

Odkritje, ki je omogočilo hiter razvoj cepiv proti COVID-19: ob Nobelovi nagradi za medicino 2023

Radovan Komel

V današnji globalno povezani družbi je tveganje novih pandemij večje kot kadarkoli prej. Pandemije, hitro širjenje nalezljivih bolezni po več celinah oziroma po vsem svetu, običajno povzročajo patogeni dejavniki, kot so glivice, bakterije, virusi, paraziti, ki prečkajo vrstno oviro iz prenašalca živali v človeka in se širijo kapljično, z aerosolom, kar povzroča okužbe dihalnih poti, z uživanjem okuženih živil ali z neposrednim dotikom. Razvijanje in uvajanje cepiv, dovolj hitro za ublažitev pandemije, ki bi lahko povzročila zastoj svetovnega gospodarstva in velike družbene spremembe, sta bili ogromen izziv, s katerim se pred pandemijo COVID-19 še nismo srečali. Ko se je konec leta 2019 pojavil virus SARS-CoV-2 in se hitro razširil po vsem svetu, si je le malokdo mislil, da bi lahko pravočasno razvili cepiva, s katerimi bi bilo mogoče bolezen zaustaviti in omejiti njene posledice.



Katalin Karikó,

rojena 17. januarja leta 1955 v mestu Szolnok na Madžarskem, je madžarsko-ameriška biokemičarka, specializirana za preučevanje molekularnih mehanizmov, posredovanih z ribonukleinsko kislino, zlasti z in vitro prepisano sporočilno RNA, za uporabo v proteinskem nadomestnem zdravljenju. Je članica Univerze Szeged v Szegedu na Madžarskem in hkrati tudi Univerze Pensilvanije v Filadelfiji v Združenih državah Amerike.

Drew Weissman,

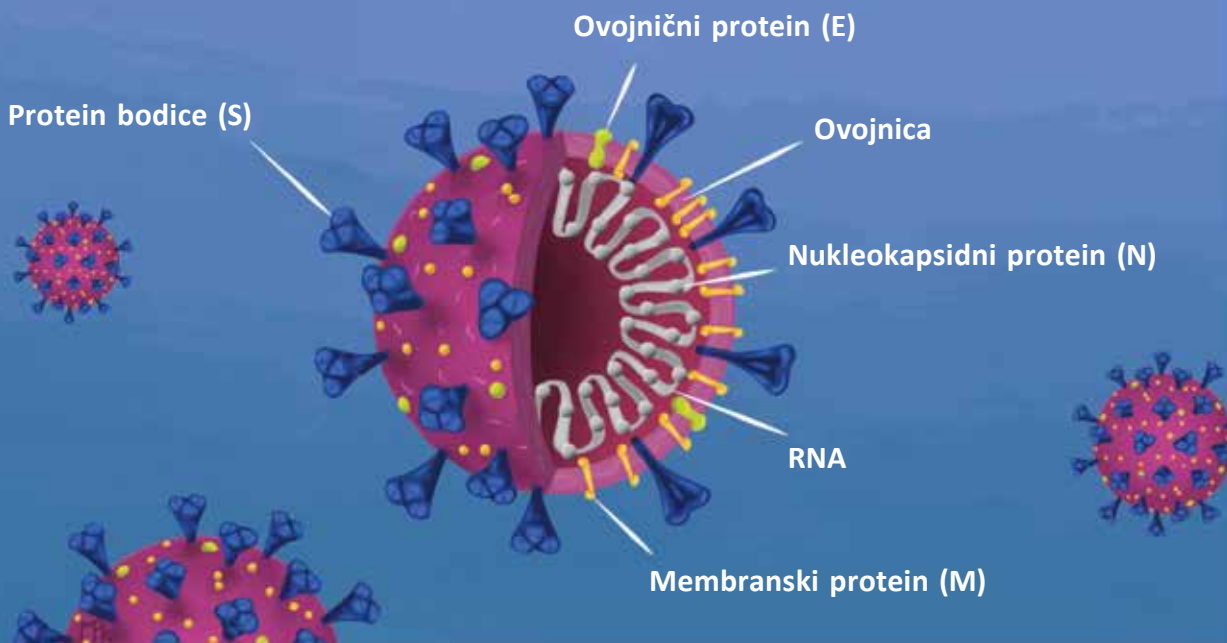
rojen 7. septembra leta 1959 v mestu Lexington v zvezni državi Massachusetts v Združenih državah Amerike, je ameriški zdravnik in imunolog, znan po svojih prispevkih v molekularni biologiji RNA. Je nosilni raziskovalec za raziskave cepiv in direktor Inštituta za inovacije RNA in hkrati tudi profesor na Medicinski fakulteti Perelman na Univerzi v Pensilvaniji v Združenih državah Amerike.

