

# RAZVOJ CEPIV PROTI VIRUSU SARS-COV-2

## SARS-COV-2 VACCINE PIPELINE

AVTOR / AUTHOR:

Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.<sup>1</sup>

Izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.<sup>1</sup>

Doc. dr. Nika Lovšin, univ. dipl. kem.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za farmacevtsko biologijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za klinično biokemijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: marija.nika.lovsin@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Koronavirusna bolezen 19 (covid-19) je izbruhnila konec leta 2019 na Kitajskem in se z naglico razširila po celem svetu (1). Do sedaj (19. maj 2020) se je okužilo že 4.823.479 ljudi v 188 državah sveta, umrlo pa jih je 318.857 (2). Zaradi velike kužnosti (reprodukcijsko število virusa – število ljudi, ki jih okuženi posameznik okuži – je 2,2) in relativno visoke smrtnosti (število smrtnih primerov glede na potrjene okužbe) predstavlja covid-19 veliko grožnjo človeštvu, zato je Svetovna zdravstvena organizacija WHO (*World Health Organisation*) 11. marca 2020 razglasila pandemijo.

Najboljša rešitev za zamejitev širjenja boleznii oz. preprečitev izbruha novega vala pandemije je razvoj cepiva, ki bo za-

## POVZETEK

Pandemija boleznii covid-19 je vplivala na življenje ljudi, na svetovno gospodarstvo in zdravstvo in tako spodbudila pospešen razvoj cepiv proti virusu SARS-CoV-2. Razvoj gre tudi v smer uporabe obetavnih inovativnih, a še neuveljavljenih platform, kot so vektorska cepiva ter cepiva na osnovi DNA in RNA. Predvidevajo, da bo razvoj cepiva stal okoli 2 milijardi dolarjev in trajal od 12 do 18 mesecev. Trenutno poteka razvoj 115 cepiv, od tega jih je 73 v predklinični fazi, 10 pa v prvi ali drugi stopnji kliničnega preskušanja. Šele rezultati tretje stopnje preskušanja, ki bodo vključevali več tisoč prostovoljcev in njihovo dolgoročno spremljanje, bodo dali odgovor, ali s cepivom dosežemo želeno zaščito pred patogenom. Na poti do končnega cilja varnega, učinkovitega in vsem dostopnega cepiva bo potrebno zaobiti še precejšnje ovire, povezane tudi s stroškovno učinkovito proizvodnjo, predvsem pri novih platformah, pri katerih proizvodna infrastruktura še ne obstaja.

## KLJUČNE BESEDE:

cepiva, covid-19, SARS-CoV-2

## ABSTRACT

The enormous impact of covid-19 pandemic on everyday life, global economy and healthcare has stimulated the fast-tracked development of SARS-CoV-2 vaccines. Development is directed also towards promising innovative although not yet established platforms, such as vector vaccines and DNA and RNA-based vaccines. The SARS-CoV-2 vaccine development is projected to cost about 2 billion USD and take 12 to 18 months. 115 vaccines are currently being developed, of which 73 are in the preclinical phase and 10 in the first or second stage of a clinical trials. Only the results of the third stage of trials, which will include thousands of volunteers and their long-term monitoring, will give an answer as to whether the vaccine achieves the desired protection against the pathogen. On the way to the ultimate goal of a safe, effective and accessible vaccine, significant barriers to cost-effective production will still need to be overcome, especially for new platforms for which production infrastructure does not yet exist.

## KEY WORDS:

covid-19, SARS-CoV-2, vaccines



ščitilo večji del populacije pred obolevanjem in smrtjo za covid-19. Cepiva (vaccine) pri prejemniku izzovejo aktivacijo imunskega odziva in oblikovanje imunskega spomina. Cepljen posameznik postane imun na okužbo s specifičnim povzročiteljem bolezni. Če je precepljen dovolj velik delež populacije, je prekinjena veriga prenosa patogena, s čimer so pred nalezljivo boleznijo posredno zaščiteni tudi posamezniki, ki jih iz različnih razlogov ne moremo cepiti. Kmalu po določitvi nukleotidnega zaporedja novega virusa SARS-CoV-2 (3) je stekel razvoj protivirusnih zdravil in cepiv. Zaradi ogromnega vpliva pandemije na življenje ljudi in svetovno gospodarstvo ter zdravstvo so znanstveniki iz javnega in zasebnega sektorja pričeli s pospešenim razvojem cepiv, pri čemer so posegli tudi po obetavnih inovativnih, a še neuveljavljenih platformah (4, 5). Pandemija covid-19 pomeni tudi prelomnico v hitrosti bazičnih in predkliničnih raziskav; raziskave, ki običajno trajajo nekaj let, so tokrat znanstveniki izvedli tudi v le mesecu dni (6). Prva kandidatna cepiva so tako že marca 2020 vstopila v fazo kliničnega vrednotenja.

Koordinacijo razvoja cepiva proti SARS-CoV-2 in razporeditev finančnih sredstev za projekte je prevzela globalna organizacija CEPI (*The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*) (6, 7). Gre za človekoljubno organizacijo, ki deluje pod okriljem Združenih narodov, Evropske komisije, fundacije Wellcome Trust, fundacije Billa in Melinde Gates in nekaterih vlad ter povezuje javno in zasebno partnerstvo. Poleg donatorskih sredstev, Evropske komisije in nekaterih vlad se direktno financira tudi iz Svetovne banke. Glavni cilj organizacije je omogočiti in poskrbeti, da bo cepivo dostopno vsem. Predvidevajo, da bo razvoj cepiva stal okoli 2 milijardi dolarjev in trajal 12 do 18 mesecev (8). Trenutno (maj 2020) poteka razvoj 115 cepiv, od tega jih je 73 v predklinični fazi, 10 pa v klinični fazi (preglednica 1) (6, 9).

V CEPI pričakujejo, da bodo financirali testiranje osmih cepiv v prvi klinični fazi, šest kandidatnih cepiv pa bo vstopilo v drugo in tretjo klinično fazo raziskav. Vsaj tri cepiva naj bi prejela odobritev regulatornih organizacij in bila dovolj kakovostna, varna in učinkovita za začetek množične proizvodnje. Ker na začetku ne bo dovolj cepiva za celotno populacijo, bodo imeli prednost pri cepljenju zdravstveni delavci, ki so najbolj ogroženi, in ljudje, ki so bolj dovzetni za težko obliko bolezni in pri katerih bi okužba lahko vodila tudi do smrti. Večino cepiv razvija zasebni sektor (72 %), 28 % pa akademske in javne institucije (6). V razvoj cepiva so se vključila tudi nekatera multinacionalna farmacevtska podjetja, vendar daleč največ prizadevanj ostaja v majhnih zasebnih podjetjih. Večino kandidatnih cepiv razvijajo v

ZDA (46 %), 18 % na Kitajskem, 18 % v Evropi, preostalo pa v drugih azijskih državah in Avstraliji (6).

