

Koncept razvoja cjepiva utemeljenih na nukleinskim kiselinama

Preis, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:748466>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Barbara Preis

**Koncept razvoja cjepiva utemeljenih na
nukleinskim kiselinama**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj je rad prijavljen na predmetu Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na svim savjetima, pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima, sestrama, bakama i djedu koji su me motivirali i bili mi podrška tijekom cijelog studiranja, te svom dečku koji je uvijek vjerovao u mene i u teškim trenucima bio velika potpora.

Puno hvala i svim prijateljicama na lijepim uspomnama koje su nastale tijekom studiranja, te brojnim savjetima koji su studiranje učinili lakšim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Povijest cjepiva temeljenih na nukleinskim kiselinama	2
2. OBRAZLOŽENJE TEME	4
3. METODE I MATERIJALI	5
4. REZULTATI I RASPRAVA	6
4.1. mRNA CJEPIVA	6
4.1.1. Sinteza mRNA	7
4.1.1.1. Dizajniranje mRNA.....	8
4.1.1.2. Metode dostavljanja mRNA u ciljne stanice	11
4.1.2. Vrste mRNA cjepiva	14
4.1.2.1. mRNA cjepiva za infektivne bolesti	14
4.1.2.2. mRNA cjepiva za terapiju karcinoma	16
4.2. DNA cjepiva	17
4.2.1. Sinteza DNA	18
4.2.1.1. Dizajniranje DNA	20
4.2.1.2. Adjuvansi	22
4.2.1.3. Metode dostavljanja DNA u ciljne stanice	23
4.2.2. Vrste DNA cjepiva	25
4.2.2.1. DNA cjepiva za infektivne bolesti	25
4.2.2.2. DNA cjepiva za terapiju karcinoma	26
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29
7. SAŽETAK/SUMMARY	34
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

U 15. stoljeću u Kini prvi se puta spominje vakcinacija, iako se nije odvijala na način koji je danas poznat. U Kini su tada vladale velike boginje i prepoznato je da se ljudi koji su preboljeli bolest nisu više zarazili. Tada su prvi puta došli na ideju kako zaštititi zdrave ljude, a to su radili tako da su uzimali kraste s pacijenata, sušili ih i nakon toga usitnjavali u prah da bi ga zdravi pojedinci inhalirali i na taj se način zaštitili od virusa (time.com). Iako je upitno koliko je proces imunizacije bio uspješan i činjenica da se nije shvaćao mehanizam, cilj je zapravo bio isti kao i danas. Tek krajem 18. stoljeća Edward Jenner pokušao je na drugačiji način provesti vakcinaciju. Vidjevši da se mljekarice, koje su preboljele kravljje boginje, nakon toga nisu razboljele malim boginjama, uzeo je sadržaj pustula kravljih boginja i time inficirao 8-godišnjeg dječaka (www.cureus.com). Zatim ga je namjerno htio zaraziti virusom malih boginja, no neuspješno, što je značilo da je dječak imuniziran. U ovom je slučaju također razvidan određeni problem, a on se odnosi na činjenicu da su mnoge zarazne bolesti vrlo različite od kravljih boginja te da se imunizacija ne može uvijek provesti na navedeni način. Konačno, zahvaljujući Louisu Pasteuru, za kojeg se može reći da je uspješno pripremio prva cjepiva protiv antraksa i bjesnoće, pojavio se velik interes za razvojem cjepiva, te su se njihovom primjenom uspjele iskorijeniti brojne bolesti koje su predstavljale velik problem cijelom svijetu.

Danas se zna kako točno djeluju cjepiva, što može izazvati imunizaciju, kako se imunizacija provodi te koji su fiziološki temelji zaštite imuniziranoga pojedinca pri kasnijem susretu s patogenom. Antigen, koji uzrokuje aktivaciju imunosnoga sustava nakon primjene cjepiva, može biti pripremljen na više načina, te prema tome razlikujemo nekoliko vrsta cjepiva. Ranije su se proizvodila cjepiva koja su sadržavala živi atenuirani virus/bakteriju, mrtvi ili inaktivirani virus/bakteriju, ili su sadržavala proteinske ili polisaharidne komponente koje bi uzrokovale imunosni odgovor. Upravo takvo je bilo Pasteurovo cjepivo, patogen je izložio djelovanju kisika i topline kako bi ga oslabio da postane nedovoljno jak da uzrokuje bolest, ali dovoljno učinkovit u poticanju imunosnoga sustava na stvaranje protutijela. Kod ovih tipova cjepiva, patogen je odmah nakon primjene izložen stanicama imunosnoga sustava, ponajviše B limfocitima, te glavni sustav obrane predstavljaju nastali imunoglobulini. Proteinska su cjepiva ipak su nešto drugačija od klasičnih konvencionalnih cjepiva. Sadrže fragmente virusa ili bakterije koji se nazivaju toksoidi. Toksoidi su inaktivirani proteini patogena koji mogu biti konjugirani s polisaharidima, uzrokuju dobar imunološki odgovor, no ne postoji rizik od uzrokovanja bolesti.