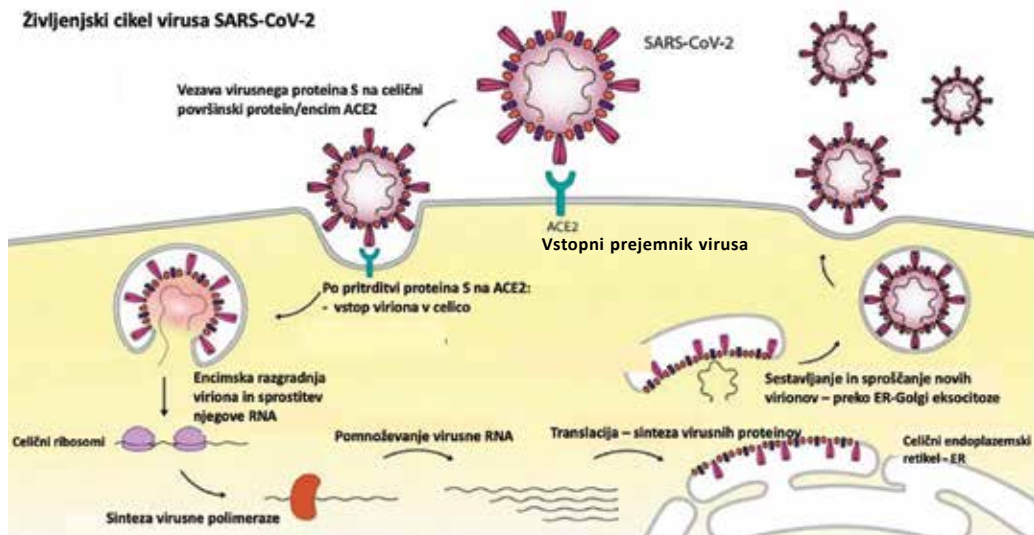
Virus SARS-CoV-2, poimenovan »koronavirus sindroma akutne respiratorne stiske 2« ali kratko kar »koronavirus«, je bil prvič odkrit v izbruhu v kitajskem mestu Wuhan decembra leta 2019 in se je v začetku leta 2020 razširil na druga območja Azije in nato po vsem svetu. Virus, ki povzroča koronavirusno bolezen, COVID-2019 oziroma COVID-19, se najpogosteje širi po zraku v drobnih kapljicah med ljudmi v tesnem stiku in povzroča bolj ali manj resne okužbe dihal, pri starejših odraslih in ljudeh z določenimi zdravstvenimi težavami pa lahko povzroči potrebo po bolnišnični oskrbi ali celo smrt. Zaradi širjenja bolezni je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) 30. januarja leta 2020 virusni izbruh razglasila za javnozdravstveno nevarnost mednarodnega pomena in, v nadaljevanju, samo bolezen za javnozdravstveno krizo mednarodnih razsežnosti. Do preklica te izjave je prišlo šele 5. maja leta 2023, vendar je pandemija do konca februarja leta 2024 povzročila več kot

sedem milijonov potrjenih smrti, kar jo uvršča na peto mesto na seznamu najbolj smrtonosnih epidemij oziroma pandemij v zgodovini. Na seznamu epidemij in pandemij z najmanj enim milijonom smrti si tako deli neslavno mesto z boleznimi, kot so bubonska kuga, črne koze, (španska, hongkonška) gripa, kolera, tifus in AIDS.

Tako kot drugi koronavirusi ima tudi virusni delec (virion) SARS-CoV-2 štiri strukturne beljakovine, poznane kot S (protein bodice oziroma konice, angleško *spike* - S), E (protein ovojnice, angleško *envelope* - E), M (protein membrane - M) in N (protein nukleokapside - N). Protein N obdaja in vzdržuje zgradbo/obliko virusnega RNA-genoma, proteini S, E in M pa skupaj tvorijo virusno ovojnico. Koničasti izrastek oziroma bodica je odgovorna za to, da se virus lahko pritrdi na membrano gostiteljeve celice. Potem ko se virion SARS-CoV-2 pritrdi na ciljno celico, celični encim razgradi protein bodice in virion nato v celico sprosti svojo

Prirrejeno po: J. Tseng: *Adgene Blog*, 12. 7. 2021.





Prirjeno po: J. Fu, 2020: *Molecular Biology Reports*, 47 (6): 4383–4392.

RNA in jo prisili, da ustvarja kopije virusa, ki se potem širijo v sosednje celice.

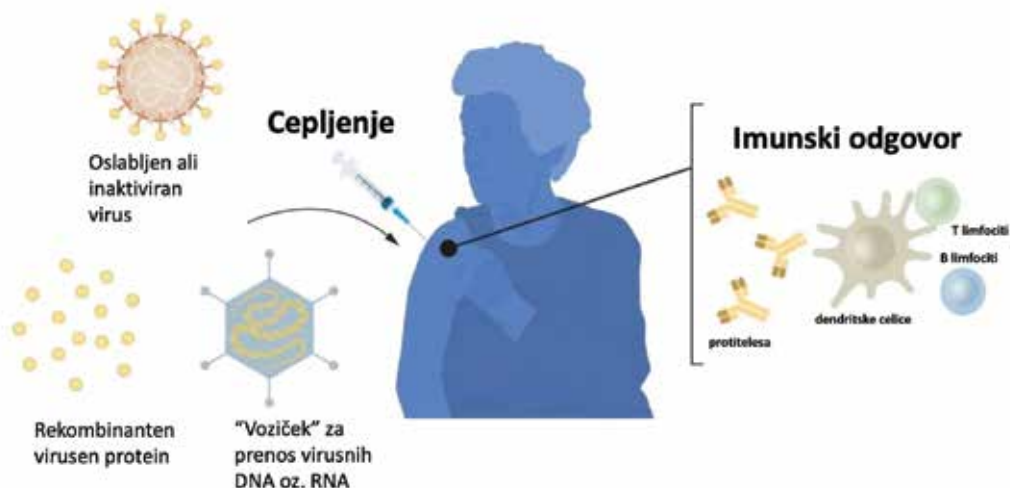
Neomejeno širjenje porajajočega se virusa v novem gostitelju ima navadno za posledico nabiranje mutacij v virusnem genomu, to pa pojav novih virusnih različic. Poseben problem so podaljšane, dolgotrajne okužbe s SARS-CoV-2 pri bolnikih z oslabiljenim imunskim sistemom. Te lahko povzročijo nastanek virusnih različic z mutacijami, ki virusom omogočajo, da se izognejo imunosti gostitelja. Virus SARS-CoV-2 mutira v povprečju enkrat ali dvakrat na mesec, kar je sicer manj kot virus gripe, vendar če je hkrati okuženih zelo veliko ljudi, to pomeni veliko naključnih mutacij, med katerimi se, sicer redko, lahko pojavijo tudi takšne, ki so za virus koristne. Najbolj skrb vzbujajoče so mutacije, ki povzročijo aminokislinske spremembe v zgradbi in s tem v obliki bodičastega proteina S. Že malenkostno spremenjena oblika tega proteina virusu lahko omogoči, da se bolj učinkovito veže na sprejemno mesto na človeških celicah in tako lažje oziroma pogosteje vstopa v celice. To pomeni, da je ta različica bolj kužna