## 2 NAČRTOVANJE CEPIVA

Leta 2009 so ob pojavu pandemije virusa influence H1N1 (povzročitelja »prašičje« gripe) znanstveniki potrebovali šest mesecev za razvoj cepiva, čeprav so imeli na voljo preizkušeni in odobren proces proizvodnje cepiva proti sorodnemu virusu sezonske gripe. Tokrat se soočamo s povsem novim virusom, za katerega še ne obstaja odobreno cepivo. Zato je hiter razvoj cepiva proti SARS-CoV-2 izziv tako s stališča validacije primerne platforme, ki bo dala učinkovito in varno cepivo, kot s stališč regulative, hitre vzpostavitve množične proizvodnje in distribucije cepiva. Tehnologije razvoja cepiv so v zadnjem desetletju zelo napredovale. Pojavila so se kandidatna cepiva na osnovi nukleinskih kislin (tako RNA kot DNA), cepiva na osnovi vektorskih mikroorganizmov in cepiva, ki temeljijo na rekombinantnih proteinskih antigenih (4). Poleg novih platform si znanstveniki pri razvoju cepiva proti SARS-CoV-2 pomagajo tudi z znanjem in izkušnjami, pridobljenimi pri raziskavah cepiv proti sorodnima virusoma SARS-CoV-1 (analogno imenovan tudi SARS-CoV) in MERS-CoV, saj so si ti betakoronavirusi zelo podobni. SARS-CoV-2 izkazuje visoko stopnjo homologije (79 %) z virusom SARS-CoV-1 (3, 10). Na osnovi podobnosti s SARS-CoV-1 in MERS-CoV so hitro opredelili kot najugodnejšo tarčo za načrtovanje imunogena protein virusne ovojnice, t. i. protein S. Prostorsko strukturo proteina S SARS-CoV-2 so določili v rekordno kratkem času. To je pomembno prispevalo k razumevanju vezave virusnega proteina na pripadajoči receptor ACE2 na gostiteljskih celicah ter načrtovanju imunogena (11, 12). Po imunizaciji nastala protitelesa proti proteinu S preprečijo vezavo virusa na receptor in s tem onemogočijo vstop virusa v celice. Takšna protitelesa imajo nevtralizirajoči učinek.

Po izbruhu virusa SARS-CoV-1 leta 2003 so razvili več kandidatnih cepiv, ki so jih že testirali na živalskih modelih. Ta cepiva so temeljila na oslabljenih virusih, inaktiviranih virusih, vektorskih cepivih, cepivih na osnovi DNA, pa tudi na rekombinantnem proteinu S (pregledano v (13, 14)). V večini primerov so se ta cepiva izkazala kot učinkovita, ponekod pa so se pojavili resni neželeni učinki. Rezultati prve faze kliničnih preskušanj so optimistični in so pokazali, da so cepiva proti SARS-CoV-1, osnovana na inaktiviranem virusu

in temelječa na DNA, varna in izzovejo nastanek nevtralizirajočih protiteles (14). Pri razvoju cepiva proti SARS-CoV-2 bodo ključna testiranja varnosti cepiva pri človeku. Skrbno je treba preveriti, ali cepivo povzroči imunopotenciacijo. Pomembno je tudi, da bo cepivo primerno za starejše od 60. leta in tiste s predhodnimi zdravstvenimi težavami (hipertenzija, diabetes). Ker so se pri ljudeh, ki so preboleli SARS in MERS, titri protiteles po dveh letih znižali, je pri načrtovanju cepiva pomembno upoštevati možnost upada imunskega odziva (pregledano v (13)). Pandemija pa je tudi opozorilo, da je nujno pripraviti tehnologije, ki bodo uporabne ob ponovnem izbruhu podobnega virusa (15).

### 3 PLATFORME ZA IZDELAVO CEPIVA PROTI SARS-COV-2

Potreba po takojšnjem ukrepanju in hitrem razvoju cepiv je povzročila pojav novih raznovrstnih platform za cepiva proti SARS-CoV-2 (6) ob sicer splošno uveljavljenih strategijah cepiv na osnovi oslabiljenega ali inaktiviranega virusa in virusnih komponent. Njihova potencialna prednost je predvsem prilagodljivost, saj (vsaj teoretično) omogočajo hitro spremembo imunogena v primeru mutacije vi-

**Preglednica 1:** Pregled platform in tehnologij za razvoj cepiv proti virusu SARS-CoV-2. Z odebeljeno pisavo so označeni projekti, ki so že vstopili v klinično fazo vrednotenja (maj 2020; povzeto po (9, 13, 14)).

**Table 1:** Overview of platforms and technologies for SARS-CoV-2 vaccine development. Projects which have already entered the clinical phase of development are marked in bold (May 2020; adapted from (9, 13, 14)).

Platforma	Imunogen	Že obstaja odobreno cepivo in tehnologija za proizvodnjo cepiva?	Prednosti	Slabosti	Razvijalec
Rekombinantna proteinska cepiva, komponentna cepiva	protein S	bakulovirusni sistem (HPV, virus influence), kvasovke (HBV, HPV)	Ni rokovanja z infektivnimi virusi, adjuvansi okrepijo imunski odziv.	Omejena proizvodna kapaciteta. Potrditi je potrebno ustreznost antigena oz. njegovih epitopov.	<b>Clover Biopharmaceuticals/ CEPI</b> , University of Queensland CEPI, GSK, <b>Novavax/CEPI</b> , Baylor College of Medicine, Sanofi/GSK
Živa atenuirana cepiva	virion	da	Ustaljena proizvodnja, uporabili bi lahko infrastrukturo, ki je že postavljena. Veliko registriranih cepiv.	Potrebna je proizvodnja velike količine oslabiljenega virusa, kar je dolgotrajno, saj ima virus velik genom. Potrebno veliko testiranje za določitev varnosti cepiva. Možen povratek virulence. Ni primerno za imunske oslabiljene posameznike.	Codagenix



