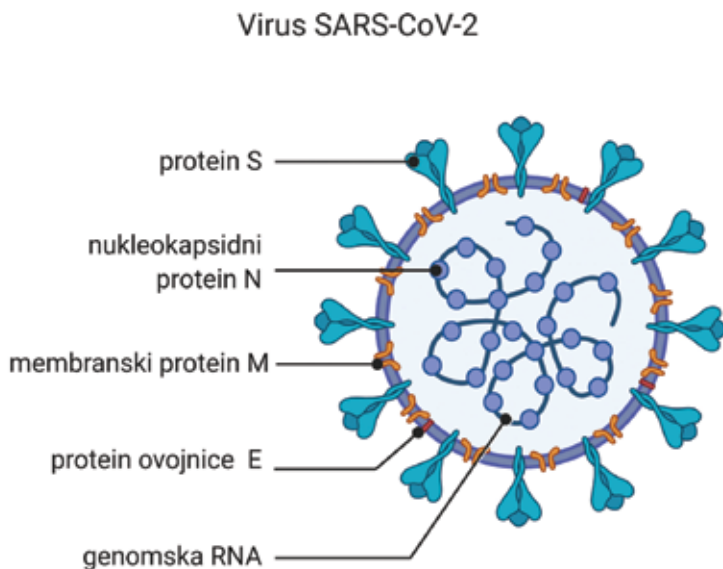


Načrtovanje cepiva proti koronavirusu SARS-CoV-2

Maja Blanc, Jan Hribernik, Nika Lovšin

Pandemična koronavirusna bolezen (covid-19, angleško *corona virus disease*) je nalezljiva bolezen, ki se je pojavila konec leta 2019 v Wuhanu na Kitajskem in se hitro razširila po celem svetu. Do sedaj se je okužilo že približno osem milijonov ljudi v 216 državah sveta, umrlo pa približno pol milijona ljudi (začetek junija leta 2020) (WHO, 2020). Bolezen covid-19 povzroča koronavirus 2 hudega akutnega respiratornega sindroma (SARS-CoV-2) (Zhu, Zhang, Wang, Li, Yang, Song in sod., 2020; Dhama, Sharun, Tiwari, Dardar, Malik, Singh in sod., 2020). Virus sodi v družino RNA-virusov *Coronaviridae*, v katero sodita tudi virusa hudega akutnega respiratornega sindroma (SARS-CoV-1, *Severe Acute Respiratory Syndrome*) in bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (MERS-CoV, *Middle Eastern Respiratory Syndrome*) (Zhu, Zhang, Wang, Li, Yang, Song in sod., 2020; Ahn, Shin, Kim, Lee, Kim, Myoung in sod., 2020; Guo, Cao, Hong, Tan, Chen, Jin in sod., 2020; Tay, Poh, Renia, MacAry, Ng, 2020; Wu, Zhao, Yu, Chen, Wang, Song in sod., 2020). Koronavirusi imajo lipidno ovojnico okoli enoverižne molekule RNA (slika 1). Bolniki, okuženi z virusom, lahko kažejo znake pljučnice, težko dihajo, suho kašljajo, kasneje imajo izcedek iz nosu in povišano telesno temperaturo. Precej pogosta tudi simptoma izgube vonja in okusa. Približno petina okuženih doživi po-

tek boleznini (Amanat, Krammer, 2020). Najbolj ogrožene skupine so starejši od šestdeset let in tisti s predhodnimi zdravstvenimi težavami in oslABLJENIM imunskim sistemom (raznimi kroničnimi in avtoimunskimi boleznimi). Pri njih so zapleti resnejši, pojavijo se lahko sindrom akutne dihalne stiske, sepsa in odpoved več organov (Ahn, Shin, Kim, Lee, Kim, Myoung in sod., 2020; Guo, Cao, Hong, Tan, Chen, Jin in sod., 2020; Amanat, Krammer, 2020). Inkubacijska doba naj bi bila povprečno šest dni. Virus se širi kapljično in je obstojen na številnih površinah od nekaj ur do več dni, kar omogoča naglo širjenje virusa. Za razliko od ostalih respiratornih virusov se SARS-CoV-2 zelo hitro širi, presenetljivo virus širijo tudi asimptomatski bolniki. Zaradi velike kužnosti (reprodukcijsko število virusa – število ljudi, ki jih okuženi posameznik okuži – je v povprečju 2,2) in visoke smrtnosti (število smrtnih primerov glede na potrjene okužbe) pomeni covid-19 veliko grožnjo človeštvu, zato je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) 11. marca leta 2020 razglasila pandemijo (WHO, 2020). Življenje se nam je s pojavom pandemije spremenilo in razvoj cepiva je nujno potreben.

