteinska cjepiva su također već dugo u upotrebi i pružaju pristup koji više cilja željene antigene za razvoj imunosti od onih cjepiva koji koriste cijeli virus što je s jedne strane pozitivno jer se preciznije stvara željeni oblik imunosti ali s druge strane sama cjepiva su obično slabije

imunogenična te je nužna primjena adjuvansa. Kod njih je također važno koristiti ispravnu konformaciju proteina. Protein S kod SARS-CoV-2 mora biti u svojem prefuzijskom obliku kako bi bio dovoljno imunogeničan. Cjepiva bazirana na nukleinskim kiselinama imaju velik potencijal u pandemijskim uvjetima. DNA cjepiva su u povijesti bila manje imunogenična od ostalih platformi, iako se najmodernijim uređajima i taj problem može nadvladati. RNA cjepiva su po prvi puta testirana protiv zaraznih bolesti u ljudi. RNA cjepiva imaju najosnovniji problem u tome što nisu termostabilni te zahtijevaju stroge uvjete skladištenja na temperaturi od -80°C što može biti problem kod distribucije cjepiva. Virusna vektorska cjepiva su od početka bila izrazito napredna u kliničkim ispitivanjima. Pokazali su se kao jako dobar oblik razvoja cjepiva pri čemu se kao najveći problem ističe potencijalna postojeća imunost na vektor, posebno kada se koristi vektor podrijetlom od ljudskih virusa kao što je Ad5.

10. Ostali faktori u razvoju cjepiva

Osim samih platformi na kojima su bazirana sama cjepiva treba još istaknuti i važnost nekih drugih faktora. Među te faktore definitivno spada i korištenje adjuvansa. Kao što je već naglašeno proteinska cjepiva mogu biti nisko imunogenična. Upravo to se može pojačati korištenjem pomoćnih sredstava zvanih adjuvansi (97). Adjuvansi pojačavaju imunološki odgovor kroz više mehanizama kao što su primjerice, povećanje proizvodnje kemokina i citokina, poboljšana mobilizacija upalnih stanica na mjestu ubrizgavanja cjepiva te ukupno to sve rezultira pojačanom aktivacijom upale. Adjuvansi također mogu prilagoditi imunološki odgovor vodeći ga ka stvaranju najučinkovitijeg oblika imunosti protiv specifičnog patogena protiv kojeg se cijepi (98). Kod proteinskih cjepiva protiv SARS-CoV-2 postoji velik broj potencijalnih adjuvansa. Tu spadaju Advax, stipsa, AS03 (GSK), Matrix-M (Novavax), CpG (Dynavax) i MF59 (CSL). Cjepiva

bazirana na nukleinskim kiselinama također imaju svoje dodatke kako bi se povećala efikasnost cjepiva. Tako se nukleinske kiseline kombiniraju s nizom dodatka kao što su to lipidne nanočestice (LNP) i liposomi. One su od izrazitog značaja kod RNA cjepiva, jer je 'gola' RNA osjetljiva na razgradnju izvanstaničnim RNAzama što bi moglo spriječiti njihov unos u stanice. Upravo zbog toga Moderna i BioNTech u svojim cjepivima dodaju lipidne nanočestice kako bi poboljšali efikasnost cjepiva. To je još jedan od faktora koji utječe na stabilnost takvih spojeva te zahtjeva skladištenje cjepiva na nižoj temperaturi. Za DNA cjepiva, uređaji koji pojačavaju isporuku željenih tvari, često se koriste za povećanje unosa u organizam. Inovio koristi uređaj za elektroporaciju (Collectra® 2000) koji isporučuje električnu struju do mjesta ubrizgavanja. U studiji u kojoj se ta metoda koristila pri davanju cjepiva zabilježena je akutna bol (6 od 10 na VAS ljestvici) u prvih 5 minuta nakon imunizacije, nakon čega se ona povukla (99). Nisu zabilježene nikakve druge nuspojave.