Inaktivirana cepiva	virion	da	Ustaljena proizvodnja, uporabili bi lahko infrastrukturo, ki je že postavljena. Veliko registriranih cepiv. Tehnologijo so že uporabili za razvoj cepiva proti virusu SARS-CoV-1. Adjuvansi okrepijo imunski odziv.	Potrebna je proizvodnja velike količine infektivnega virusa, kar je dolgotrajno, saj ima virus velik genom. Potrebno bo preveriti integriteto antigena, ali povzroči dovolj močan imunski odziv.	<b>Sinovac Biotech</b>
Vektorska cepiva	protein S	Da, vendar le nedavno za virus ebola.	Dobri predklinični rezultati. Dober imunski odziv.	Možnost predhodne senzitivacije s sorodnim virusom, kar je vzrok nizke učinkovitost cepiva.	Johnson&Johnson, Vaxart, Geovax, <b>University of Oxford, CanSino Biologicals</b> , University of Hong Kong, <b>Shenzhen Geno-Immune Medical Institute (2 cepivi)</b>
Cepiva na osnovi DNA	protein S	ne	Ni rokovanja z infektivnimi virusi. Cepiva enostavno, poceni in hitro lahko pripravimo tudi za množično proizvodnjo. Obstojna so pri višji temperaturi. Izzovejo humoralni in celični imunski odziv.	Poseben dostavni sistem z elektroporacijo. Še neuveljavljena platforma. Lahko pride do vključitve DNA v gostiteljev genom. Imunski odziv je slabši v primerjavi z živim virusom.	<b>Inovio Pharmaceuticals/ CEPI</b> , Applied DNA Sciences
Cepiva na osnovi RNA	protein S	ne	Ni rokovanja z infektivnimi virusi. Cepiva so imunogena in možna je hitra proizvodnja. Ne pride do vključitve v gostiteljev genom.	Reaktogenost. Še neuveljavljena platforma.	<b>Moderna/NIAID/ CEPI, BioNTech SE/Pfizer</b> , CureVac/CEPI

rusa. Uporaba novih platform pa narekuje tudi večjo previdnost in skrbnost pri presoji učinkovitosti, varnosti cepiva in prisotnosti neželenih učinkov. Cepiva proti SARS-CoV-2 v razvoju razdelimo na rekombinantna proteinska cepiva, oslABLjena cepiva, inaktivirana cepiva ter novejš

oblike, kot so vektorska cepiva ter cepiva na osnovi DNA in RNA (preglednica 1). Ker se seznam cepiv, ki so vstopila v klinično fazo razvoja hitro spreminja, za osvežen seznam glejte spletni strani ClinicalTrials.gov (9) in WHO (16).

### 3.1 REKOMBINANTNA PROTEINSKA CEPIVA

Pri rekombinantnih proteinskih cepivih kot imunogen uporabimo posamezen virusni protein, ki ga pripravimo z uporabo tehnologij rekombinantne DNA (slika 1E). Genski zapis za virusni antigen vstavimo v izbrani ekspresijski vektor, ki služi za vnos DNA v ekspresijski sistem. Rekombinantna proteinska cepiva proizvajamo v sesalskih ali insektnih celičnih kulturah (z bakulovirusnimi vektorji) ter v kvasovkah (preglednica 1). Ker pri rekombinantnih proteinskih cepivih za imunizacijo uporabimo dobro očiščen antigen, s tem znižamo neželene učinke cepiva, ki bi jih utegnili povzročiti cepljenje z živim virusom. Prednost rekombinantnih cepiv je visoka varnost cepiva, saj se izognemo rokovanju z visokoinfektivnim virusom, hkrati pa cepivo povzroči specifičen imunski odziv proti virusnemu proteinu. Rekombinantna proteinska cepiva lahko tudi okrepijo humoralni imunski odziv z vključitvijo limfocitov T pomagalk in povzročijo nastanek visokih titrov nevtralizirajočih protiteles (13). Rekombinantna proteinska cepiva proti SARS-CoV-2 vsebujejo protein S ali njegove posamezne domene in predvidoma izzovejo tvorbo protiteles, ki se ob okužbi vežejo na protein S in preprečijo vezavo na gostiteljev receptor ACE2. Proteinska cepiva proti SARS-CoV-2 razvijajo v podjetju Clover Biopharmaceuticals, kjer so za antigen uporabili trimerni protein S, izražen v sesalskih celicah (tehnologija Trimer-Tag®) (17). Povezali so se tudi s podjetjem GSK, ki bo poskrbelo za dodatek adjuvansa cepivu in s tem močnejši imunski odziv na cepivo. Predklinični rezultati so obetavni, zato je CEPI podprl začetek klinične raziskave v Avstraliji (8). Rekombinantno proteinsko cepivo razvijajo tudi na Univerzi v Queenslandu. Uporabili so poseben način stabilizacije konformacije proteina S, t. i. peptidne klešče (*molecular clamps*), s čimer omogočijo boljše prepoznavnost antigena in močnejši imunski odziv pri okužbi. Razvoj tega cepiva poteka v sodelovanju z GSK pod okriljem CEPI (8). Podjetje Novavax proizvaja nanodelce, ki vsebujejo dele rekombinantnega proteina S, tehnologijo pa so že uporabili pri virusu SARS-CoV-1 (18). Ker so predklinične raziskave kandidatnega cepiva NVX-CoV2373 (Novavax) pokazale, da cepivo povzroči visoke titre nevtralizirajočih protiteles, bo v kratkem vstopilo v klinično vrednotenje (9). Obetavno je tudi proteinsko cepivo, ki za antigen uporabi domeno proteina S, s katero se le-ta veže na receptor (RBD, *receptor binding domain*), kar razvijajo na ameriški univerzi Baylor College of Medicine (15, 19). Moči v bitki za novo cepivo sta združila tudi Sanofi in GSK (20). Sanofi razvija rekombinantni protein S z uporabo usta-

ljenega bakulovirusnega sistema, ki ga sicer uporabljajo za pripravo cepiva za sezonsko gripo. GSK pa bo rekombinantnemu cepivu dodal adjuvanske za ojačanje imunskega odziva.

### 3.2 ATENUIRANA CEPIVA – OSLABLJEN ŽIVI VIRUS

Atenuirana ali oslABLJena cepiva vsebujejo oslABLjen živi virus, ki je obdelan tako, da izgubi virulentnost, vendar se še vedno lahko namnožuje v gostitelju (slika 1A) in spodbudi močan in dolgotrajen imunski odziv (21). Gre za klasična cepiva z ustaljeno množično proizvodnjo registriranih cepiv, kar je velika prednost. Atenuirana cepiva so npr. cepiva proti ošpicam, mumpsu in rdečkam. Slabost atenuiranih cepiv proti SARS-Cov-2 je, da je potrebno pripraviti velike količine virusa in izvesti zelo veliko testiranje za zagotovitev varnosti cepiva. Podjetje Codagenix skupaj z indijskim inštitutom Serum Institute of India razvija atenuirano cepivo proti SARS-CoV-2 s spreminjanjem nukleotidnega zaporedja (16). Z bioinformatičnimi metodami bodo izbrali nekaj kandidatnih nukleotidnih zaporedij virusa, podjetje Serum Institute of India pa bo viruse z mutiranim nukleotidnim zaporedjem pripravilo. Čeprav bi to cepivo lahko relativno hitro proizvedli, bo potrebno obsežno vrednotenje njegove varnosti.