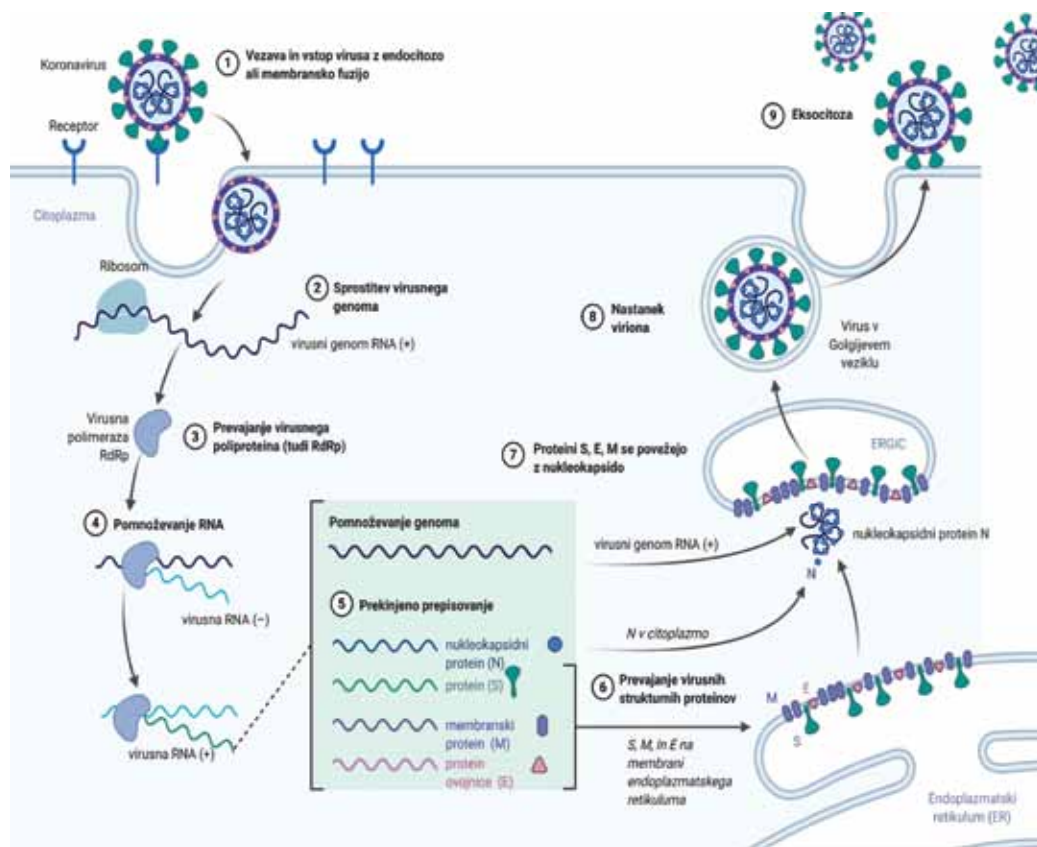


Slika 1: *Struktura viriona SARS-CoV-2.*

Koronavirus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je virus s pozitivno usmerjeno enoverižno RNA, ki jo obdaja lipidna ovojnica (slika 1). V lipidni ovojnici se nahajajo virusni proteini: protein ovojnice E, membranski protein M in strukturni površinski glikoprotein S. Zaradi površinskega proteina S (angleško *spike*, *S*) ima virus na površini izrastke, ki mu dajejo obliko krone (latinsko *corona*, krona). Protein S je sestavljen iz dveh podenot, S1 in S2. S1 je površinska podenota in je odgovorna za vezavo na gostiteljev receptor, medtem ko S2 predstavlja transmembransko podenoto, odgovorno za zlitje z gostiteljevo celico (Amanat, Kramer, 2020). Virusni genom predstavlja enoverižna RNA dolžine 30.000 nukleotidov. Virus za razmnoževanje nujno potrebuje gostiteljsko celico. Mehanizmi vstopa virusa v celice in nastanka novih virusov še zdaleč