kot virusi, ki take mutacije nimajo. Dodatna težava je, da sprememba v zgradbi proteina S lahko oteži tudi vezavo že obstoječih protiteles, ki jih je imunski sistem razvil med okužbo s starejšimi različicami virusa in ki sicer virus inaktivirajo s tem, da se vežejo na mesto, s katerim se virus pritrdi na celico.

S cepivi in cepljenjem pomagamo ljudem, da se obranijo pred okužbo

Obrambo telesa na virusno okužbo v glavnem delimo v tri dele: (A) izločanje citokinov, sporočevalnih molekul, ki v napadenih celicah sprožijo procese proti pomnoževanju virusne RNA in razmnoževanju virusa ter spodbudijo imunski odziv; (B) ubijanje z virusom okuženih celic z naravnimi celicami ubijalkami (vrste belih krvničk, NK – angleško *natural killer cells*) in citotoksičnimi levkociti (CTL); (C) preprečevanje sposobnosti virusa, da okuži (nove) celice, z nevtralizirajočimi protitelesi. Te tri dele lahko povzamemo kot prirojeno in prilagoditveno imunost.

Pri virusnih okužbah naj bi *prirojeni imunski sistem* gostitelja deloval kot prva obrambna



Prirajeno po: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023>.

črta za preprečevanje virusne invazije ali podvojevanja, preden prilagoditveni imunski sistem ne ustvari bolj posebne zaščite. V prirojenem imunskem odzivu se prirojeni receptorji imunskih celic za prepoznavanje vzorcev molekul vključijo v zaznavanje značilnih virusnih sestavin, kot so virusna RNA ali DNA ali vmesni produkti v sestavljanju novih enot virusa, ter v spodbujanje interferonov in drugih protivnetnih citokinov v okuženih in v imunskih celicah.

Prilagoditveni (adaptivni) imunski odziv pa je za tujek (antigen) poseben imunski odziv, ki se razvije v nekaj dneh ali tednih. Začetni dogodek pri vzbuditvi adaptivnega imunskega odziva je aktivacija še nespecifičnih, »naivnih« T-celic (T-limfocitov) s predstavitvijo antigena. Specifično usposobljene celice T so neposredni borci proti tujim napadalcem (*celična imunost*), hkrati pa tudi proizvajajo citokine, ki pomagajo aktivirati druge dele imunskega sistema, predvsem B-limfocite, proizvajalce proti tujku usmerjenih, specifičnih protiteles (*humoralna, s protitelesi posredovana imunost*).

Cepljenje je dajanje cepiva, ki pomaga imunskemu sistemu razviti odpornost proti

bolezni. Cepiva vsebujejo mikroorganizem oziroma virus v živem, oslABLJENEM ali mrtvem stanju ali beljakovine ali toksine iz patogenih organizmov. Z dodajanjem izbrane oblike omenjenih imunogenov umetno spodbudimo prilagoditveno telesno imunost (imunizacija) in pomagamo preprečiti zbolevanje zaradi nalezljive bolezni. Ko je cepljen dovolj velik odstotek populacije, pride do tako imenovane *čredne imunosti*. Čredna imunost varuje tiste, ki so lahko imunsko oslABLJENI in ne morejo dobiti cepiva, ker bi jim lahko celo oslABLJENA različica škodovala. Večina **protivirusnih cepiv**, ki so danes na voljo, se proizvajajo s tradicionalnimi tehnikami, ki temeljijo na oslABLJENIH ali INAKTIVIRANIH celih virusih. OslABLJENE virusne seve pridobimo z dolgotrajnim gojenjem v razmerah, ki postopoma oslABLJajo oziroma onemogočijo njihove virulentne lastnosti, v novejšem času pa tudi z laboratorijskim odstranjevanjem virulentnih genov oziroma njihovih delov. V nekaterih primerih so živa cepiva razvili tudi z uporabo sorodnih, tesno povezanih, vendar manj nevarnih virusov, ki tudi lahko ustvarijo širok imunski odziv. Nekatera cepiva pa vsebujejo inakti-

Trije glavni pristopi za izdelavo cepiva



Uporaba celega virusa
ali bakterije, ...



... delov, ki sprožijo
imunski system, ...



... ali samo
genetskega materiala.

virane virulentne viruse, ki so bili uničeni s kemikalijami, toploto ali sevanjem in pri katerih se je zato ohranila samo ovojnica z izpostavljenimi prepoznavnimi proteini.