### 3.3 INAKTIVIRANA CEPIVA – INAKTIVIRAN MRTVI VIRUS

Imunogen pri inaktiviranih cepivih predstavlja celoten virusni delec (virion), ki so ga predhodno inaktivirali (npr. kemično s formaldehidom) (21). Ker se virus ne more razmnoževati v organizmu (slika 1B), je pri imunizaciji običajno potrebno več odmerkov, da vzdržujemo imunost. Prednost inaktiviranih cepiv je že postavljena proizvodnja za druga registrirana cepiva. Na tržišču je veliko inaktiviranih cepiv, npr. cepivo proti poliovirusu (otroški paralizi) in hepatitisu A. Spodbudno je, da so tehnologijo že uporabili pri virusu SARS-CoV-1. Slabost inaktiviranega cepiva pa je, da je potrebno najprej pripraviti ogromne količine infektivnega virusa, kar je dolgotrajno in zahtevno (13). Poleg tega je pri uporabi inaktiviranega cepiva potrebno skrbno preveriti integriteto epitopov, varnost, toksičnost in neželene učinke. Inaktivirano cepivo proti SARS-CoV-2 (PiCoVacc) razvija kitajsko podjetje Sinovac Biotech (22). Viruse so izolirali iz 11 bolnikov iz različnih držav (pet iz Kitajske, tri iz Italije in po enega iz Španije, Velike Britanije in Švice), jih namnožili



in kemijsko inaktivirali (22). Cepivo je povzročilo nastanek protiteles, ki so nevtralizirala 10 različnih virusnih sevov, kar kaže, da bi lahko bilo uporabno za več sevov. Rezultati testiranja na živalih kažejo, da je cepivo učinkovito zaščitilo opice rezus makake pred okužbo in da ni povzročilo zapletov ali poslabšanja bolezni. Cepivo je sedaj prešlo v prvo fazo kliničnega vrednotenja na 144 prostovoljcih na Kitajskem (23).

### 3.4 CEPIVA NA OSNOVI DNA

Cepiva na osnovi DNA vsebujejo plazmid, ki nosi zapis za tarčni virusni protein. Takšna cepiva vnašamo neposredno v celice z elektroporacijo (slika 2), kar izzove močan imunski odziv (17, 24). Cepiva na osnovi DNA lahko vbrizgamo tudi neposredno intramuskularno ali intradermalno, vendar je učinkovitost vnosa cepiva v celice bistveno višja pri uporabi elektroporacijskih metod. Imunski odziv lahko še okrepiamo z dodatkom adjuvansov. Prednost cepiv na osnovi DNA je, da se izognemo delu z infektivnimi virusi in da cepivo lahko na relativno hiter in poceni način pripravimo v večjih količinah. Poleg tega je DNA stabilna tudi pri višjih temperaturah, tako da je cepivo lažje distribuirati. Pomanjkljivost DNA-cepiv pa je, da jih lahko dostavljamo le z uporabo posebnih aparatov za elektroporacijo. Cepivo na osnovi DNA proti SARS-CoV-2 razvijajo v kitajskem podjetju Inovio Pharmaceuticals. Cepivo INO-4800 vsebuje plazmidno DNA z vključenim zapisom za protein S (9, 25). Razvoj tega cepiva temelji na izkušnjah pri razvoju cepiva proti MERS-CoV, ki je že vstopilo v drugo fazo kliničnega preskušanja. Razvoj cepiva poteka pod okriljem CEPI in v sodelovanju z nemškim podjetjem Richter-Helm BioLogics GmbH. Prednost tega cepiva je intradermalen vnos, ki povzroči dovolj visok titer nevtralizirajočih protiteles.