Danas se sve veći naglasak stavlja na razvoj cjepiva temeljenih na nukleinskim kiselinama, pogotovo nakon pojave SARS-CoV-2 virusa. Nakon njihove primjene ne dolazi do reakcije na stranu DNA, odnosno RNA. Nukleinske kiseline ulaze u stanice domaćina gdje dolazi do sinteze proteina patogena temeljem DNA odnosno RNA predloška iz cjepiva. Protein potom biva predstavljen imunom sustavu te tek tada kreće reakcija koja između ostaloga dovodi do stvaranja protutijela. To je samo jedna od prednosti koju imaju ova cjepiva prema tradicionalnim jer imunski odgovor uključuje aktivaciju i B i T limfocita, a to će uzrokovati bolju obranu cijepljene osobe kad dođe u kontakt s patogenom. Osim toga, ova su cjepiva sigurnija jer ne sadrže žive komponente samoga patogena pa ne postoji opasnost od razvoja bolesti nakon primjene cjepiva (www.gavi.org). Ova su cjepiva primjenjiva i kod imunokompromitiranih osoba kod kojih je inače primjena cjepiva bila ograničena upravo zbog slaboga imuniteta, a danas se intenzivira istraživanje cjepiva koja su namijenjena za njihovo liječenje. Sljedeća bitna činjenica jest to što su cjepiva temeljena na nukleinskim kiselinama jednostavnija za proizvodnju. Nakon što je sekvenciran genom patogena i dobivena sekvenca DNA koja kodira za antigeni protein, jednostavnije je i brže dizajnirati cjepivo (www.gavi.org).

1.1. Povijest cjepiva temeljenih na nukleinskim kiselinama

mRNA je otkrivena 60-ih godina prošloga stoljeća, isto kao i liposomi koji i danas imaju ulogu u dostavljanju lijekova (ili u ovom slučaju nukleinskih kiselina) u stanice bez da dođe do promjena u njihovoj strukturi koja bi mogla utjecati na djelovanje odnosno učinak. Petnaestak godina nakon toga, znanstvenici su prvi puta došli na ideju da se mRNA "zapakira" u lipidni mjehurić kako bi sa sigurnošću stigao do ciljnih stanica, gdje bi se liposom spojio s membranom stanice oslobodivši tako mRNA u stanicu (www.nature.com). Godinama kasnije Robert Malone je uz pomoć Roberta Felgnera uklopio mRNA u jednu vrstu liposoma. Bili su to kationski liposomi s pozitivno nabijenim skupinama koje su vezale negativno nabijene skupine mRNA. Na ovaj način mRNA je uspješno dostavljena u ljudske stanice te stanice žabljega embrija. No nažalost, bez obzira na ova velika otkrića i pokušaja pripreme mRNA cjepiva protiv infektivnih bolesti (npr. cjepivo za gripu) većina farmaceutske industrije koja se bavila istraživanjem mRNA cjepiva, napuštala je ovo područje jer se smatralo da je mRNA iznimno nestabilna i da je proizvodnja preskupa, te se više bazirala na proizvodnju DNA cjepiva u tu svrhu (www.nature.com).

Međutim, unatoč tome porastao je interes za razvoj mRNA cjepiva protiv tumora, a otkrića, do kojih se tada došlo, koriste se i danas. 1997. Karikó i Weissman pokušali su razviti cjepivo protiv HIV-a, no nakon što je bilo primijenjeno na miševima, uzrokovalo je ozbiljne upalne reakcije (www.nature.com). Takva sintetizirana mRNA nakon primjene vezala se za Toll-like receptore (TLR) na makrofagima i dendritičkim stanicama, te zbog toga dovodila do upale. Uspjeli su to riješiti na način da su jednu nukleinsku bazu, uracil, zamijenili analogom pseudouracilom kojeg organizam neće prepoznati kao neprijatelja. I Moderna i BioNTech koriste na ovaj način modificiranu mRNA u svojim cjepivima protiv koronavirusa, dok CureVac, kompanija koja također istražuje mRNA cjepiva, ima drugačiji pristup. U svojim cjepivima koriste genetički slijed mRNA koji sadrži minimalan broj uracila.