niso dobro poznani, večino vemo na podlagi raziskav drugih koronavirusov. SARS-CoV-2 vstopi v gostiteljsko celico tako, da se s proteinom S veže na gostiteljev receptor za angiotenzinsko konvertazo 2 (ACE2), čemur sledi vnos v celico z endocitozo (slika 2, korak 1). Receptorji ACE2 so najpogostejši v pljučih, v respiratornem traktu, v nosu, nahajajo pa se tudi v drugih tkivih (Amanat, Kramer, 2020). Sledi zlitje virusne in celične membrane in vstop virusa v celico (slika 2, korak 2). Virusna RNA nosi zapis za virusne proteine, ki se sintetizirajo s pomočjo gostiteljevih prevajalnih mehanizmov (slika 2, korak 3). Najprej se sintetizira velik poliprotein, ki se razcepi na manjše polipeptide (Nsp1-16). Sintetizira se tudi virusni protein, imenovan od RNA odvisna RNA-polimeraza (angleško *RNA dependend RNA polimerase*, RdRp, Nsp12). To je encim, ki je lasten le virusom in ga drugi organizmi nimajo. Encim RdRp omogoča pomnožitev virusne RNA na osnovi matrice RNA. RdRp sintetizira negativno usmerjeno enoverižno RNA (-) (slika 2, korak 4),



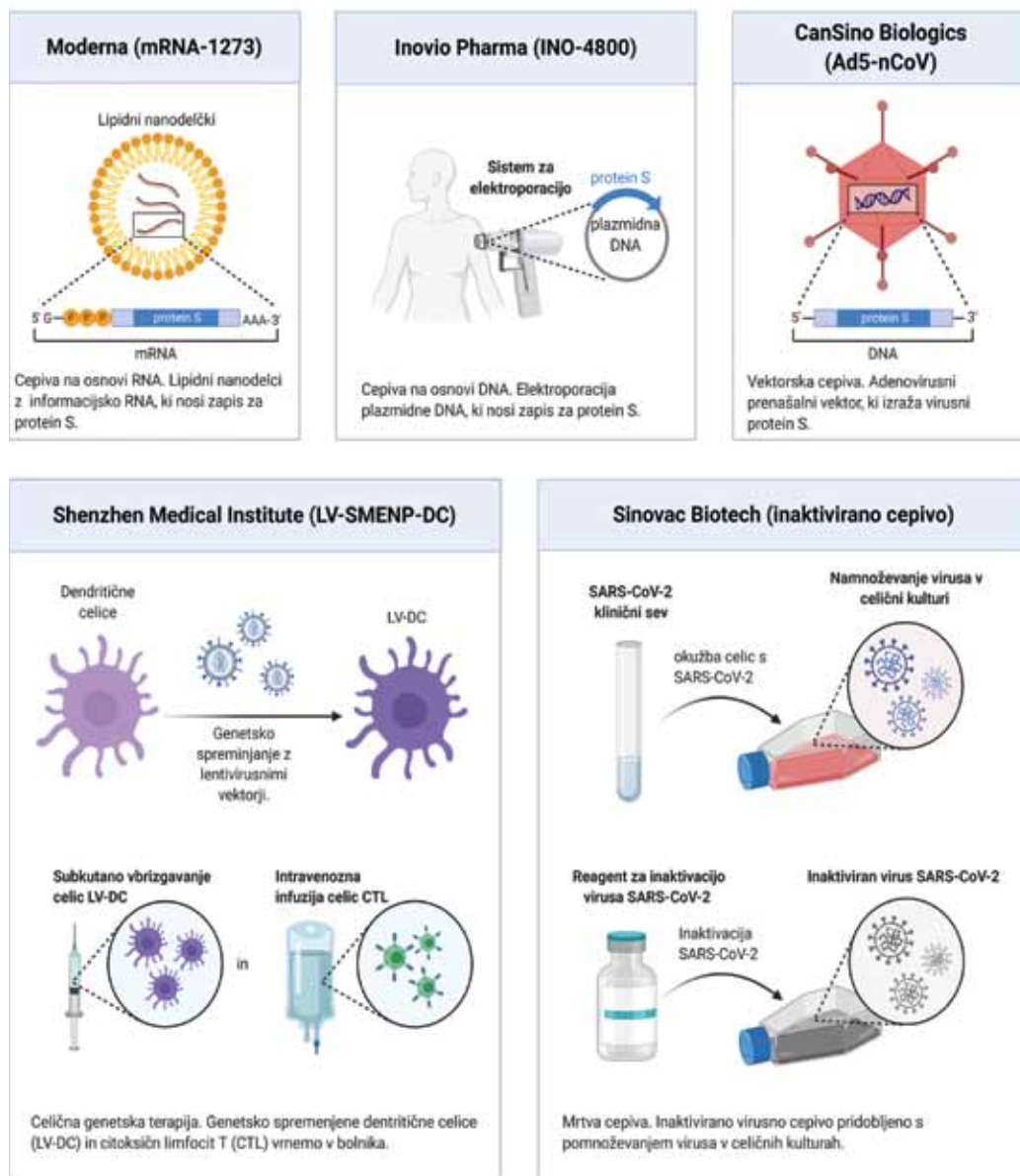
Slika 2: Replikacijski cikel virusa SARS-CoV-2. Za opis glej besedilo.