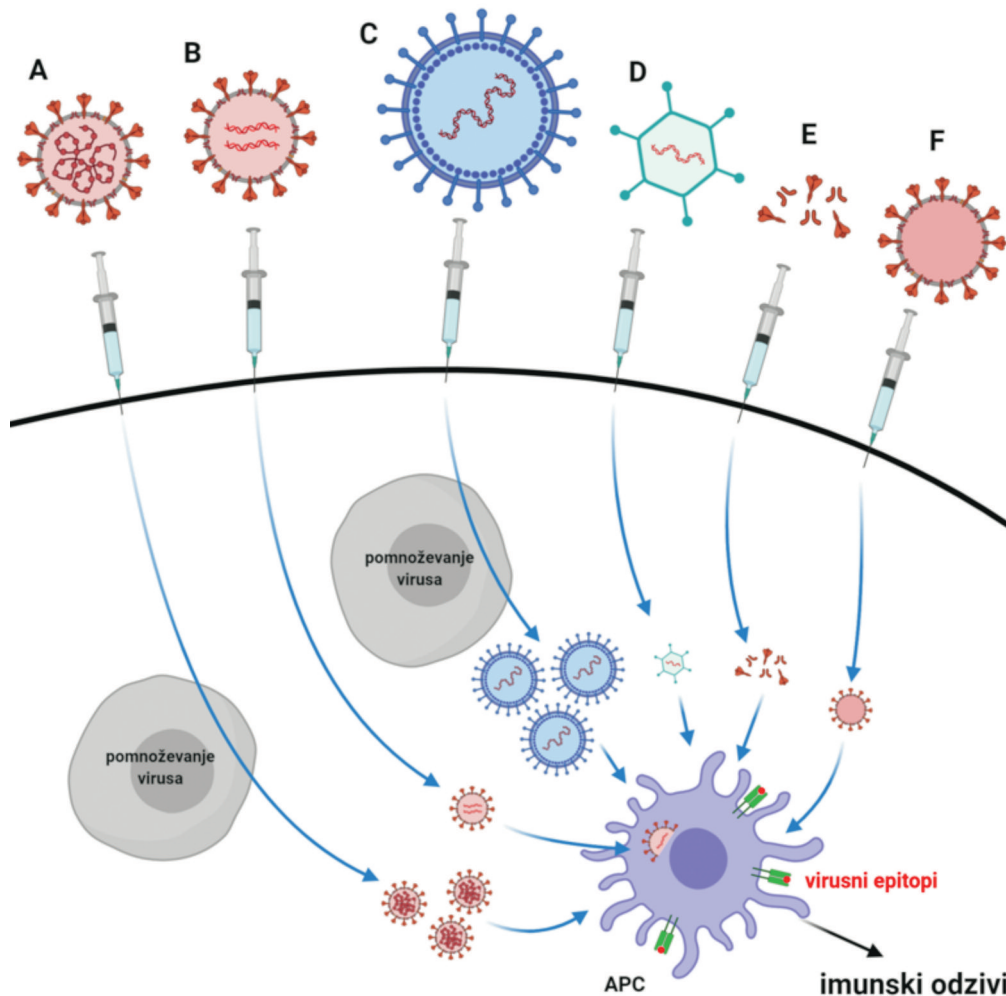
### 3.5 CEPIVA NA OSNOVI RNA

Cepiva na osnovi RNA vsebujejo informacijsko RNA (mRNA), ki nosi zapis za tarčni virusni protein. mRNA je v cepivu običajno obdana z lipidnim dvoslojem, da pride do lažjega vnosa v celice (slika 2). Po cepljenju pride do prevoda mRNA v protein (imunogen), kar povzroči imunski odziv (17). Razvoj tehnologije RNA-cepiv poteka predvsem na področju zdravljenja raka in infekcijskih bolezni (26). Prednosti cepiv na osnovi RNA so, da ne more priti do vključitve vnesene informacije v genom prejemne celice, močan imunski odziv in možnost hitre proizvodnje cepiva. Cepivo na osnovi RNA lahko vsebuje mRNA za več imunogenov hkrati, kar pomeni, da bi lahko bilo uporabno za

več virusnih sevov (17). RNA-cepivo mRNA-1273 je prvo cepivo proti SARS-CoV-2, ki je vstopilo v klinično vrednotenje. Cepivo vsebuje mRNA proteina S in je vgrajeno v lipidne nanodelce. Cepivo je razvilo ameriško podjetje Moderna v sodelovanju z inštitutom NIAD (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), razvoj pa poteka v okviru CEPI (9, 27). Klinično vrednotenje so začeli tudi v nemškem podjetju BioNTech, kjer skupaj s farmacevtsko družbo Pfizer razvijajo kandidatno mRNA-cepivo BNT162. Ker so molekule RNA nestabilne, povečajo njihovo stabilnost z različnimi modifikacijami (dodatek 5'-kape in 3'-poli(A) repa, 5'- in 3'-neprevedljivih regij in vgradnja modificiranih nukleotidov (28)). Obetavne rezultate z razvojem RNA-cepiva ima tudi nemško podjetje CureVac, ki naj bi vzporedno z začetkom kliničnih vrednotenij postavljajo že množično proizvodnjo cepiva (29).

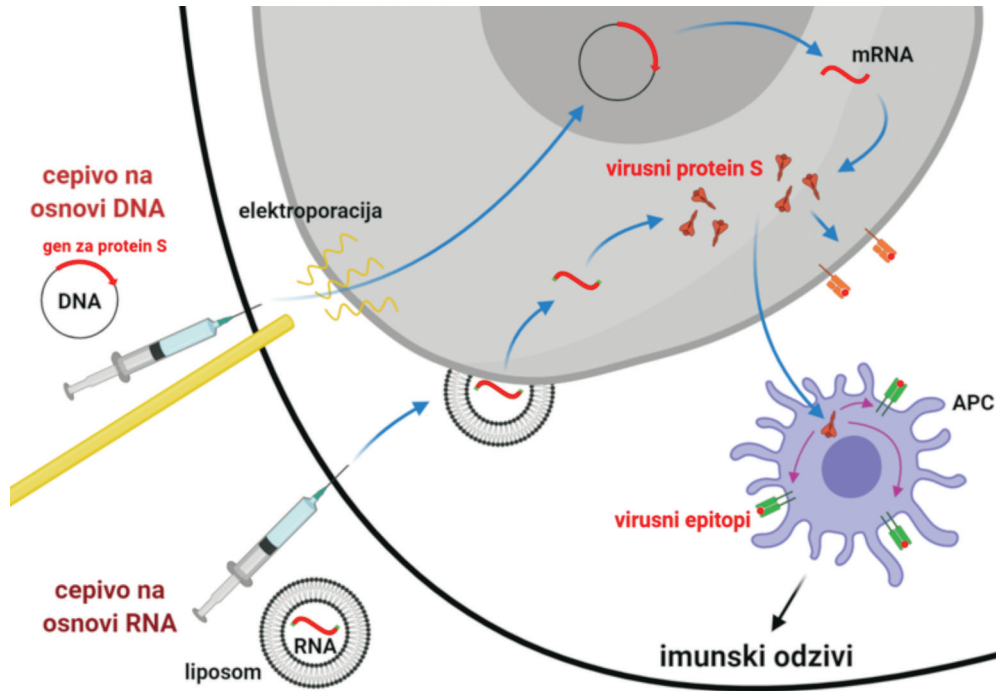
### 3.6 VEKTORSKA CEPIVA

Pri vektorskih cepivih antigen predstavlja virusni protein, katerega genski zapis je vstavljen v nepovezan virusni vektor (30). Virusni vektorji so gensko spremenjeni tako, da omogočajo vnos in izražanje virusnega imunogena v celicah cepljenega posameznika. Vektorji se lahko v organizmu namnožujejo, npr. oslabljen virus ošpic (slika 1C), ali pa so replikacijsko onesposobljeni, npr. adenovirusni vektorji (slika 1D). Adenovirusnih vektorjev še niso uporabili pri razvoju cepiv, jih pa sicer uporabljajo pri genskem zdravljenju. Prvo registrirano vektorsko cepivo je bilo cepivo proti virusu ebola, imenovano Ervebo. Kot vektor so uporabili oslabljen virus vezikularnega stomatitisa (VSV), ki vsebuje zapis za protein virusa ebola Zaire (31). Prednost vektorskih cepiv so dobri rezultati predkliničnih in kliničnih vrednotenij pri različnih virusih, med njimi tudi pri MERS-CoV. Pomanjkljivo pri vektorskih cepivih pa je, da je pri predhodni senzitivaciji s sorodnim virusom divjega tipa cepivo neučinkovito (13). Kitajsko podjetje CanSino Biological Inc. je skupaj s pekinškim inštitutom Beijing Institute of Biotechnology pripravilo kandidatno cepivo na osnovi adenovirusnega vektorja Ad5-nCoV, ki je kot eno prvih cepiv proti SARS-CoV-2 vstopilo v klinično vrednotenje (9). V prvi fazi kliničnega preskušanja je tudi že adenovirusno kandidatno cepivo, ki so ga razvili na Univerzi v Oxfordu (Jenner Institute) (ChAdOx1). Že v prvi fazi bodo s tem cepivom cepili več kot 1000 prostovoljcev (32). Vstop v klinično raziskavo so omogočili tudi dobri rezultati predklinične raziskave na opicah rezus makakih, izvedene na ameriškem inštitutu Rocky Mountain Laboratories (30). Farmacevtska družba Johnson&Johnson razvija cepivo na osnovi adenovirusnega