1992. je prvi puta DNA primijenjena *in vivo* pri čemu je došlo do stvaranja proteina koji je uzrokovao produkciju protutijela protiv malih boginja, a prvo istraživanje provedeno je na pilićima. Gen za hemaglutinin ptičje gripe uklopljen je u vektor ptičjega retrovirusa koji se replicira, no bio je apliciran i pseudotip vektora s nedostatkom replikacije. I prvo i drugo istraživanje dovelo je do zaštite pilića koji se nisu zarazili gripom. Iako se krenulo dalje u istraživanje DNA kao cjepiva radi loših svojstava mRNA, ovi rezultati dočekani su s velikom dozom skepse (Fynan i sur., 2018.). Ubrzo nakon toga Margaret Liu, Jeff Ulmer i John Donnelly dokazali su kako DNA može aktivirati CD8+ T limfocite, David Weiner je opisao stvaranje protutijela na virus humane imunodeficijencije (HIV), te je predstavljena intramuskularna primjena DNA cjepiva (Fynan i sur., 2018.). Nastavilo se istraživanje na kokošima, no ovaj puta s plazmidom sisavaca koji je sadržavao i gen za hemaglutinin koji je bio pod kontrolom eukariotskoga promotora. Nakon kokoši, istraživanja su se počela izvoditi i na miševima kod kojih se provodila primjena na više načina, intramuskularno, intravenski, intranazalno i uz pomoć genskoga pištolja. Rezultati su bili pozitivni, 95 % miševa preživjelo je smrtonosni virus gripe. S obzirom na rezultate, 1996. FDA ističe kako treba uzeti u obzir cjepiva koja se temelje na DNA i razmotriti smjernice za njihovu proizvodnju. Već 1998. godine u kliničkim istraživanjima našla su se cjepiva protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV), malarije, hepatitis virusa tipa B i herpesa. Iako se može reći kako su DNA cjepiva vrlo brzo došla do kliničkih istraživanja, danas još ne postoji niti jedno DNA cjepivo za primjenu kod ljudi, a smatra se da su uzroci toga pokušaji razvoja cjepiva za kronične bolesti kojima je teško definirati metu, te niska imunogenost cjepiva koja je u novijim istraživanjima poboljšana.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cjepiva se smatraju jednim od bitnijih napredaka u području zdravstva. Njihovim korištenjem uvelike se smanjila stopa smrtnosti uzrokovana različitim zaraznim bolestima, dok su pojedine bolesti uspješno iskorijenjene upravo zahvaljujući cjepivima. Donedavno su se koristila isključivo konvencionalna cjepiva koja jesu učinkovita, no novijim pristupom razvoju cjepiva mogla bi se postići još bolja učinkovitost, odnosno imunizacija. Cjepiva temeljena na nukleinskim kiselinama postojala su kao koncept, ideja, još prije trideset godina, no put razvoja takvih cjepiva bio je vrlo izazovan. Razvoj mRNA cjepiva stagnirao je nekih petnaestak godina, a nakon 2010. ponovno se povećao interes za razvojem takvih cjepiva, te je rastao i broj kliničkih istraživanja. Pojava koronavirusa dovela je do prvoga mRNA cjepiva odobrenoga za humanu primjenu. DNA cjepiva trenutno su odobrena samo za veterinarsku primjenu, no kao i za mRNA, trenutno su aktivna brojna klinička istraživanja za primjenu kod ljudi.

U ovom radu bit će opisani procesi proizvodnje mRNA i DNA cjepiva, te načini modificiranja elemenata cjepiva koji pridonose većoj imunogenosti, učinkovitosti i sigurnosti. Također, bit će opisani i načini aplikacije cjepiva, kao i metode dopremanja nukleinskih kiselina u stanice o kojim ovisi jakost imunogenog odgovora i postizanje zaštite. Također, bit će spomenute i bolesti za čije se liječenje trenutno ispituju brojna mRNA i DNA cjepiva.