11. Oblici cijepljenja u svrhu poticanja nespecifičnog imunskog odgovora

Još jedan oblik cijepljenja koji se smatrao potencijalno korisnim oblikom borbe protiv COVIDa-19 bilo je cijepljenje u svrhu poticanja nespecifičnog upalnog odgovora. Kao što je već navedeno, nespecifična imunost također ima važnu ulogu u razvoju bolesti i težine njezine kliničke slike. Jedan od pristupa koji je predložen za smanjenje učinka COVID-19 bila je uporaba drugih živih cjepiva kao nespecifičnih cjepiva (100). Tako je primjerice predloženo bacil Calmette – Guérin (BCG) cjepivo, oralno cjepivo protiv dječje paralize i cjepivo protiv ospica, zaušnjaka i rubeole. Osnovna ideja kod ovog oblika cijepljenja je potaknuti nespecifični imunski odgovor, gdje bi izloženost jednom agensu mijenjala epigenetski profil urođenih imunoloških stanica te potencijalno povećati proizvodnju upalnih medijatora npr. citokina. U pretkliničkim modelima

istraživanja tog oblika cijepljenja pokazalo se da predtretman BCG-om smanjuje broj zaraženih gripom. Također različiti ekološki podaci sugeriraju da su zemlje s obveznim cijepljenjem BCG imale manju stopu smrtnosti od COVID-19, ali ova analiza ima niz problema, uglavnom povezanih s demografskim podacima i vremenom kada je virus stigao u različite zemlje (101). U svakom slučaju potrebno je još podobnije istražiti taj oblik cijepljenja pošto bi nam on mogao biti od značaja u ranim fazama bilo koje pandemije s kojom ćemo se još potencijalno susretati.

12. Diskusija – je li cjepivo uistinu dovoljan čimbenik da prebrodimo pandemiju?

Iz svega vidljivoga jasno je da se zahvaljujući zajedničkim snagama znanstvenika diljem svijeta, političara, različitih industrija pravovremeno prepoznao problem ove izrazito teške bolesti. Tako je i brzo molekularno prepoznavanje glavnih aspekata SARS-CoV-2 infekcije i prepoznavanje kliničkih i epidemioloških aspekata same bolesti dovelo da jasnog cilja- razvoja brzog i efikasnog cjepiva. Vidljivo je da znanstvena pozadina nije zakazala, uistinu se jako puno ulaže u razvoj cjepiva i nema sumnje da je taj aspekt uspješno odrađen. No, jedna stvar koju treba prokomentirati je koliko će se ljudi uistinu htjeti cijepiti protiv SARS-CoV-2. Gledajući s jedne strane jasno je da su ljudi željni da se „novo normalno“ vrati u „staro normalno“ te da je cjepivo upravo temeljni način da dođemo do tog cilja. No, s druge strane, strah prema novim oblicima cjepiva, osobito među ljudima koji se ne razumiju dovoljno u aspekte cijepljenja te strah i ne povjerenje koje bi u ljudima mogla izazvati ova teška situacija u kojoj smo se našli bi uistinu mogla usporiti sam proces vraćanja na „staro normalno“. Prema radu koji su proveli studenti na našem fakultetu zajedno s prof. Likićem u kojemu su prikupili rezultate od većeg broja javnih anketa u europskim državama koje su se bavile stavovima ljudi prema cijepljenju za SARS-CoV-2, ispada kako bi se u prosjeku samo njih 58% cijepilo, 16% njih je bilo neutralno, a 26% se ne bi cijepilo

(102). Odgovor na pitanje je li cjepivo uistinu dovoljno kako bi stali na kraj pandemiji je zapravo jednostavan, apsolutno da, no moramo imati na umu kako je važno naći pravilan način i prikupiti dovoljan broj ljudi za razvoj imuniteta krda kojim bi se zaštitili svi i oni cijepljeni i oni koji se ne žele cijepiti pa i oni koji se iz bilo kojeg razloga ne mogu cijepiti. Ono što ovdje smatram važnim i vidim kao mogućnost za napredak jest potreba za utjecajem na ljude koji su neutralni. Teško je utjecati na bilo koji način na ljude koji su apsolutno protiv cjepiva, ali dobrim planiranjem se može utjecati na ljude koji nisu sigurni. Tu je važno da postoji dobra suradnja između svih sfera društva, od akademske zajednice i politike pa sve do medija.