**Slika 1:** Pregled platform potencialnih cepiv proti novemu koronavirusu. A) Atenuirano (oslabljeno) cepivo: virus SARS-CoV-2 nosi mutacije, zaradi katerih se v vakciniranem posamezniku slabše pomnožuje in ne izzove bolezni. B) Inaktivirano cepivo: virus SARS-CoV-2 ni sposoben pomnoževanja, saj ga inaktiviramo s kemijskimi ali fizikalnimi dejavniki, ohrani pa vse svoje antigene. C) Replikativni virusni vektor: oslabljen rekombinantni virusni vektor drugačnega tipa (npr. virus ošpic) izkoristimo za vnos genov, ki kodirajo antigene virusa SARS-CoV-2. D) Nereplikativen virusni vektor: rekombinantni virusni vektor drugačnega tipa (npr. adenovirus) izkoristimo za vnos genov, ki kodirajo antigene virusa SARS-CoV-2. E) Rekombinantne proteinske podenote strukturnih proteinov SARS-CoV-2 (npr. proteinov S in M). F) Virusu podobni delci: virusna ovojnica SARS-CoV-2 brez genskega materiala. Antigen predstavitvene celice (APC) virusne delce ali njihove proteinske komponente sprejmejo s fagocitozo in posamezne virusne antigenske determinante (epitope) predstavijo na svoji površini, vezane na poglobitni histokompatibilnostni kompleks tipa II (zeleno), T-celicam pomagalkam (ni prikazano), ki uravnavajo humoralno in celično komponento pridobljenega imunskega odziva. Prirejeno po (30). Slika je izrisana s programom BioRender.

**Figure 1:** Depiction of platform for new coronavirus vaccine in development. A) Attenuated vaccine: SARS-CoV-2 virus harbours mutations which hamper its replication, thus making it less likely to cause disease. B) Inactivated vaccine: SARS-CoV-2 virus is incapable of replication due to chemical or physical treatment. It does, however, retain its antigens. C) Replicating viral vector: an attenuated unrelated recombinant viral vector (such as weakened measles) is used to introduce genes encoding SARS-CoV-2 viral antigens. D) Non-replicating viral vector: recombinant unrelated virus (such as adenovirus) is used to transduce cells with SARS-CoV-2 viral antigens. E) Recombinant SARS-CoV-2 viral structural protein subunits (e.g., spike (S) and membrane (M) proteins). F) Virus-like particles: empty SARS-CoV-2 shell (i.e. containing no genetic material). Antigen-presenting cells (APC) engulf viral particles or their subunits by fagocytosis and process the antigens to display individual antigenic determinants (epitopes) bound to type II major histocompatibility complex (in green) on the surface. This leads to activation of helper T cells (not shown), which regulate both humoral and cell adaptive immune responses. Adapted from (30). Figure was drawn with BioRender.



**Slika 2:** Cepiva proti virusu SARS-CoV-2 na osnovi nukleinskih kislin. Strategija temelji na vnosu genske informacije za posamezne proteine virusa SARS-CoV-2 v celice vakciniranega posameznika. Golo DNA vnašamo v celice z elektroporacijo, cepiva na osnovi RNA pa praviloma vgradimo v liposome, ki se zlijejo s celično membrano. Celice na osnovi vstavljenih genov izdelajo virusne proteine in jih izločijo, nakar jih sprejmejo in procesirajo antigen predstavitvene celice (APC). Hkrati celice epitope virusnih proteinov predstavljajo na svoji površini, vezane na poglobilni histokompatibilnostni kompleks tipa I (oranžno), s čimer se v prepoznavanje antigena vključijo tudi citotoksični limfociti T, ki so nosilci celične imunosti (ni prikazano). Prirejeno po (30). Slika je izrisana s programom BioRender.

**Figure 2:** Nucleic acid-based SARS-CoV-2 vaccines. Genetic information encoding individual viral proteins is introduced directly into cells of vaccinated individuals. Electroporation is used to increase uptake of naked DNA, while RNA is typically packaged into liposomes which fuse with plasma membrane. Using the genetic information, transfected cells produce and secrete viral proteins. These, in turn, are processed by antigen-presenting cells (APC). Concomitantly, the cells display processed viral epitopes on their surface bound to type I major histocompatibility complex (in orange), engaging cytotoxic T cells, effectors of cell immunity, into antigen recognition (not shown). Adapted from (30). Figure was drawn with BioRender.

vektorskega sistema AdVac® (Janssen) z uporabo celične linije PER.C6® (9). Slabost adenovirusnega vektorskega sistema je, da nobeno cepivo, ki temelji na tej tehnologiji, še nima dovoljenja za promet. Raziskovalci iz Univerze v Hong Kongu razvijajo kandidatno cepivo na osnovi virusa influence, ki izraža tudi podenoto RBP proteina S (16). Kitajsko podjetje Shenzhen Geno-Immune Medical Institute je razvilo kar dve kandidatni cepivi. Cepivi LV-SMENP-DC in Covid-19 aAPC temeljita na lentivirusnem vektorju, ki ima vključen zapis za podenote več virusnih proteinov (tako imenovani minigeni), nosi pa tudi imunomodulatorne gene, ki aktivirajo antigen predstavitvene celice. Ti kandidatni cepivi nista profilaktični – v klinični raziskavi (NCT04276896 in NCT04299724 (9)) vključujejo bolnike s covid-19. Tem odvzamejo antigen predstavitvene celice, ki jih *ex vivo* transducirajo z lentivirusnim vektorjem in vrnejo bolniku s

subkutano injekcijo. Gre torej za obliko genskega oz. celičnega zdravljenja. Pri LV-SMENP-DC zdravljenje spremlja še infuzija aktiviranih antigen-specifičnih citotoksičnih limfocitov T.