3. METODE I MATERIJALI

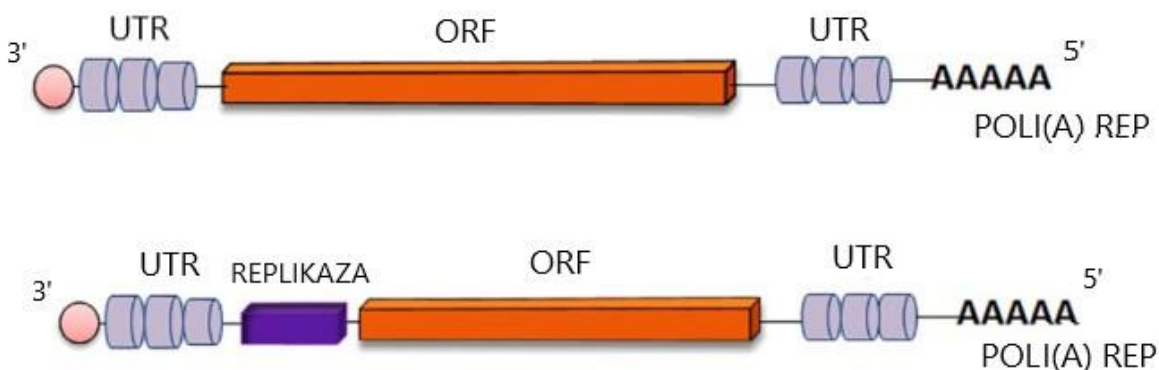
Za izradu ovoga teorijskog diplomskog rada pregledana je znanstvena i stručna literatura objavljena u razdoblju od 2000. godine do danas dostupna na bibliografskim bazama PubMed i ScienceDirect. Ključne riječi koje su se koristile tijekom pretraživanja informacija za izradu rada su: *history of vaccination, DNA/mRNA vaccine development, delivery systems for DNA/mRNA vaccines, mRNA vaccine for infectious diseases, cancer vaccines, adjuvants.*

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. mRNA CJEPIVA

Iako su znanstvenici ili znanstveni timovi krajem 90-ih godina prošloga stoljeća odustali od mRNA u smislu razvoja cjepiva za prevenciju raznih bolesti i usmjerili istraživanja u drugom smjeru, prije par godina ipak se ponovno počelo s istraživanjima i razvojem ovakvih cjepiva. Radom na DNA došlo se do zaključka da se mnoga otkrića mogu primijeniti i na RNA, kao npr. proizvodnja, regulative i dizajniranje sekvenci (Dolgin, 2021.). Za početak, mRNA je jednolančana RNA (engl. *single-stranded RNA*, ssRNA) koja sadrži genetičku informaciju koja je u procesu transkripcije prepisana s DNA. mRNA nadalje u procesu translacije određuje slijed aminokiselina u odgovarajućem proteinu. U cjepivima se koriste tri glavna tipa mRNA: konvencionalna mRNA, samoumnjažajuća RNA i kružna RNA (Yangyhuo i sur., 2022.).

Konvencionalna neumnažajuća mRNA cjepiva, počevši od 5'-kraja, sadrži kapu koju čini 7-metilgvanozin koji je bitan jer omogućuje početak same translacije, zatim područja koje se ne transliraju (engl. *untranslated region*, UTR) i nalaze se i na 5'- i na 3'-kraju molekule. Te dvije regije se ne prevode u protein, već se između njih nalazi slijed nukleotida koji kodira za željeni protein, a naziva se otvoreni okvir čitanja (engl. *open reading frame*, ORF). Na samom kraju takve mRNA nalazi se tzv. poli-A rep čija duljina povećava stabilnost mRNA i translaciju, a s druge strane sprječava njezinu razgradnju nukleazama. Samoumnjažajuća mRNA cjepiva se razlikuju utoliko što kodiraju i kompleks RNA ovisne RNA-polimeraze koja omogućuje unutarstanično umnažanje mRNA, te pojačanu ekspresiju proteina. Upravo zbog tog kompleksa, samoumnjažajuća mRNA uzrokuje veću proizvodnju proteina kroz dulje vrijeme, te bolji odgovor imunosnoga sustava, međutim njihova veličina čini proizvodnju i stabilnost samih cjepiva izazovnijom i zahtjevnijom (Kowalzik i sur., 2021.).



Slika 1. Konvencionalna i samoumnjažajuća mRNA (www.scienceopen.com)

Kružna mRNA je jednolančana mRNA čiji su 5'-kraj i 3'-kraj kovalentno spojeni u krug. Zbog toga nije prepoznata od strane nukleaza, te je stabilnija i nije potrebna modifikacija nukleozida koja je kod konvencionalnih i samoumnažajućih cjepiva utemeljenim na RNA potrebna (Hou i sur., 2021.;Kowalzik i sur., 2021.). Ovaj tip mRNA nema stop kodon što omogućuje kontinuiranu translaciju i ekspresiju proteina.