ki služi kot matrica za sintezo pozitivno usmerjene enoverižne genomske RNA (+) in informacijske RNA (+) (slika 2, korak 5). Sinteza virusnih proteinov iz informacijskih RNA poteka na ribosomih, ki so na zrnatem endoplazmatskem retikulumu (slika 2, korak 6). Nastali virusni proteini se vežejo na pozitivno usmerjeno virusno RNA (+) in skupaj potujejo do Golgijevega aparata (slika 2, korak 7). Ta obda novo nastale virusne proteine in RNA (+) v vezikel (slika 2, korak 8). Zreli virus se iz celice izloči z eksocitozo (slika 2, korak 9) (Tu, Chien, Yarmishyn, Lin, Luo, Lin in sod., 2020).

Cepiva

Najboljša rešitev za zamejitev virusne okužbe je razvoj cepiva, ki bo zaščitilo velik del populacije. Cepivo pri cepljenemu posamezniku izzove imunski odziv in oblikovanje imunskega spomina ter tako zaščiti organizem pred okužbo s specifičnim povzročiteljem bolezni. Ko je velik delež populacije precepljen, se ustavi veriga prenosa virusa in so pred okužbo zaščiteni tudi posamezniki, ki jih ne moremo cepiti. Cepiva vsebujejo antigene, snovi, ki sprožijo specifičen imunski odziv. Glede na pripravo cepiva razdelimo na živa (vsebujejo živi oslabljeni

Kandidatna cepiva proti SARS-CoV-2 v fazi kliničnega preskušanja



Slika 3: Kandidatna cepiva proti SARS-CoV-2 v fazi kliničnega preskušanja.

virus), mrtva (vsebujejo inaktivirani virus), vektorska (vsebujejo antigen, vnesen v prenašalni vektor, ki omogoča vnos v celice), cepiva na osnovi nukleinskih kislin (cepiva na osnovi RNA in DNA) in rekombinantna cepiva (vsebujejo rekombinantno pripravljene antigen) (slika 3).

Pri vektorskih cepivih je virusni genski zapis vstavljen v prenašalni vektor, ki služi za vnos virusnega zapisa v celice cepljenega posameznika. Prenášalni vektor je lahko kak drug virus (na primer adenovirus ali lentivirus). Vektorji so lahko spremenjeni tako, da se ne namnožujejo v gostiteljskih celicah, pri nekaterih pa je namnoževanje možno. Rekombinantna cepiva so cepiva, ki vsebujejo virusne proteine, pridobljene z biotehnološkimi postopki oziroma s tehnologijami rekombinantne DNA.

Ko pridobimo zelene antigene, jih po potrebi nadalje obdelamo (inaktiviramo, očistimo). V zadnjem koraku formuliramo končno obliko cepiva, kjer antigenu dodamo pomožne snovi, ki omogočijo njegovo ustrezno dostavo. Lahko dodamo tudi adjuvanse, snovi, ki same po sebi nimajo učinka, vendar okrepijo imunski odziv proti apliciranemu antigenu (Kraigher, Ihan, Avčič, 2011). Po predkliničnem vrednotenju cepiva sledijo tri stopnje kliničnega preskušanja. V prvi stopnji preverimo varnost cepiva na majhni homogeni skupini prostovoljcev. V drugi stopnji preverimo imunogenost cepiva in optimalni odmerek cepiva. V tretji klinični stopnji pa na nekaj tisoč prostovoljcev preverimo učinkovitost cepljenja ob spremljanju neželenih učinkov.