Zaradi napredka molekularne biologije v zadnjih desetletjih so bila razvita tako imenovana *podenotna cepiva*, ki temeljijo na posameznih virusnih sestavnih delih namesto na celih virusih. Za razvoj cepiv pomembni sestavni deli virusa, ki izzovejo naš imunski odziv in spodbujajo tvorbo protiteles, ki onemogočajo virus, so prepoznavni proteini na površini virusa. Površinske beljakovine so v začetku pridobivali iz krvnega seruma kronično okuženih bolnikov. Da bi zagotovili dovolj velike količine in čistost, za njihovo proizvodnjo danes večinoma uporabljamo postopke genske tehnologije (gensko inženirstvo): takim proteinom rečemo »rekombinantni proteini«. Sestavne dele virusne genetske kode (gene), ki kodirajo virusne površinske proteine, vnesemo v proizvodne organizme, kot so bakterije, kvasovke ali celice celičnih kultur, jih v novem okolju pomnožimo in spodbudimo, da se izrazijo v obliki proizvodnje velikih količin zelenih proteinov. Po zahtevnih postopkih čiščenja te, za primerno dostavo oblikovane proteine uporabimo kot cepiva.

Proizvodnja cepiv na podlagi celih virusov ali njihovih sestavnih proteinov pa zahteva obsežne celične kulture in dolgotrajne postopke. Proces, ki je finančno, infrastrukturno in časovno zahteven, omejuje možnosti za hitro proizvodnjo cepiva kot odgovor na izbruh in pandemijo. Zato so raziskovalci poskušali razviti tehnologije za razvoj cepiv, ki so neodvisne od celičnih kultur. Pojavila se je zamisel, da bi kot cepivo lahko uporabili kar genetski material (nukleinske kisline) virusov, ki bi jih neposredno vnesli v organizem cepljene osebe in izkoristili njegovo zmožnost, da sam na licu mesta proizvede virusne proteine in »sam v sebi« izzove ustrezen protivirusen imunski odziv.

Nastopilo je obdobje tako imenovanih »genetskih cepiv«

V naših celicah se genetske informacije, kodirane v DNA, prepisujejo v sporočilno RNA (angleško *messenger RNA*, *mRNA*), ki se uporablja kot predloga za proizvodnjo beljakovin. Pri virusih, katerih genom je dvovezična molekula DNA, se za prepis izrablja gostiteljjev encim RNA-polimeraza in v nadaljevanju njegov celični sistem za prevod tega prepisa v ustrezne (virusne) proteine. Pri virusih, katerih genom je enovezična

molekula DNA, pa sta v začetni proces vključena dva gostiteljeva encima, DNA-polimeraza, ki ustvari dvoverižno DNA, in nato še že omenjena RNA-polimeraza. V nasprotju z DNA-virusi pa je genom RNA-virusov sestavljen iz ribonukleinske kisline, enoverižne ali dvoverižne RNA. Ti virusi so povzročitelji pomembnih bolezni pri ljudeh, kot so prehlad, gripa, SARS, MERS, virus denge, hepatitis C, hepatitis E, mrzlica Zahodnega Nila, bolezen virusa ebole, steklina, otroška paraliza, mumps, ošpice in tudi COVID-19.

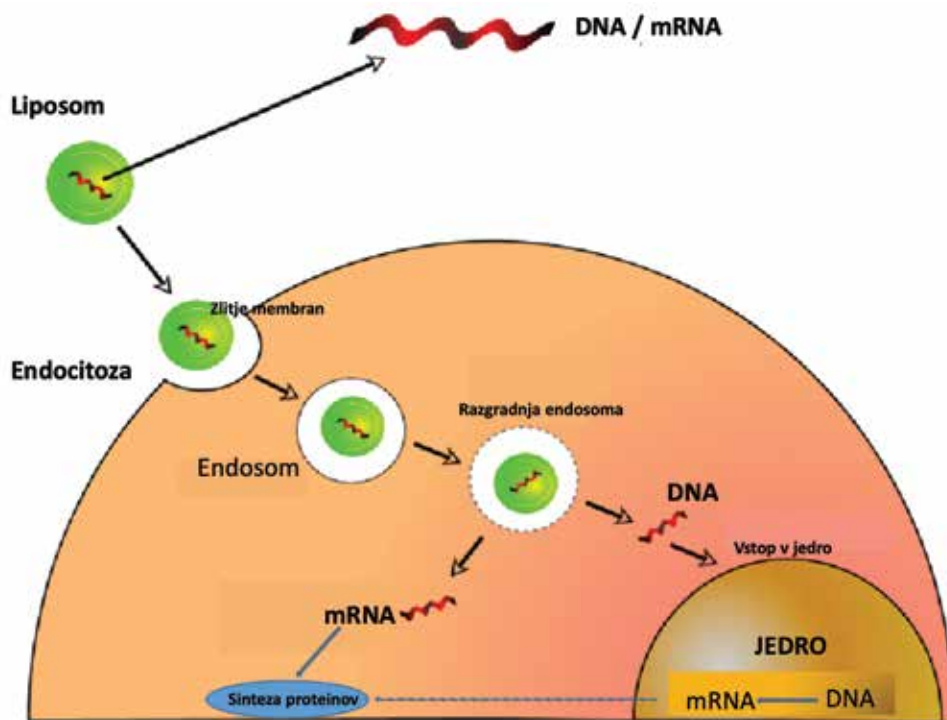
Skupina genetskih cepiv zajema virusna vektorska cepiva, DNA-cepiva in RNA-cepiva. Pri njihovem sestavljanju dele virusne genetske kode premaknemo v neškodljiv prenašalec, »voziček« ali »vektor«. Pri *virusnih vektorskih cepivih* je tak vektor nek razmeroma varen virus, na primer inaktiviran virus prehlada, ki zlahka vstopa v naše ciljne celice in je tako učinkovit prenašalec želenega antigena, sam pa se ne more razmnoževati ali povzročati prehladno bolezen. Ko vbrizgamo vektorsko cepivo, se v naših celicah s pomočjo celične mašinerije za sintezo proteinov iz njegove sestave proizvaja samo izbrani protein patogenega virusa, ki v nadaljevanju v telesu spodbudi proti njemu usmerjen imunski odziv. Za razliko od tega *DNA-cepivo* kot »voziček« uporablja plazmid, umetno sestavljeno majhno molekulo DNA, ki jo običajno v genskem inženirstvu uporabljajo za prenos delcev DNA oziroma genov med izvornimi in proizvodnimi organizmi, v tem primeru pa vanj vnesemo DNA (gen), ki kodira antigenski protein, ki izvira iz patogenega virusa, na katerega bo cepivo usmerjeno. Plazmidna DNA je poceni, obstojna in razmeroma varna, zaradi česar je odlična možnost za dostavo DNA-cepiva, DNA-cepivo je v taki obliki zelo obstojno in ga odlikujeta odsotnost kakršnega koli povzročitelja okužbe in razmeroma enostavna proizvodnja v velikem obsegu. DNA-cepiva imajo še eno odliko: so zelo prilagodljiva, saj je gensko zaporedje mo-