4.1.1. Sinteza mRNA

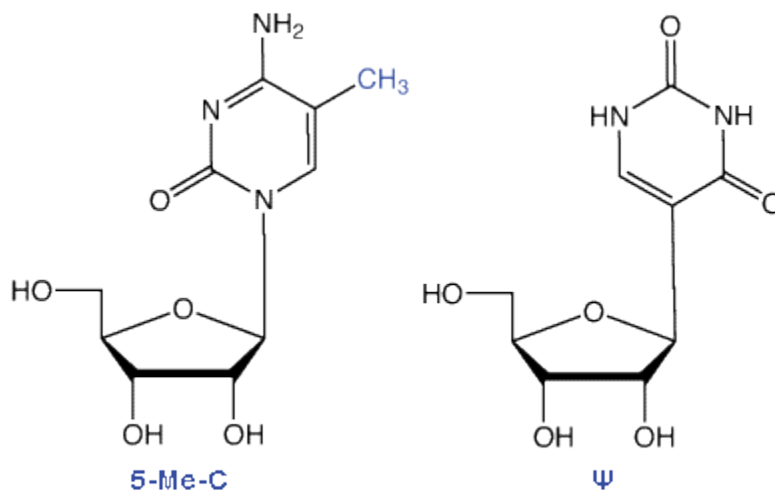
Za dobivanje mRNA dizajnirana je odgovarajuća plazmidna DNA. Iz nje se u par koraka, koji obuhvaćaju linearizaciju DNA, transkripciju u mRNA i razgradnju DNA predloška, dobiva mRNA. mRNA se potom uklapa u lipidne nanočestice. Iznimno je bitna kvaliteta DNA koja se dobije nakon linearizacije plazmida. Njenoj kvaliteti pridonosi sljedeće: prisutnost samo jednolančane DNA kod koje je omjer superuzvoja najmanje 70 % i prisutnost informacije za poli(A) rep koji je odgovarajuće veličine za osiguravanje translacije u ljudskim stanicama (Whitley i sur., 2022.). Nakon linearizacije nastupa transkripcija u mRNA koju vrši rekombinantna RNA-polimeraza, a to je najčešće bakteriofagna T7. Osim samoga enzima, za *in vitro* transkripciju (IVT) potrebni su i nukleozid-trifosfati (ATP, GTP, CTP), te pseudouridin-trifosfat ili neka druga modificirana baza koja neće aktivirati imunوسي sustav domaćina. Zatim, u idućem procesu potrebno je ukloniti i sve ostatke DNA koja se razrađuje pomoću enzima deoksiribonukleaze (DNaze). Kada su ovi procesi gotovi, slijedi pročišćavanje da bi ostala čista mRNA. Pročišćavanje obuhvaća uklanjanje ostataka supstrata, proteina, pufera, dvolančane RNA (engl. *double-stranded RNA*, dsRNA) i kratkih fragmenata RNA koji bi mogli izazvati imunوسي odgovor, te bi u velikoj mjeri smanjili učinkovitost samoga cjepiva jer bi imunوسي odgovor bio usmjeren na onečišćenja u samom cjepivu, a ne na protein patogena koji nastaje ulaskom mRNA iz cjepiva u stanicu (Gu i sur., 2022.). Prvo se vrši otapanje bilo kakvih ostataka koji su se istaložili tijekom prethodnih reakcija, zatim tangencijalna filtracija (engl. *crossflow*) kojom se uklanjaju supstrati koji su bili neophodni za IVT, slijedi uklanjanje dsRNA i ostalih onečišćenja koji se mogu ukloniti kromatografijom (Whitley i sur., 2022.). Još jednom se vrši tangencijalna, te potom sterilna filtracija kojima se konačno dobiva pročišćena mRNA spremna za idući korak u proizvodnji cjepiva. No i dalje postoji opasnost da bi preostala dsRNA mogla aktivirati urođeni imunوسي odgovor zbog čega se još može provesti i anion-izmjenjivačka kromatografija, afinitetna oligo dT kromatografija ili „hydrogen bond“ kromatografija čime se

dobiva mRNA još većeg stupnja čistoće (Gu i sur., 2022.). Način uklanjanja onečišćenja kod afinitetne oligo dT kromatografije je taj da se poli(A) rep veže za oligo dT krajeve, dok se ostale komponente ispiru i uklanjaju. Što se tiče druge dvije metode, dsRNA i DNA, one se ispiru s 1 M NaCl i 10 mM EDTA, a ssRNA se kod anion-izmjenjivačke uklanja promjenom pH, odnosno kod „hydrogen bond“ kromatografije promjenom gradijenta pirofosfata. Pirofosfat je difosfat koji ovisno o pH ima do 4 negativna naboja i do 18 donora/akceptora vodikove veze (Gagnon i sur., 2020.). Glavna razlika između ove dvije metode je u tome što, s obzirom na pirofosfat, kod „hydrogen bond“ kromatografije, ligandi su obogaćeni donorima/akceptorima vodikove veze (80 % vezanja čine vodikove veze), zbog čega se mRNA puno čvršće veže, pogotovo pri nižem pH.