Načrtovanje cepiva proti SARS-CoV-2

Pri načrtovanju cepiva proti SARS-CoV-2 si znanstveniki pomagajo z znanjem o drugih beta-koronavirusih in poznavanjem virusnega genoma. S predhodnimi raziskavami

kandidatnih cepiv proti SARS-CoV-1 in MERS-CoV so hitro opredelili strukturalni protein S kot idealni antigen. Cepivo s proteinom S izzove v organizmu nastanek protiteles proti proteinu S. Ob okužbi se protitelesa proti proteinu S vežejo na virusni protein S in s tem preprečijo vezavo na gostiteljev receptor ACE2 in onemogočijo vstop virusa v celice (Ahn, Shin, Kim, Lee, Kim, Myoung in sod., 2020). Po izbruhu SARS-CoV-1 leta 2020 je bilo razvitih veliko kandidatnih cepiv proti SARS-CoV-1. Med njimi so rekombinantna cepiva na osnovi proteina S, živa, mrtva in vektorska cepiva. Pri študijah na živalskih modelih so se mnoga pokazala za učinkovita, vendar je prišlo do določenih zadržkov. V nekaterih primerih je cepljenje z živim virusom pripeljalo do resnih zapletov, pri nekaterih primerih pa je prišlo do pojave okrepljene oblike bolezni. Le redka kandidatna cepiva proti SARS-CoV-1 so vstopila v prvo fazo kliničnih raziskav, saj je prej prišlo do odstranitve virusa iz človeške populacije. Še vedno pa so rezultati raziskav cepiv, osnovanih na proteinu S, optimistični, saj so se cepiva pokazala za varna in so izzvala ustrezen imunski odziv.

Pri razvoju učinkovitega cepiva je treba upoštevati tudi možnost upada protitelesnega odziva, saj okužbe s koronavirusom včasih ne izzovejo dolgoročne imunosti. Pri ljudeh, ki so preboleli SARS-CoV-1 ali MERS-CoV, je pogosto prišlo do zmanjšanega imunskega odgovora v roku dveh ali treh let po okužbi. Ker SARS-CoV-2 povzroča resno obliko bolezni predvsem pri starejših, je pomembno, da bo cepivo zaščitilo tudi to populacijo. Problem se pojavi pri starejših posameznikih, ki na cepivo ne bi imeli ugodnega odziva zaradi oslabiljenega oziroma staranega imunskega odziva. Pri cepivih proti virusu gripe to rešujejo s spremenjeno sestavo cepiva za starejšo populacijo, ki vse-

buje več antigena ali pa ima dodane snovi, ki antigenu okrepijo imunogenost. V primeru, da bo novo cepivo ščitilo le predstavnike mlajših generacij, bo njihova precepljenost zagotovila tudi posredno zaščito starejših. Razvoja cepiva so se lotili z najrazličnejšimi pristopi. Poleg razvoja klasičnih oblik cepiv (živih in mrtvih cepiv, rekombinantnih cepiv) so za razvoj cepiva proti SARS-CoV-2 značilni novejši pristopi, za katere še ne obstaja ustaljena proizvodna infrastruktura. Med novejše oblike cepiv sodijo cepiva na osnovi RNA in DNA ter vektorska cepiva (Ahn, Shin, Kim, Lee, Kim, Myoung in sod., 2020; Amanat, Krammer, 2020).

Prednosti in slabosti različnih pristopov pri razvoju cepiv

Prednost uporabe klasičnih pristopov pri razvoju cepiv (živa, mrtva cepiva) sta že vzpostavljeni proces in infrastruktura z že registriranimi cepivi. Slaba stran klasičnih cepiv pa je delo z virulentno obliko virusa, ki zahteva visoko stopnjo previdnosti in zaščite. Delu z infektivnimi virusi se izognemo pri pripravi novejših oblik cepiv na osnovi nukleinskih kislin, rekombinantnih in vektorskih cepiv. Cepiva na osnovi DNA imajo prednost, da jih lahko enostavno in hitro pripravimo v velikem obsegu, nizka cena proizvodnje in visoka temperaturna stabilnost. Poleg tega je bil ta tip cepiva že testiran na ljudeh pri raziskavah kandidatnih cepiv proti SARS-CoV-1. Slabost cepiv na osnovi DNA je, da jih je treba v organizem vbrižgati s posebnimi napravami. Cepiva na osnovi RNA imajo prav tako možnost hitre produkcije in tipično zagotavljajo ustrezen imunski odziv. Do zadržkov prihaja zaradi pojava reaktogenosti (pojava rdečine, bolečine na mestu aplikacije cepiva). Vektorska cepiva kažejo dobre predklinične in klinične rezultate pri mnogih cepivih proti virusom, med njimi tudi proti MERS-CoV. Njihova