## 4 IZZIVI PRI RAZVOJU CEPIV

Razvoj cepiva je kot tek na dolge proge, a časa v trenutnih razmerah pandemije covid-19, ki hromi naša življenja, nimamo na pretek. Podobno kot pri razvoju drugih zdravil tudi varnost in učinkovitost cepiv vrednotimo v znanstveno osnovanih (pred)kliničnih raziskavah. Ena osrednjih težav,



ki spremlja razvoj cepiva, je ocenjevanje njegove učinkovitosti. Trenutno interakcije med virusom SARS-CoV-2 in imunskim sistemom človeka relativno slabo poznamo; ni še jasno, ali naravno prebolela okužba izzove (dolgotrajno) imunost. V predklinični fazi razvoja si pogosto pomagamo z živalskimi modeli bolezni, a ti za virus SARS-CoV-2 še niso vzpostavljeni in validirani (virus se v običajnem poskusnem modelu – miših, tudi transgenih, ki izražajo človeški ACE2 (33) – namreč slabo pomnožuje; alternativo predstavljajo primati). Poskusne živali po cepljenju izzovemo z virusom in opazujemo, ali jih cepivo zaščiti pred boleznijo. Tudi če živali niso dober gostitelj virusa, lahko vrednotimo morebitno nevtralizacijsko sposobnost protiteles, ki se pojavijo v njihovem serumu po imunizaciji s cepivom, v poskusih s človeškimi celicami, ki jih izzovemo z virusom *in vitro*. Indukcija protiteles pri cepljenju namreč še ne zagotavlja zaščite pred virusno okužbo. Izkušnje s predkliničnim razvojem cepiv proti sorodnemu virusu SARS-CoV-1 (na osnovi oslabljenih ali inaktiviranih virusov, vektorskih vakcin in rekombinantnega proteina S) so sicer ohrabrujoče, saj so praviloma nudila zaščito poskusnim živalim pred razvojem infekcijske bolezni ali pa je ta potekala v blažji obliki (34). Vendar obstajajo tudi poročila o nepričakovanih zapletih po cepljenju, kot sta poškodbi pljučnega in jetrnega tkiva. Wang in sod. (35) so ugotovili, da določeni epitopi (kratki peptidni segmenti iz strukture glikoproteina S), ki so jih uporabili kot cepivo proti SARS-CoV-1, v opicah rezus makakih celo okrepijo replikacijo virusov po naknadni okužbi, kar privede do slabše prognoze. Ta pojav je posledica indukcije nenevtralizirajočih protiteles, ki se vežejo na virus in mu omogočijo vdor v številne celice po alternativni poti, tj. neodvisno od primarnega celičnega receptorja (ACE2) – prek endocitoze, posredovane z receptorji za regijo Fc imunoglobulinov (FcγR). Podobne mehanizme so dokumentirali pri uporabi cepiv proti virusu denga ter pri drugih naravnih okužbah s sorodnim sevom tega virusa (in v raziskavah *in vitro* s HIV, ebola in koronavirusi) (36). Izjemno pomembno je, da takšne nepredvidljive neželene učinke cepiv zaznamo že v fazi predkliničnega razvoja in številni ugledni imunologi svarijo pred prehitrim vstopom potencialnih cepiv proti SARS-CoV-2 v fazo kliničnega vrednotenja in sproščanju na tržišče (37). Predklinične raziskave v razvoju cepiv, sploh proti slabo poznanim povzročiteljem bolezni, so namreč namenjene načrtovanju optimalne platforme cepiva (upoštevajoč interakcije med gostiteljem in patogenom, režim cepljenja (odmerek, odmerni interval, način vnosa v organizem) in zaščitne imunske mehanizme) ter identifikaciji optimalne kombinacije antigena in adjuvanta za dosego želenega imunskega odziva pred preskušanjem cepiva v

kliničnih raziskavah (38). Vrednotenje cepiv poteka v treh stopnjah. Prva, opravljena na majhni homogeni skupini prostovoljcev, je osredotočena izključno na varnost cepiva. Druga proučuje imunogenost in skuša določiti optimalni odmerek, le redko zajema tudi raziskavo učinkovitosti. Šele v tretji, v katero je vključenih nekaj tisoč prostovoljcev, proučujemo, ali s postavljenim režimom cepljenja dosežemo želeno zaščito pred patogenom ob sprejemljivem tveganju za morebitne neželene učinke. Posamezne stopnje kliničnih raziskav v idealnih razmerah obsegajo večletno spremljanje vakciniranih. Žal je le majhno število cepiv proti virusoma SARS-CoV-1 in MERS-CoV doseglo prvo fazo kliničnega preskušanja (njuno širjenje so uspeli še pravočasno zamejiti, s čimer je presahnil tudi interes po nadaljevanju razvoja vakcin), zato so izkušnje s cepivi proti koronavirusom skrajno omejene. Če poznamo učinkovito zdravilo za infekcijsko bolezen, je načeloma mogoče zdrave prostovoljce po cepljenju načrtno izpostaviti patogenu, da preverimo, ali je cepivo učinkovito. Takšna strategija bi sicer močno pospešila razvoj cepiv proti SARS-CoV-2, a je zaradi slabega poznavanja (imuno)patoloških procesov covid-19 izjemno tvegana in s tem etično sporna, četudi bi v raziskavo vključili le mlajše odrasle prostovoljce, ki bolezen praviloma prebolijo v blažji obliki, in uporabili oslabljen virus (39). Ne nazadnje bo verjetno množično cepljenje proti SARS-CoV-2 tudi po razvoju uspešnega cepiva vsaj na začetku omejevala sposobnost proizvesti zadostno količino odmerkov. Nekatera atenuirana in inaktivirana virusna cepiva (npr. sezonsko cepivo proti virusu influence) lahko stroškovno učinkovito proizvajamo s pomnoževanjem v oplojenih kokošjih jajcih, kar pa za koronaviruse ni mogoče in jih bo potrebno namnožiti v sesalskih celičnih kulturah. Določene obetavne platforme potencialnih cepiv proti SARS-CoV-2 (npr. cepiva na osnovi mRNA) so popolnoma nove (do zdaj še neuveljavljene) in proizvodna infrastruktura zanje sploh še ne obstaja. Z vidika proizvodnje so verjetno najbolj dosegljiva cepiva na osnovi rekombinantnih virusovih strukturnih proteinov, a so ta v splošnem sposobna inducirati le humoralno imunost, ne pa tudi celične, ki je ključna za popolno odstranitev virusne okužbe.