goče enostavno spreminjati in s tem dovolj hitro ustvarjati še bolj učinkovite različice cepiv. Povsem novo in neposredno obliko cepiv pa predstavljajo *RNA-cepiva* (mRNA-cepiva), ki so sestavljena iz ribonukleinske kisline, RNA, zapakirane v posebne »vozičke«, kot so lipidne kapljice, umetno sestavljeni lipidni nanodelci, imenovani liposomi.

Od prepričanja o neobstojni RNA do uspešnih RNA-cepiv

Sprva so kot bolj obetavna obravnavali cepiva, izdelana na osnovi DNA, saj je DNA mnogo bolj obstojna kot RNA. V telo vnesena DNA sicer mora prestopiti dve pregradi, celično in jedrno membrano, da doseže celični predel, kjer poteka prepis DNA v sporočilno mRNA, kar pa zahteva razvoj razmeroma zapletenih dostavnih sistemov. Dodatna skrb je mogoča, sicer majhna možnost, da se dostavljena nukleinska kislina obstojno integrira v genom gostitelja, kar je pomemben varnostni vidik pri razvoju teh cepiv. Nasprotno bi mRNA-cepiva potrebovala le dostop do celične citoplazme, kjer neposredno pride do prevoda sporočila, zaporedja nukleotidov, v zaporedje aminokislin proteina. Dodatna prednost mRNA-cepiv bi bila, da se dostavljena nukleinska kislina ne more integrirati v genom gostitelja. Kljub vsem tem prednostim pa so pomisleki glede uporabnosti RNA za razvoj cepiv ostali veliki, predvsem zaradi njene (pre)velike neobstočnosti.

Odkritje laboratorijskega prepisovanja zaporedja nukleotidov DNA v zaporedje mRNA, imenovano *prepisovanje in vitro*, je v osemdesetih letih preteklega stoletja omogočilo proizvodnjo velikih količin mRNA brez potrebe po obsežnih celičnih kulturah. S tem je RNA postala dostopna za neposredno uporabo v klinične namene. Vendar, kot rečeno, je *in vitro* prepisana mRNA veljala za neobstojno in zahtevno za dostavo, kar je zahtevalo razvoj zelo izpopolnjenih/sofisticiranih nosilnih lipidnih sistemov. Poleg tega se je pokazalo, da je *in vitro* proizvedena



mRNA po neposrednem vnosu v telo v številnih primerih povzročila neželene vnetne reakcije. Do pomembnega preloma je prišlo z odkritjem majhnih, celičnih membran podobnih veziklov, umetnih liposomov, sestavljenih iz različnih fosfolipidov in holesterola. S sintetiziranimi kationskimi lipidi so uspeli sestaviti obstojne liposome in vanje vgraditi negativno nabite nukleinske kisline, jih tako zaščititi pred prezgodnjo razgradnjo in jih prenesti do celične membrane, s katero so se zlili in sprostili RNA v celično citoplazmo.

Približno v tem času je **Katalin Karikó**, raziskovalka madžarskega rodu, na Univerzi Pensilvanije v Združenih državah Amerike izvajala poskuse z različnimi oblikami RNA, da bi v poskusih genskega zdravljenja izboljšala izražanje terapevtskih proteinov. Dokazala je, da se izražanje vnesene mRNA lahko močno izboljša, če ji na njen konec dodamo daljši »rep«, sestavljen iz adozinskih nukleotidov (rep poli-A), kar je bil

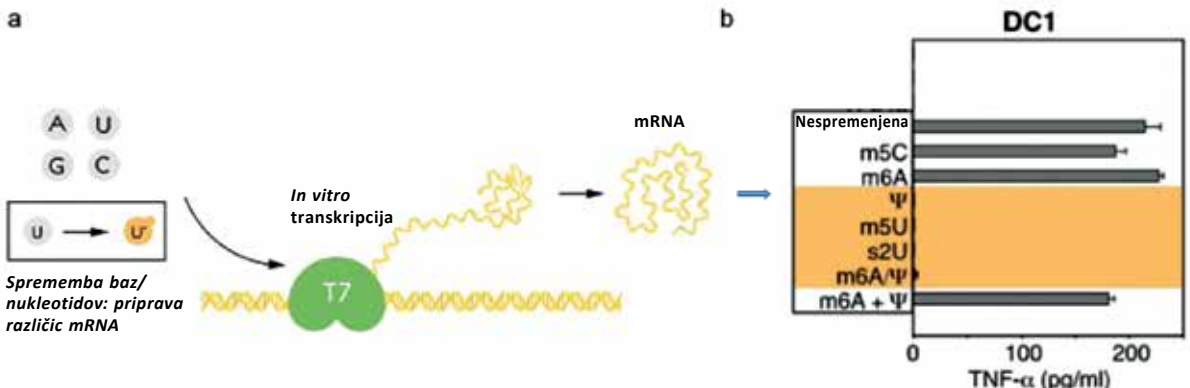
spodbuden dosežek v prizadevanjih za načrtovanje in izdelovanje za klinično uporabo primernih oblik mRNA. V poznih devetdesetih letih se je Karikó združila z **Drewom Weissmanom**, zdravnikom raziskovalcem, ki se je Univerzi Pensilvanije pridružil leta 1997, zanimala pa sta ga osnovna imunologija in razvoj cepiv, predvsem uporaba dendritičnih celic za pripravo imunskega odziva. Dendritične celice so antigen predstavljene celice imunskega sistema sesalcev. Njihova naloga je prepoznavanje antigeneskega materiala in njegova izpostavitve (»predstavitev«) na celični površini celicam T imunskega sistema. Delujejo kot posredniki med prirojenim in prilagoditvenim imunskim sistemom. Karikó in Weissman sta opazila, da dendritične celice prepoznajo *in vitro* prepisano mRNA kot tujo snov, kar vodi do njihove aktivacije in sproščanja vnetnih signalnih molekul (citokinov). Spraševala sta se, zakaj je bila *in vitro* prepisana mRNA prepoznana kot tuja, medtem ko