13. Zaključak

S obzirom na kompleksnost same COVID-19 bolesti bilo na njezinoj molekularnoj razini, preko patogeneze i njezine izrazito teške kliničke slike, a oskudnih metoda liječenja, brzi razvoj sigurnog i efikasnog cjepiva je najvažniji faktor u suzbijanju bolesti. Nagađanja o tome koja je platforma cjepiva "najbolja", iako će svakako biti zanimljiva kako u akademskim okvirima tako i u široj populaciji iz pogleda potencijalnih „brendova“ cjepiva, u stvarnosti nisu od velikog značaja. Velik broj platformi koji je ušao u klinička ispitivanja svakako je dobar znak za razvoj cjepiva ne samo protiv SARS-CoV-2 već i protiv budućih patogena s kojima će se svijet sigurno prije ili kasnije susresti. Pojava novih oblika cjepiva kao npr. cjepiva bazirana na nukleinskim kiselinama, koja su u pretkliničkim studijama obećavale mnogo, u današnje vrijeme su konačno dobila priliku biti korištene kod ljudi. Ono što je osnovno pitanje je koliko će biti dobro organizirano samo provođenje cijepljenja i hoće li uistinu dovoljan broj ljudi biti sklon cijepljenju. Također treba vidjeti koliko će dugo uistinu trajati imunost protiv ovog patogena te kako bi se potencijalno nužno docjepljivanje odrazilo na stavove ljudi prema cijepljenju, osobito zbog samih karakteristika virusa

koji ne pokazuje klasičnu sezonsku pojavnost. Također, ostaju otvorena i neka važna pitanja u vezi s tim što je zapravo uspješno cjepivo, kako ga treba primijeniti i kome treba dati prioritet. Na kraju mislim da je ovo razdoblje u najmanju ruku izrazito pogodno za razvoj cjepiva. Nadam se da će ova pandemija uistinu pokazati ono što možda jako puno ljudi već zna, kao i onima koji još nisu svjesni, a to je koliki je uistinu značaj cjepiva u našim svakodnevnim životima te se nadam da ćemo u budućnosti moći još brže reagirati na različite patogene s kojima ćemo se susretati uz pomoć kompletno novih i razvijenih platformi cijepljenja.

ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Robertu Likiću koji me uveo u ovo područje i sa spremnošću za suradnju stručno vodio prilikom izrade ovoga diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima Jasni i Gordanu i baki Katici koji su mi bili oslonac i podrška tijekom svih ovih godina.

LITERATURA

1. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, i ostali. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet Lond Engl.* 2020.;395(10223):514–23.
2. Dagotto G, Yu J, Barouch DH. Approaches and Challenges in SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Cell Host Microbe.* 09. rujan 2020.;28(3):364–70.
3. Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *Int J Biol Sci.* 2021.;17(1):8–19.
4. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, i ostali. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 16. travanj 2020.;181(2):271-280.e8.
5. Brooks SK, Webster RK, Smith LE, Woodland L, Wessely S, Greenberg N, i ostali. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet Lond Engl.* 2020.;395(10227):912–20.
6. Di Renzo L, Gualtieri P, Pivari F, Soldati L, Attinà A, Cinelli G, i ostali. Eating habits and lifestyle changes during COVID-19 lockdown: an Italian survey. *J Transl Med [Internet].* 08. lipanj 2020. [citirano 31. svibanj 2021.];18. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7278251/>
7. Palmer K, Monaco A, Kivipelto M, Onder G, Maggi S, Michel J-P, i ostali. The potential long-term impact of the COVID-19 outbreak on patients with non-communicable diseases in Europe: consequences for healthy ageing. *Aging Clin Exp Res.* 2020.;32(7):1189–94.

8. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, Flight KE, Higham SL, Lemm N -M., i ostali. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol.* studeni 2020.;202(2):162–92.
9. LOCHT C. Vaccines against COVID-19. *Anaesth Crit Care Pain Med.* prosinac 2020.;39(6):703–5.
10. Srinivasan S, Cui H, Gao Z, Liu M, Lu S, Mkandawire W, i ostali. Structural Genomics of SARS-CoV-2 Indicates Evolutionary Conserved Functional Regions of Viral Proteins. *Viruses* [Internet]. 25. ožujak 2020. [citirano 01. lipanj 2021.];12(4). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232164/>
11. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J* [Internet]. 27. svibanj 2019. [citirano 01. lipanj 2021.];16. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6537279/>
12. Li W. Delving deep into the structural aspects of a furin cleavage site inserted into the spike protein of SARS-CoV-2: A structural biophysical perspective. *Biophys Chem.* rujan 2020.;264:106420.
13. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, i ostali. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* svibanj 2020.;581(7807):215–20.
14. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, i ostali. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 13. ožujak 2020.;367(6483):1260–3.