## 5 SKLEP

Čeprav je zanimanje za čim hitrejši razvoj cepiva veliko, se je potrebno zavedati in upoštevati pomen vseh stopenj



razvoja, ki vodijo do varnega, kakovostnega in učinkovitega cepiva. Kljub izjemno pospešenim predkliničnim raziskavam pri iskanju cepiva za covid-19 znanstveniki opozarjajo pred prehitrim vstopom potencialnih cepiv proti SARS-CoV-2 v fazo kliničnega vrednotenja in pred prehitrim sproščanjem na tržišče, saj so vse predstopnje v razvoju izjemno pomembne za prepoznavanje morebitnih nepredvidljivih neželenih učinkov. Splošno uveljavljene platforme, kot so atenuirana in inaktivirana cepiva, zagotavljajo ustaljeno množično proizvodnjo in izkoriščajo vzpostavljeno infrastrukturo. Prednost preostalih platform je, da patogenega virusa ne potrebujemo. Pri rekombinantnih proteinskih cepivih so bistvenega pomena učinkovit ekspresijski sistem za izražanje proteina in adjuvansi za učinkovit imunski odziv. Novejše platforme, kot so cepiva na osnovi DNA in RNA, prinašajo pomembne prednosti, a tudi izzive, ki so povezani predvsem z načinom dostave in varnostjo. V razvoju so tudi vektorska cepiva, ki učinkovito dostavijo virusne gene, vendar lahko že sami sprožajo imunski odziv ali pa so neučinkoviti zaradi predhodne imunosti proti vektorskemu virusu. Ne glede na uporabljeno platformo nas do cilja čaka še veliko korakov in izzivov, ki jih bo potrebno rešiti.

## 6 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo dr. Ivi Hafner Bratkovič za pomoč pri pripravi slik.

## 7 LITERATURA

- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al. *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.* *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.
- Johns Hopkins University Coronavirus Resource Center. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG et al. *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.* *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
- Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. *Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed.* *N Engl J Med.* 2020;382:1969-73.
- Dhama K, Sharun K, Tiwari R, Dadar M, Malik YS, Singh KP et al. *COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics.* *Hum Vaccin Immunother.* 2020;1-7.
- Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gomez Roman R, Tollefsen S, Saville M et al. *The COVID-19 vaccine development landscape.* *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):305-6.
- Yamey G, Schaferhoff M, Hatchett R, Pate M, Zhao F, McDade KK. *Ensuring global access to COVID-19 vaccines.* *Lancet.* 2020;395(10234):1405-6.
- The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations, COVID-19. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <https://cepi.net/covid-19/>
- NIH US National Library of Medicine ClinicalTrials.gov [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <https://clinicaltrials.gov/>
- Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. *The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention.* *Nat Rev Immunol.* 2020;20:363-74.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S et al. *Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor.* *Nature.* 2020;581(7807):215-20.
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H et al. *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2.* *Nature.* 2020;581(7807):221-4.
- Amanat F, Krammer F. *SARS-CoV-2 vaccines: status report.* *Immunity.* 2020;52(4):583-9.
- Promptchara E, Ketloy C, Palaga T. *Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic.* *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020;38(1):1-9.
- Chen WH, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME. *The SARS-CoV-2 vaccine pipeline: an overview.* *Curr Trop Med Rep.* 2020;1-4.
- WHO. *Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines.* 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- Ahn DG, Shin HJ, Kim MH, Lee S, Kim HS, Myoung J et al. *Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19).* *J Microbiol Biotechnol.* 2020;30(3):313-24.
- Coleman CM, Liu YV, Mu H, Taylor JK, Massare M, Flyer DC et al. *Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice.* *Vaccine.* 2014;32(26):3169-74.
- Jiang S, Bottazzi ME, Du L, Lustigman S, Tseng CT, Curti E et al. *Roadmap to developing a recombinant coronavirus S protein receptor-binding domain vaccine for severe acute respiratory syndrome.* *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(12):1405-13.
- Sanofi and GSK to join forces in unprecedented vaccine collaboration to fight COVID-19. 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2020/2020-04-14-13-00-00>
- Kraigher A, Ihan A, Avčin T. *Cepljenje in cepiva - dobre prakse varnega cepjenja.* . 2011: Sekcija za preventivno medicino SZD, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe, SZD Inštitut za varovanje zdravja RS.
- Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M et al. *Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2.* *Science* 2020; v tisku.
- Cohen J. *COVID-19 shot protects monkeys.* *Science.* 2020;368(6490):456-7.
- Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K et al. *A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice.* *Nature.* 2004;428(6982):561-4.
- INOVI. *INOVI expands manufacturing of COVID-19 DNA vaccine INO-4800 with new funding from CEPI.* 2020 [cited 2020 May 19]; <http://ir.inovio.com/news-releases/news->

- releases-details/2020/INOVI0-Expands-Manufacturing-of-COVID-19-DNA-Vaccine-INO-4800-With-New-Funding-from-C-EPI/default.aspx
26. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-79.
  27. Moderna. Moderna's pipeline. 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.modernatx.com/pipeline>
  28. Lundstrom K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future Sci OA.* 2018;4(5):FSO300.
  29. CureVac. CureVac's optimized mRNA platform provides positive pre-clinical results at low dose for coronavirus vaccine candidate. 2020 [cited 2020 May 19]; <https://www.curevac.com/news/curevac-s-optimized-mrna-platform-provides-positive-pre-clinical-results-at-low-dose-for-coronavirus-vaccine-candidate>
  30. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature.* 2020;580(7805):576-7.
  31. EMA. Ervebo (cepivo proti virusu Ebola Zaire [rVSVΔG-ZEBOVGP, živo]). 2020 [cited 2020 May 19]; [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/ervebo-epar-medicine-overview\\_sl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/ervebo-epar-medicine-overview_sl.pdf)
  32. University of Oxford. Oxford COVID-19 vaccine begins human trial stage. [Internet] 2020 [cited 2020 May 19]; <http://www.ox.ac.uk/news/2020-04-23-oxford-covid-19-vaccine-begins-human-trial-stage>
  33. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020; v tisku.
  34. Roper RL, Rehm KE. SARS vaccines: where are we? *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(7):887-98.
  35. Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T et al. Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect Dis.* 2016;2(5):361-76.
  36. Negro F. Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis? *Swiss Med Wkly.* 2020;150 w20249.
  37. Jiang S. Don't rush to deploy COVID-19 vaccines and drugs without sufficient safety guarantees. *Nature.* 2020;579(7799):321.
  38. Stern PL. Key steps in vaccine development. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020; v tisku.
  39. Cohen J. Infect volunteers to speed a coronavirus vaccine? *Science.* 2020;368(6486):16.