mRNA iz naših celic oziroma celic sesalcev ne povzroča enake reakcije. Ugotovila sta, da se morajo nekatere kritične lastnosti razlikovati med različnimi vrstami mRNA. Molekula RNA vsebuje štiri baze, okrajšane A, U, G in C, ki ustrezajo A, T, G in C v DNA, črkam genetske kode. Karikó in Weissman sta vedela, da se baze v RNA iz celic sesalcev v procesu prepisovanja iz zaporedij DNA pogosto kemično spremenijo (»posttranskripcijska modifikacija«), medtem ko *in vitro* prepisana mRNA tega pojava ne pozna. Ali bi lahko odsotnost spremenjenih baz v *in vitro* prepisani RNA pojasnila njeno prepoznavo kot tujko in posledično neželjeno vnetno reakcijo? Da bi to raziskali, sta izdelala številne različice mRNA, od katerih je vsaka imela edinstvene kemične spremembe v svojih bazah, ki sta jih nato dostavila dendritičnim celicam. Rezultati so bili presenetljivi: vnetni odziv je bil praktično odpravljen, ko so bile v mRNA vključene modifikacije/spremembe baz, hkrati pa se je tudi močno povečala učinkovitost translacije - prevedbe njenega nukleotidnega zaporedja v procesu sinteze ustreznega proteina.

Šlo je za prelomno odkritje, ki pove, da se z vključitvijo spremenjenih nukleotidov izognemo neželeni obliki imunske aktivacije, to je preveliki proizvodnji vnetnih citokinov, in hkrati povečamo proizvodnjo proteinov v celicah, ki so prevzele mRNA. To je seveda močno spremenilo naše razumevanje, kako celice prepoznajo in se odzivajo na različne oblike mRNA in je imelo velik pomen za medicinsko uporabo mRNA.

Zanimanje za tehnologijo mRNA se je začelo krepiti. V letih od 2000 do 2010 so bila ustanovljena tri podjetja, CureVac, BioNTech in Moderna. Njihova izhodišča so bile temeljne raziskave in ugotovitve Katalin Karikó, Drewa Weissmana in njunih sodelavcev, namen pa je bil razvoj terapevtskih proteinov in cepiv proti virusnim boleznim in cepiv proti raku. Vsa tri podjetja so tesno sodelovala z akademskimi raziskovalci, da bi izboljšala tehnologijo in vzpostavila raziskovalno-proizvodne zmogljivosti za bolezni, ki so predmet njihovega zanimanja. Prvo cepivo mRNA za ljudi se je pojavilo približno osem let po ustanovitvi družbe CureVac. Genetski material iz tumorjev

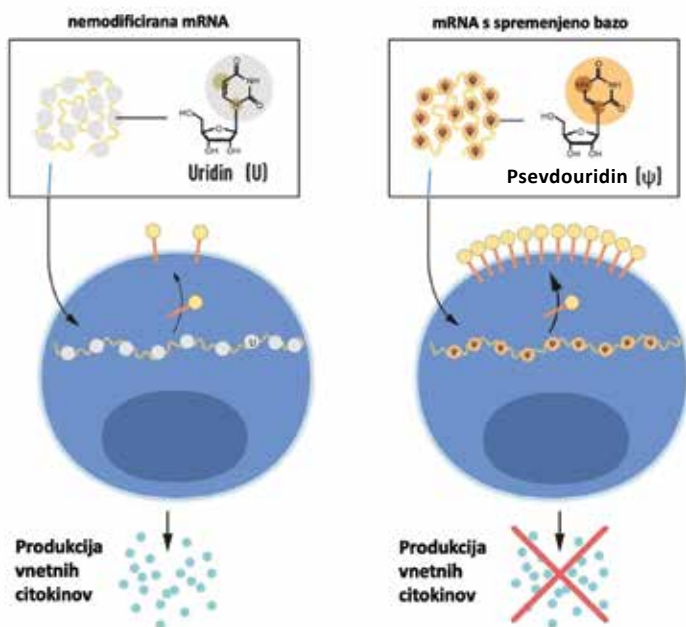
Prikaz prepisovanja in vitro prepisanih mRNA s spremenjenimi ali nespremenjenimi nukleozidnimi bazami po uvedbi v primarne dendritične celice DC1: (a) prepisovalni sistem T7 so uporabili za in vitro proizvodnjo mRNA z ustaljenimi bazami RNA (A, U, G in C) oziroma različic s spremenjenimi bazami, m5C (5-metilcitiidin), m6A (N6-metiladenozin), Ψ (pseudouridin), m5U (5-metiluridin), s2U (2-tiouridin), m6A/Ψ in m6A + Ψ. (b) Različice z bazami oziroma nukleotidi, ki niso povzročile biosinteze in izločanja vnetnega citokina TNF-alfa, so označene z oranžnim senčenjem. Prirejeno iz: Karikó in sod., 2005: Immunity.