4.1.1.1. Dizajniranje mRNA

Što se tiče dizajniranja mRNA, bitno je reći da se modifikacijom njezinih komponenti povećava njezina stabilnost, učinkovitost translacije i odlika mRNA da aktivira imunski sustav (Kim i sur., 2021.). Ukoliko bi došlo do aktivacije imunskog sustava, preko Toll-like receptora došlo bi do sinteze i izlučivanja interferona, te daljnjom aktivacijom stanica imunskog sustava naspram mRNA translacija željenoga proteina ne bi bila uspješna. Modifikacijom ORF-a poboljšava se ekspresija proteina, a uključuje optimizaciju kodona i modifikaciju nukleozida. Optimizacija kodona uključuje zamjenu kodona rjeđe uporabe s kodonima koji se češće upotrebljavaju što će u konačnici ubrzati translaciju (Cannarozzi i sur., 2010.). Prisutnost Kozak sekvence (ACCACCAUGG) bitna je za početak translacije i vezanje ribosoma na startni kodon AUG dok stop kodon može biti modificiran. Također je dokazano da će mRNA, koja sadrži veću količinu gvanozinskih (G) i citidinskih nukleozida (C) te tako umanjen sadržaj uridinskih nukleozida (U), imati pozitivan učinak na imunogenost. Jedini problem je u tome što se kod mRNA s većim sadržajem GC-a može javiti poteškoća sa sekundarnom strukturom. Modifikacijom nukleozida postiže se bolji sigurnosni profil mRNA bez da se utječe na translaciju. U tom slučaju mijenja se adozin s N1-metiladenozinom (m1A) ili N6-metiladenozinom (m6A), citidin s 5-metilcitidinom (m5C), zatim uridin s 5-metiluridinom (m5U), 2-tiouridinom (s2U), 5-metoksiuridinom (mo5U), pseudouridinom (ψ) ili N1-metilpseudouridinom (m1 ψ). Od svih navedenih nukleozida, najčešće se upotrebljavaju

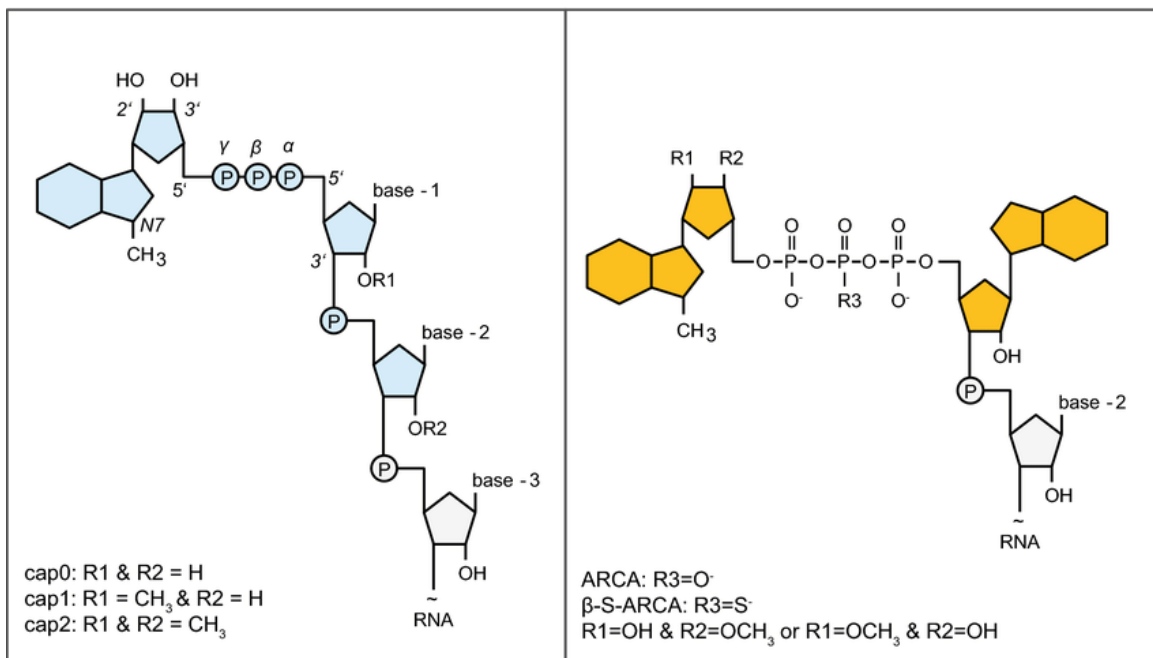
pseudouridin i 5-metilcitolin jer su se pokazali najučinkovitiji *in vitro* i *in vivo* (Weng i sur., 2020.).