15. Conceicao C, Thakur N, Human S, Kelly JT, Logan L, Bialy D, i ostali. The SARS-CoV-2 Spike protein has a broad tropism for mammalian ACE2 proteins. *PLOS Biol.* 21. prosinac 2020.;18(12):e3001016.
16. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, i ostali. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* 18. svibanj 2020.;39(10):e105114.
17. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses [Internet]. [citirano 04. lipanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7543886/>
18. Rockx B, Kuiken T, Herfst S, Bestebroer T, Lamers MM, Munnink BBO, i ostali. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 29. svibanj 2020.;368(6494):1012–5.
19. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, i ostali. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* srpanj 2020.;180(7):1–11.
20. Yao XH, Li TY, He ZC, Ping YF, Liu HW, Yu SC, i ostali. [A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 08. svibanj 2020.;49(5):411–7.
21. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, qi Y, i ostali. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* [Internet].

13. ožujak 2020. [citirano 16. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108005/>
22. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, i ostali. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl.* 2020.;395(10229):1054–62.
23. Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, i ostali. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* kolovoz 2020.;26(8):1200–4.
24. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, i ostali. Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection. *Nat Microbiol.* 01. prosinac 2020.;5(12):1598–607.
25. Brüssow H. Immunology of COVID-19. *Environ Microbiol.* 2020.;22(12):4895–908.
26. Gars E, Butzmann A, Ohgami R, Balakrishna JP, O'Malley DP. The life and death of the germinal center. *Ann Diagn Pathol.* 01. veljača 2020.;44:151421.
27. Kaneko N, Kuo H-H, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, i ostali. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell.* 01. listopad 2020.;183(1):143-157.e13.
28. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, i ostali. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature.* studeni 2020.;587(7833):270–4.

29. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, i ostali. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Lond Engl.* 2020.;395(10223):507–13.
30. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, i ostali. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 2020.;395(10223):497–506.
31. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L, i ostali. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 26. ožujak 2020. [citirano 06. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7184514/>
32. Li C, Ji F, Wang L, Wang L, Hao J, Dai M, i ostali. Asymptomatic and Human-to-Human Transmission of SARS-CoV-2 in a 2-Family Cluster, Xuzhou, China. *Emerg Infect Dis.* srpanj 2020.;26(7):1626–8.
33. Chen T, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, i ostali. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *The BMJ* [Internet]. 26. ožujak 2020. [citirano 06. lipanj 2021.];368. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7190011/>
34. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 06. listopad 2020.;1–14.
35. Bordi L, Nicastri E, Scorzolini L, Di Caro A, Capobianchi MR, Castilletti C, i ostali. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus

- (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 27. veljača 2020. [citirano 07. lipanj 2021.];25(8). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7055037/>
36. Han H, Luo Q, Mo F, Long L, Zheng W. SARS-CoV-2 RNA more readily detected in induced sputum than in throat swabs of convalescent COVID-19 patients. *Lancet Infect Dis.* lipanj 2020.;20(6):655–6.
37. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B, i ostali. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 17. veljača 2020.;9(1):386–9.
38. Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology* [Internet]. 12. veljača 2020. [citirano 07. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7233363/>
39. Wang X, Cao R, Zhang H, Liu J, Xu M, Hu H, i ostali. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov* [Internet]. 02. svibanj 2020. [citirano 07. lipanj 2021.];6. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7195821/>
40. Li Y, Xie Z, Lin W, Cai W, Wen C, Guan Y, i ostali. Efficacy and Safety of Lopinavir/Ritonavir or Arbidol in Adult Patients with Mild/Moderate COVID-19: An Exploratory Randomized Controlled Trial. *Med N Y N.* 18. prosinac 2020.;1(1):105-113.e4.

41. Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S. Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *J Virol.* lipanj 2012.;86(12):6537–45.
42. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, i ostali. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N Engl J Med* [Internet]. 08. listopad 2020. [citirano 07. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7262788/>
43. Duan K, Liu B, Li C, Zhang H, Yu T, Qu J, i ostali. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28. travanj 2020.;117(17):9490–6.
44. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, i ostali. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 19. ožujak 2020.;382(12):1177–9.
45. Li R, Pei S, Chen B, Song Y, Zhang T, Yang W, i ostali. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science.* 01. svibanj 2020.;368(6490):489–93.
46. Stadnytskyi V, Bax CE, Bax A, Anfinrud P. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 02. lipanj 2020.;117(22):11875–7.
47. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity.* 14. travanj 2020.;52(4):583–9.

48. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov.* ožujak 2015.;14(3):167–82.
49. Pei H, Liu J, Cheng Y, Sun C, Wang C, Lu Y, i ostali. Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* for serodiagnosis and mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005.;68(2):220–7.
50. Liu S-J, Leng C-H, Lien S, Chi H-Y, Huang C-Y, Lin C-L, i ostali. Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. *Vaccine.* 12. travanj 2006.;24(16):3100–8.
51. Deming D, Sheahan T, Heise M, Yount B, Davis N, Sims A, i ostali. Vaccine Efficacy in Senescent Mice Challenged with Recombinant SARS-CoV Bearing Epidemic and Zoonotic Spike Variants. *PLoS Med* [Internet]. prosinac 2006. [citirano 09. lipanj 2021.];3(12). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1716185/>
52. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, i ostali. Prior Immunization with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Associated Coronavirus (SARS-CoV) Nucleocapsid Protein Causes Severe Pneumonia in Mice Infected with SARS-CoV. *J Immunol.* 01. studeni 2008.;181(9):6337–48.
53. Wang J, Wen J, Li J, Yin J, Zhu Q, Wang H, i ostali. Assessment of Immunoreactive Synthetic Peptides from the Structural Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Clin Chem.* prosinac 2003.;49(12):1989–96.
54. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, i ostali. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope

- Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. *PLoS Pathog* [Internet]. 01. svibanj 2014. [citirano 09. lipanj 2021.];10(5). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006877/>
55. Åkerström S, Tan Y-J, Mirazimi A. Amino acids 15–28 in the ectodomain of SARS coronavirus 3a protein induces neutralizing antibodies. *Febs Lett.* 10. srpanj 2006.;580(16):3799–803.
56. Pallesen J, Wang N, Corbett KS, Wrapp D, Kirchdoerfer RN, Turner HL, i ostali. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29. kolovoz 2017.;114(35):E7348–57.
57. Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, i ostali. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med* [Internet]. 28. srpanj 2020. [citirano 10. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7449230/>
58. Walls AC, Xiong X, Park Y-J, Tortorici MA, Snijder J, Quispe J, i ostali. Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. *Cell.* 21. veljača 2019.;176(5):1026-1039.e15.
59. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 16. travanj 2020.;181(2):281-292.e6.
60. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, i ostali. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary

report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 2020.;396(10249):467–78.

61. Syomin BV, Ilyin YV. Virus-Like Particles as an Instrument of Vaccine Production. *Mol Biol.* 2019.;53(3):323–34.
62. Ho Y, Lin P-H, Liu CYY, Lee S-P, Chao Y-C. Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 11. lipanj 2004.;318(4):833–8.
63. Sesardic D 1993. Synthetic peptide vaccines. *J Med Microbiol.* 39(4):241–2.
64. Zhang H, Hong H, Li D, Ma S, Di Y, Stoten A, i ostali. Comparing Pooled Peptides with Intact Protein for Accessing Cross-presentation Pathways for Protective CD8+ and CD4+ T Cells. *J Biol Chem.* 03. travanj 2009.;284(14):9184–91.
65. Li W, Joshi MD, Singhania S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines.* 02. srpanj 2014.;2(3):515–36.
66. Gauttier V, Morello A, Girault I, Mary C, Belarif L, Desselle A, i ostali. Tissue-resident memory CD8 T-cell responses elicited by a single injection of a multi-target COVID-19 vaccine. *bioRxiv.* 14. kolovoz 2020.;2020.08.14.240093.
67. Agrawal AS, Tao X, Algaissi A, Garron T, Narayanan K, Peng B-H, i ostali. Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Hum Vaccines Immunother.* 07. lipanj 2016.;12(9):2351–6.