melanoma so odvzeli za ustvarjanje mRNA. Uporabili so jo kot cepivo, ki je po njihovih ugotovitvah pri nekaterih bolnikih izboljšalo protitumorski imunski odziv. Leta 2012 je ekipa CureVac poročala o zaščitnih imunskih odzivih na poskusnih živalih med razvojem cepiva proti gripi, že leta 2017 pa so poročali o uspešnih kliničnih testih novih cepiv mRNA proti steklini. Obetavni začetni uspehi na področju cepiv mRNA so bili velika spodbuda za odločnejši vstop na področje ogrožujočih epidemičnih bolezni. V letu 2017 so poročali o dobrih rezultatih predkliničnega testiranja novo razvitega cepiva mRNA proti virusu Zika, pri katerem so uporabili mRNA s spremenjenimi nukleozidnimi bazami. Ta študija, pri kateri so cepili breje samice poskusnih živali, je dokazala uspešno zaščito pred prenosom virusa na plod, zato je še istega leta družba Moderna napovedala začetek kliničnega preizkušanja s cepivom proti virusu Zika na osnovi mRNA, skoraj hkrati z njihovimi kandidatnimi cepivi mRNA proti virusom gripe in ptičje gripe. Približno v času preskušanja cepiva Zika je družba Moderna v

sodelovanju z raziskovalci iz akademskih krogov začela preizkušati tudi možnosti za razvoj cepiva mRNA proti koronavirusu bližnjevzhodnega respiratornega sindroma, MERS-CoV. Pomembna odkritja iz vseh omenjenih raziskav so bila odlična podlaga za učinkovit in hiter raziskovalni odziv v prihajajoči pandemiji COVID-2019.

Do danes so raziskovalci odkrili več kot sto različnih posttranskripcijskih modifikacij (poprepisovalnih sprememb) v RNA in dokazali, da so te bolj pogoste pri evkariontih kot prokariontih, pri čemer izstopa psevdouridin (Ψ), rotacijski izomer nukleozidne baze uridin (U), kot ena izmed najpogostejših sprememb RNA. Encimsko vodena biokemijska sprememba, posledica zasuka uridina okrog osi med njegovima atomoma N3 (dušikov atom na mestu 3 v uridinskem obroču) in C6 (ogljikov atom na mestu 6 v uridinskem obroču), povzroči spremembo nukleotidne povezave uridina s sladkorjem riboza, ki je pri uridinu N-C, v bolj gibljivo povezavo C-C pri psevdouridinu. Ta molekuli mRNA podeli večjo oblikovno prilagodljivost in boljšo umestitev na ribo-



Karikó in Weissman sta v primerjavi z matično, nespremenjeno obliko mRNA pokazala višje ravni izražanja bazno spremenjene mRNA, v katero so namesto uridina vstavili psevdouridin. V isti študiji so potrdili, da je dostava spremenjene mRNA v vranico miši povzročila povečano proizvodnjo proteinov in zmanjšanje imunske aktivacije. To je imelo za posledico izostanek vnetnega odziva organizma, v katerega so vnesli spremenjeno mRNA. Objava teh ugotovitev je imela velik pomen za prihodnje medicinske namene. Prirejeno po: <https://www.nobelprize.org/uploads/2023/10/advanced-medicinprize2023-3.pdf>.

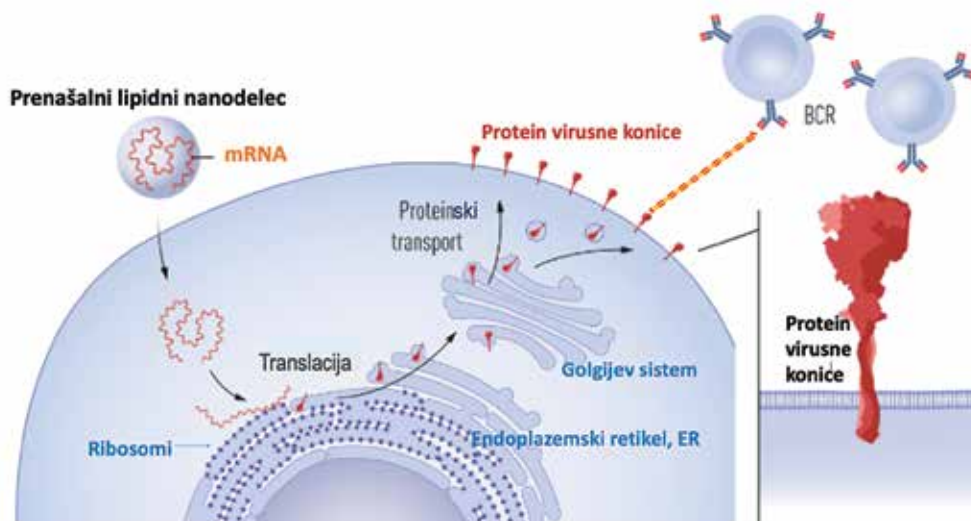
somih, kjer se odvija njen prevod v zgradbo ustreznega proteina. Učinek psevdouridina so v nadaljnjih raziskavah še povečali s kemijskim dodatkom metilne skupine na njegov dušikov atom N1, tako da je danes N1-metil-psevdouridin (m1 Ψ) najpogostejše spremenjena baza, ki se uporablja pri proizvodnji cepiv mRNA. Vnos takega cepiva mRNA ima za posledico slabše prepoznavanje zaradi Ni-metil-psevdouridina spremenjene molekule mRNA s strani receptorjev T-celic prirojenega imunskega odziva, zato tudi manjšo proizvodnjo vnetnih citokinov in s tem tudi bistveno slabši vnetni odziv. Po drugi strani pa boljše prilaganje spremenjene mRNA ribosomom na mestu biosinteze v telesnih celicah pomeni tudi boljše prevajanje njenega koda v ustrezen protein in s tem bistveno bogatejšo proizvodnjo želenega antigena v telesu samem in njegovo izpostavljenost prilagoditvenemu imunskemu odzivu oziroma razpoložljivost za tvorbo ustreznih protiteles.