Slika 2. 5-metilcitolin i pseudouridin (www.glenresearch.com)

Promjenom strukture i duljine UTR-a također se može utjecati na uspješnost translacije, ali i stabilnost mRNA. UTR se nalazi na oba kraja ORF-a, što znači da postoji 5'-UTR i 3'-UTR. Za 5'-UTR bitno je da je kratak jer će na taj način mRNA molekula imati, između ostalog i labavu sekundarnu strukturu čime će se olakšati vezanje ribosoma, te će translacija biti uspješnija (Liang i sur., 2021.). Preko 3'-UTR-a može se još utjecati i na poluvrijeme trajanja života mRNA i to tako da se koristi 3'-UTR α - i β -globina. Moguće je kombinirati i izmjeniti ih ili pak koristiti dva β -globinska 3'-UTR koja su međusobno spojena „head-to-tail“. Na ovaj način poluvrijeme života može se povećati za jedan dan. Dodavanje kape može se izvršiti ko-transkripcijski gdje ju dodaje RNA polimeraza ili posttranskripcijski uz „vaccinia capping“ enzim i supstrat koji je donor metilne skupine. Postoje tri tipa kapa koje se dodaju na 5'-kraj tijekom ili nakon transkripcije, a nakon što su dodane, štite mRNA od djelovanja enzima alkalnih-fosfataza i 5' \rightarrow 3' egzonukleaza. Kapa ima ulogu i kao vezno mjesto za translacijski inicijacijski kompleks eIF4F, te je bitna za pre-mRNA prekrajanje (engl. *splicing*), izrezivanje introna i spajanje eksona u zrele funkcionalnu mRNA (Kim i sur., 2021.). Cap-0 predstavlja metilgvanozin koji je preko trifosfata vezan na prvi nukleotid mRNA (m⁷GpppN). Hidroksilne skupine riboze na položaju dva prvoga nukleotida u Cap-1, te kod Cap-2 prva dva nukleotida, metilirane su kako bi se zaštitile od djelovanja ribonukleaza (RNAza). Danas su u cjepivima, uz Cap-1 (CleanCap), najviše zastupljeni analozi kape koji se zovu „anti-reverse cap analogues“ (ARCAs). Oni su modificirani

kako bi se povećala uspješnost translacije, a pokazano je i da mRNA s modificiranom kapom ima dulji poluvijek, te da je pojačana i produljena ekspresija proteina u tim stanicama (Zohra i sur., 2007.; Grudzien i sur., 2006.). Primjeri ARCA-a su metilacija riboze gvanozina u položaju 3 (3'-O-Me-m⁷GpppN) ili zamjena kisika sa sumporom u trifosfatnom mostu (β -S-ARCA).



Slika 3. Prikazi Cap-0, Cap-1 i Cap-2 (lijevo) i modificirani analozi kape (desno) (www.researchgate.net)

Poli(A) rep kod eukariota može biti različitih duljina, a sudjeluje u regulaciji stabilnosti, transporta i translacije mRNA (Liang i sur., 2021.). Smatra se da su struktura i duljina poli(A) repa najvažnija za uspješnost translacije, a idealna duljina koja bi odgodila degradaciju mRNA je oko 100 nukleotida. Nakon transkripcije on je, kao i 5' kapa, podložan modifikacijama uz poli(A)-polimerazu koja sprječava deadenilaciju koju vrši enzim poli(A) specifična nukleaza. Ovaj proces naziva se enzimska poliadenilacija, a tijekom njega dolazi do kidanja mRNA na poli(A) mjestu i ugradnje poli(A) repa. Ovaj je korak moguće izbjeći tako da se poli(T) rep klonira u DNA predložak pri čemu će tijekom transkripcije doći do njegovog prevođenja u poli(A) (Li i sur., 2022.). Kada je transkripcija gotova i mRNA se nađe u citoplazmi, 5' kapa i poli(A) rep zajedno s kompleksom eIF4F formiraju strukturu zatvorene petlje i tada počinje inicijacijski dio translacije.