68. Bolles M, Deming D, Long K, Agnihothram S, Whitmore A, Ferris M, i ostali. A Double-Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Vaccine Provides Incomplete Protection in Mice and Induces Increased Eosinophilic Proinflammatory Pulmonary Response upon Challenge ▽. *J Virol. prosinac* 2011.;85(23):12201–15.
69. Deng Y, Lan J, Bao L, Huang B, Ye F, Chen Y, i ostali. Enhanced protection in mice induced by immunization with inactivated whole viruses compare to spike protein of middle east respiratory syndrome coronavirus. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 04. travanj 2018. [citirano 14. lipanj 2021.];7. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884803/>
70. Qin E, Shi H, Tang L, Wang C, Chang G, Ding Z, i ostali. Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. *Vaccine*. 13. veljača 2006.;24(7):1028–34.
71. Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M, i ostali. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* [Internet]. 06. svibanj 2020. [citirano 14. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7202686/>
72. Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Kan B, Hu Y, i ostali. Immunogenicity and Safety of a SARS-CoV-2 Inactivated Vaccine in Healthy Adults Aged 18-59 years: Report of the Randomized, Double-blind, and Placebo-controlled Phase 2 Clinical Trial. *medRxiv*. 10. kolovoz 2020.;2020.07.31.20161216.

73. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, i ostali. Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes. *JAMA*. 08. rujanj 2020.;324(10):1–10.
74. Yong CY, Ong HK, Yeap SK, Ho KL, Tan WS. Recent Advances in the Vaccine Development Against Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. *Front Microbiol* [Internet]. 02. kolovoz 2019. [citirano 14. lipanj 2021.];10. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688523/>
75. Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeño JM, Fernandez-Delgado R, Fett C, Castaño-Rodríguez C, i ostali. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses with Mutations in the E Protein Are Attenuated and Promising Vaccine Candidates. *J Virol*. 21. siječanj 2015.;89(7):3870–87.
76. Mueller S, Stauff CB, Kalkeri R, Koide F, Kushnir A, Tasker S, i ostali. A Codon-pair Deoptimized, Live-attenuated Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus Is Immunogenic and Efficacious in Non-Human Primates. *Vaccine*. 23. ožujak 2020.;38(14):2943–8.
77. Wold WSM, Toth K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther*. prosinac 2013.;13(6):421–33.
78. Graham SP, McLean RK, Spencer AJ, Belij-Rammerstorfer S, Wright D, Ulaszewska M, i ostali. Evaluation of the immunogenicity of prime-boost vaccination with the replication-deficient viral vectored COVID-19 vaccine candidate ChAdOx1 nCoV-19. *NPJ Vaccines* [Internet]. 27. srpanj 2020. [citirano 14. lipanj 2021.];5. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7385486/>

79. van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, i ostali. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*. listopad 2020.;586(7830):578–82.
80. Zhu F-C, Li Y-H, Guan X-H, Hou L-H, Wang W-J, Li J-X, i ostali. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet Lond Engl*. 2020.;395(10240):1845–54.
81. Zhu F-C, Guan X-H, Li Y-H, Huang J-Y, Jiang T, Hou L-H, i ostali. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 2020.;396(10249):479–88.
82. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial - ScienceDirect [Internet]. [citirano 15. lipanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309915700435>
83. Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant Role for Directly Transfected Dendritic Cells in Antigen Presentation to CD8+ T Cells after Gene Gun Immunization. *J Exp Med*. 21. rujan 1998.;188(6):1075–82.
84. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, i ostali. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 18. ožujak 2005.;23(17):2269–72.