Trenutek je bil zrel za sestavo mRNA cepiva proti COVID-19

Ko je v začetku leta 2020 izbruhnila pandemija COVID-19, so podjetja, ki so raziskovala cepiva na osnovi mRNA, lahko hitro ukrepala. Pomagale so ugotovitve iz raziskav MERS-CoV, da ta virus za vstop v celice gostitelja uporablja površinske proteine svoje bodičaste zgradbe in da so virusi iz različnih družin razvili podobne rešitve za svoje zlivanje s ciljnim celicami. V rekordno hitrem času so (McLellan s sodelavci, 2020) razvozlati in objavili tudi natančno aminokislinsko zgradbo ter prostorsko obliko konice virusa SARS-CoV-2 in njenega sestavnega proteina, kar je imelo neprecenljivo vrednost za razvoj uspešnih cepiv proti COVID-19, predvsem za opredelitev tistih delov proteinske konice virusa (epitopov), ki jih prepoznavajo celice imunskega sistema (T-celice, B-celice) in kamor se končno vežejo tudi nevtralizirajoča protitelesa. Znanje o tem je bilo zelo pomembno tudi pri ka-

snejšem pojavu »ubežnih mutacij« v tem delu virusne konice, ki so povzročile nastanek virusnih različic, proti katerim je bilo treba najti rešitve v najkrajšem možnem času.

Pandemija SARS-CoV-2 je bila odločilen dogodek, ki je pripeljal do obsežnih naložb v tehnologijo cepiv mRNA in oblikovanje kliničnih preizkušanj, ki so zaradi znanja, nakopičenega v pravem trenutku, v nasprotju s predhodno prakso lahko potekala vzporedno z razvojem cepiv. Kolektivno financiranje in podpora vlad, mednarodnih organizacij in industrije sta povzročila dokončanje preizkušanj varnosti in učinkovitosti cepiv mRNA družb Pfizer/BioNTech in Moderna v rekordnem času, v enem letu po izbruhu epidemije SARS-CoV-2. Odobritev dveh učinkovitih in varnih cepiv mRNA proti COVID-19 je konec leta 2020 pognala področje cepiv mRNA v novo dobo. Tak razvoj, petnajst let po objavi temeljnih ugotovitev Katalin Karikó in Drewa Weissmana, je bil mogoč zaradi desetletja temeljnih raziskav in izboljšane tehnologije mRNA. Njuno odkritje, da se z uporabo spremenjenih baz v *in vitro* prepisanih mRNA po dostavi v celice izognemo neželenemu vnetnemu odzivu organizma in hkrati v njem povečamo proizvodnjo zelenih proteinov – antigenov, dokazuje vrednost temeljnih raziskav. Rezultati, ki sta jih objavila Karikó in Weissman v svojem temeljnem članku iz leta 2005, so bili takrat deležni razmeroma malo pozornosti, vendar so ustvarili osnovo za kritično pomemben znanstveni in tehnološki preboj, ki je omogočil človeštvu uspešen spopad z grozečo pandemijo COVID-19. Kot take jih je tudi prepoznal Nobelov odbor na švedskem Karolinskem inštitutu in se zato odločil, da obema znanstvenikom podeli Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino za leto 2023 za njuna odkritja, povezana s spremembami nukleozidnih baz, ki so omogočila razvoj učinkovitih cepiv mRNA proti COVID-19.



Prikaz proizvodnje virusnih konic po cepljenju z mRNA in prepoznavanje konic s strani celic B. Po prevzemu mRNA v celice, ki ga olajšajo lipidni nanodelci, mRNA deluje kot matrica za proizvodnjo proteina virusne konic. Ta se začasno izrazi na površini celic, v katere smo vnesli cepilno mRNA, kjer ga celice B prepoznajo prek svojega B-receptorja (angleško B-Cell Receptor, BCR), kar spodbudi njihovo izločanje za konic specifičnih protiteles.

Prirjeno po: Scientific background 2023; <https://www.nobelprize.org/uploads/2023/10/advanced-medicinprize2023-3.pdf>.

Viri:

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet: Press release 2023-10-02; <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023/press-release/>.

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet: Scientific background 2023 - Discoveries concerning nucleoside base modifications that enabled the development of effective mRNA vaccines against COVID-19; <https://www.nobelprize.org/uploads/2023/10/advanced-medicinprize2023-3.pdf>.

SARS-CoV-2, Wikipedia: <https://sl.wikipedia.org/wiki/SARS-CoV-2>.

Dolenc, S., 2021: Nove različice virusa SARS-CoV-2. Kvarkadabra, 20. 3. 2021: <https://kvarkadabra.net/2021/03/razlicice-sars-cov-2/>.

Immune System, Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Immune_system.

Vaccine, Wikipedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Vaccine>.