slabost je možni pojav neučinkovitosti cepiva v primeru napačne izbire vektorja, saj lahko s svojo imuniteto zmanjša učinkovitost. Prednost rekombinantnih cepiv je visoka varnost cepiva, saj se izognemo rokovanju z visoko infektivnim virusom (Ahn, Shin, Kim, Lee, Kim, Myoung in sod., 2020).

Cepiva proti SARS-Cov-2 v kliničnem preskušanju

Zaradi velikega vpliva pandemije na življenje ljudi - zdravstveno in gospodarsko stanje - so znanstveniki začeli s pospešenim razvojem cepiv. Usklajevanje razvoja cepiva je prevzela človekoljubna Koalicija za inovacije na področju pripravljenosti na epidemije (*The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, CEPI*) (Thanh Le, Andreadakis, Kumar, Gomez Roman, Tollefsen, Saville in sod., 2020; Yamey, Schaferhoff, Hatchett, Pate, Zhao, McDade, 2020). Trenutno (maja leta 2020) poteka razvoj 115 cepiv, od tega jih je 73 v predklinični, 10 pa v klinični fazi (slika 3).

Kot prvo cepivo je marca leta 2020 vstopilo v klinično fazo preskušanja cepivo na osnovi RNA, ki so ga razvili v podjetju *Moderna* v Seattlu v Združenih državah Amerike. V cepivu mRNA-1273 je informacijska RNA, ki nosi zapis za virusni protein S. Informacijska RNA je obdana z lipidnimi nanodelci, kar omogoča lažji vnos cepiva v celice (Amanat, Krammer, 2020). Marca leta 2020 so prav tako začeli zbirati prostovoljce za preizkus varnosti vektorskega adenovirusnega cepiva Ad5-nCoV, ki je bilo razvito na Kitajskem. Vektorsko cepivo Ad5-nCoV, ki nosi zapis za virusni protein S, je že vstopilo v fazo kliničnega preskušanja. Podobno cepivo so pripravili na Univerzi v Oxfordu v sodelovanju s podjetjem *AstraZeneca* (cepivo ChAdOx1 nCoV-19) in že začeli s kliničnim preskušanjem. V fazi kliničnega

preskušanja je tudi cepivo, ki je namenjeno zdravljenju aktivno okuženih bolnikov s covid-19. Cepivo temelji na genskem oziroma celičnem zdravljenju in so ga prav tako razvili na Kitajskem. Bolnikom s covid-19 vzamejo imunske celice antigen predstavivne celice (APC) ter jih v laboratoriju gensko spremenijo tako, da vanje vnesejo minigene virusnih strukturnih proteinov in humane imunomodulatorne gene. Gensko spremenjene celice APC vrnejo bolnikom, kjer pride do ustreznega imunskega odziva proti virusu (Thanh Le, Andreadakis, Kumar, Gomez Roman, Tollefsen, Saville in sod., 2020). Drugačen pristop pa so izbrali v kitajskem podjetju *Inovio Pharmaceuticals*, kjer so razvili cepivo na osnovi DNA INO-4800. Pri cepivu na osnovi DNA je zapis za virusni protein vstavljen v vektorsko molekulo, imenovano plazmidna DNA. Cepivo na osnovi DNA bodisi vbrizgamo neposredno v mišico ali podkožje, bistveno učinkovitejši pristop pa je vnos DNA z elektroporacijo. Elektroporacija je metoda, pri kateri s pomočjo električnega pulza povzročimo odprtje celičnih por, kar omogoči cepivu neposreden prehod v celice cepljenega posameznika in močan imunski odziv. Obetavna cepiva predstavljajo rekombinantna cepiva. Najpogosteje kot antigen pridobivajo virusni protein S. Rekombinantna cepiva izzovejo tvorbo protiteles, ki se ob okužbi vežejo na virusni protein S in preprečijo vezavo virusa na gostiteljev receptor ACE2. Rekombinantna cepiva v klinični fazi preskušanja imajo v podjetju *Clover Biopharmaceuticals/CEPI* in v podjetju *Noovavax/CEPI* (Thanh Le, Andreadakis, Kumar, Gomez Roman, Tollefsen, Saville in sod., 2020).