85. Martin JE, Louder MK, Holman LA, Gordon IJ, Enama ME, Larkin BD, i ostali. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine*. 25. studeni 2008.;26(50):6338.
86. Modjarrad K, Roberts CC, Mills KT, Castellano AR, Paolino K, Muthumani K, i ostali. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Infect Dis*. rujan 2019.;19(9):1013–22.
87. Chen N, Xia P, Li S, Zhang T, Wang TT, Zhu J. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *Iubmb Life*. svibanj 2017.;69(5):297–304.
88. Edwards DK, Jasny E, Yoon H, Horscroft N, Schanen B, Geter T, i ostali. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. *J Transl Med* [Internet]. 03. siječanj 2017. [citirano 16. lipanj 2021.];15. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210268/>
89. Pepini T, Pulichino A-M, Carsillo T, Carlson AL, Sari-Sarraf F, Ramsauer K, i ostali. Induction of an IFN-Mediated Antiviral Response by a Self-Amplifying RNA Vaccine: Implications for Vaccine Design. *J Immunol Author Choice*. 15. svibanj 2017.;198(10):4012–24.
90. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, i ostali. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. studeni 2008.;16(11):1833–40.

91. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 12. kolovoz 2010.;466(7308):835–40.
92. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, i ostali. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol Ther*. 07. veljača 2018.;26(2):446–55.
93. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, i ostali. SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Design Enabled by Prototype Pathogen Preparedness. *Nature*. listopad 2020.;586(7830):567–71.
94. Laczkó D, Hogan MJ, Toulmin SA, Hicks P, Lederer K, Gaudette BT, i ostali. A Single Immunization with Nucleoside-Modified mRNA Vaccines Elicits Strong Cellular and Humoral Immune Responses against SARS-CoV-2 in Mice. *Immunity*. 13. listopad 2020.;53(4):724-732.e7.
95. Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, i ostali. Phase 1/2 Study to Describe the Safety and Immunogenicity of a COVID-19 RNA Vaccine Candidate (BNT162b1) in Adults 18 to 55 Years of Age: Interim Report. *medRxiv*. 01. srpanj 2020.;2020.06.30.20142570.
96. McKay PF, Hu K, Blakney AK, Samnuan K, Brown JC, Penn R, i ostali. Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice. *Nat Commun [Internet]*. 09. srpanj 2020. [citirano 17. lipanj 2021.];11. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7347890/>

97. Tregoning JS, Russell RF, Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* 25. siječanj 2018.;14(3):550–64.
98. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity.* 29. listopad 2010.;33(4):492–503.
99. Diehl MC, Lee JC, Daniels SE, Tebas P, Khan AS, Giffear M, i ostali. Tolerability of intramuscular and intradermal delivery by CELLECTRA® adaptive constant current electroporation device in healthy volunteers. *Hum Vaccines Immunother.* 01. listopad 2013.;9(10):2246–52.
100. O’Neill LAJ, Netea MG. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? *Nat Rev Immunol.* 11. svibanj 2020.;1–3.
101. Gursel M, Gursel I. Is global BCG vaccination-induced trained immunity relevant to the progression of SARS-CoV-2 pandemic? *Allergy* [Internet]. 27. travanj 2020. [citirano 19. lipanj 2021.]; Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7267226/>
102. Marcec R, Majta M, Likic R. Will vaccination refusal prolong the war on SARS-CoV-2? *Postgrad Med J.* ožujak 2021.;97(1145):143–9.

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 15.6.1996. godine u Zagrebu. Od 2003. do 2011. godine pohađao sam Osnovnu školu Stenjevec u Zagrebu. Po završetku osnovne škole, upisao sam V. gimnaziju u Zagrebu prirodoslovno-matematičkoga usmjerenja, koju sam pohađao od 2011. do 2015. godine. Od 2015. godine studiram na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U akademskoj godini 2017./2018. dobio sam pohvalu za izvrsnost od strane Katedre za patofiziologiju. Od akademske godine 2018./2019. demonstrator sam kolegija Patofiziologije. Također, akademske godine 2018./2019. sudjelovao sam na međunarodnom natjecanju *Inter-Medical School Physiology Quiz (IMPSQ)* iz područja fiziologije zdravlja i bolesti u Jakarti, Indonezija. Od akademske godine 2019./2020. član sam predsjedništva Sekcije za patofiziologiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Akademske godine 2020./2021. sudjelovao sam u organizaciji Ljetne škole patofiziologije u Dubrovniku te sam sudjelovao u organizaciji prvog državnog natjecanja iz područja patofiziologije zdravlja i bolesti koje se održalo u sklopu ljetne škole.