Praden bo na trg vstopilo varno, kakovostno in učinkovito cepivo proti SARS-CoV-2, bo potrebnih še vsaj dvanajst do osemnajst mesecev. To bo pomenilo veliko spremembo v časovnem poteku razvoja cepiv, ki običajno

traja deset let. Zagotovo bo razvitih več vrst cepiv z različno učinkovitostjo in primernostjo za cepljenje posameznih skupin ljudi. Nedvomno pa bodo cepiva pred vstopom na trg morala prestat temeljita klinična preskušanja.

Literatura:

- Abn, D. G., Shin, H. J., Kim, M. H., Lee, S., Kim, H. S., Myoung, J., in sod., 2020: *Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30 (3): 313-324.
- Amanat, F., Krammer, F., 2020: *SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report*. *Immunity*, 52 (4): 583-589.
- Dhama, K., Sbarun, K., Tiwari, R., Dadar, M., Malik, Y. S., Singh, K. P., in sod., 2020: *COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics*. *Human Vaccines & Immunotherapeutic*, 1-7.
- Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., in sod., 2020: *The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status*. *Military Medical Research*, 7 (1): 11.
- Kraigher, A., Iban, A., Avčin, T., 2011: *Cepljenje in cepiva – dobre prakse varnega cepljenja*. Ljubljana: Sekcija za preventivno medicino SZD, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe, SZD Inštitut za varovanje zdravja RS.
- Tay, M. Z., Pob, C. M., Renia, L., MacAry, P. A., Ng, L. F. P., 2020: *The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention*. *Nature Reviews Immunology*.
- Thanh Le, T., Andreadakis, Z., Kumar, A., Gomez Roman, R., Tollefsen, S., Saville, M., in sod., 2020: *The COVID-19 vaccine development landscape*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19 (5): 305-306.
- Tu, Y. F., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., in sod., 2020: *A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (7).
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., in sod., 2020: *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019*. *The New England Journal of Medicine*, 382 (8): 727-733.
- WHO. *Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines*. April 20, 2020.
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., in sod., 2020: *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China*. *Nature*, 579 (7798): 265-269.

Yamey, G., Schaferhoff, M., Hatchett, R., Pate, M., Zhao, F., McDade, K. K., 2020: Ensuring global access to COVID-19 vaccines. Lancet, 395 (10234): 1405-1406.

Zabvala

Maja Blanc in Jan Hribernik se zabvaljujeta mentorici doc. dr. Mariji Niki Lovšin, univ. dipl. kem. Brez njene pomoči prispevka ne bi bilo mogoče napisati in objaviti.



Maja Blanc je 22-letna študentka tretjega letnika Fakultete za farmacijo na Univerzi v Ljubljani. Že od nekdaj jo je zanimalo naravoslovje, med študijem pa sta jo posebej pritegnili biotehnologija in imunologija.

Doc. dr. Nika Lovšin je doktorirala na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani s področja biokemije in molekularne biologije. Podoktorsko je raziskovala interakcije med virusi in gostiteljevi proteini na Kalifornijski univerzi v San Franciscu (UCSF) v Združenih državah Amerike in kot gostujoča znanstvenica na Weizmannovem znanstvenem inštitutu v Rehovotu v Izraelu. Pedagoško in raziskovalno je delovala na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in na Univerzi v Novi Gorici. Sedaj se na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani ukvarja z raziskovanjem molekularnih mehanizmov nastanka bolezni (kostnih bolezni, raka, covid-19), toksičnostjo nanodelcev in funkcijskim vrednotenjem genov. Izsledki njenih raziskav so objavljeni v odličnih revijah (tudi reviji Nature).



Jan Hribernik, rojen julija leta 1997 v Celju, je študent tretjega letnika Fakultete za farmacijo na Univerzi v Ljubljani. Kot gimnazijca ga je predvsem zanimala kemija, med študijem pa ga je pritegnila imunologija. V prostem času je športni navdušenec, je tudi član fakultetne odbojbarske in nogometne reprezentance, prav tako pa rad potuje in spoznava naravne lepote sveta.