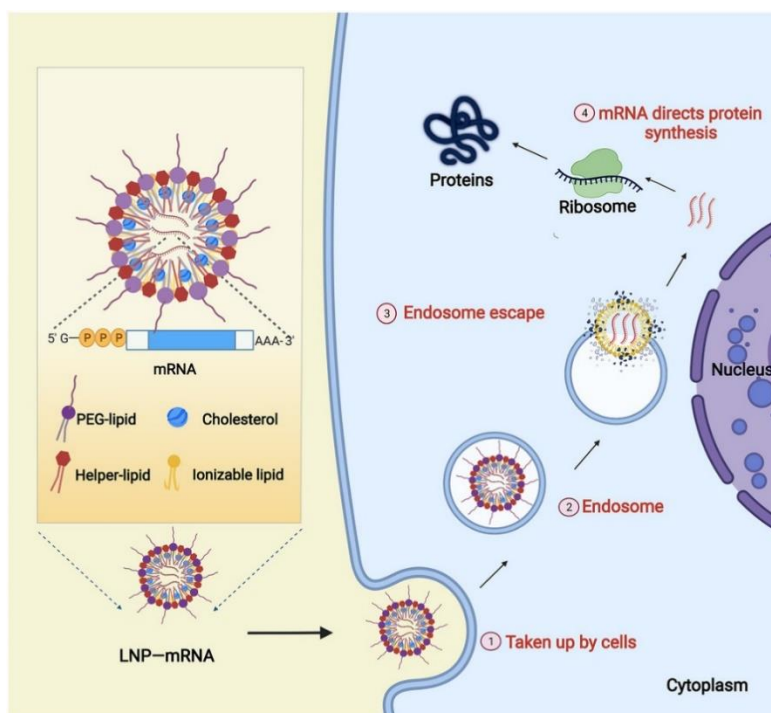
4.1.1.2. Metode dostavljanja mRNA u ciljne stanice

O putu primjene također ovisi sigurnost i učinkovitost cjepiva. Najčešći način primjene mRNA cjepiva je intramuskularni. Intravenskom primjenom proizvodi se najveći broj antigena jer je cjepivo izravno dostupno imunskim stanicama i limfoidnim organima, no nedostatak je smetnja koju čine proteini plazme i enzimi (Nitika i sur., 2022.). Moguća je još i intradermalna primjena s obzirom na prisutnost Langerhansovih stanica i dendritičkih stanica u koži koje odlaze u obližnje limfne čvorove, te subkutana primjena čiji je nedostatak niska apsorpcija, zbog koje može doći do razgradnje mRNA. Moguće su još intranodalne i intranazalne injekcije.

Molekulu mRNA moguće je dostaviti do stanica bez korištenja nosača, što ima neke prednosti kao što je jednostavnost pripreme, skladištenje i isplativost (Ramachandran i sur., 2022.). No zbog podložnosti razgradnji RNazama i nemogućnosti mRNA da prijeđe membranu stanica, uglavnom se koriste nosači. Sustavi koji služe za dostavu mRNA do ciljnih stanica imunsnoga sustava, najviše antigen prezentirajućih stanica (APC), mogu biti nosači kao što su lipidne nanočestice, polipeptidi ili polimeri, te dendritičke stanice u koje je *ex vivo* unesena mRNA .

Lipidne nanočestice (LNP) su nosači koji štite mRNA od degradacije. Iznimno su učinkoviti u njezinom dostavljanju u stanični citosol, te se dugo se zadržavaju u cirkulaciji (Li i sur., 2022.). Oni se sastoje od tzv. PEG-iliranih (polietilenglikol) lipida, kolesterola, neutralnih lipida, te ionizirajućih, kationskih lipida (Gu i sur., 2022.). Lanci PEG-a nalaze se s vanjske strane LNP-a i sprječavaju spajanje s drugim lipidnim česticama, te olakšavaju prepoznavanje od strane imunsnoga sustava i produljuju poluvrijeme života formulacije. Kolesterol služi za čvrstoću čestica čime povećava njihovu stabilnost i omogućuje vezanje s membranom ciljnih stanica što olakšava fuziju i oslobađanje mRNA u stanicu. Neutralni lipidi, odnosno saturirani fosfolipidi, također održavaju fosfolipidni dvosloj stabilnim. Kod kationskih lipida glavu često čine tercijarni ili kvarterni amini koji stvaraju stabilne komplekse s mRNA koji se nazivaju lipopleksi (Zhang i sur., 2022.). Kvarterni amini su pozitivni i pri nižem i pri neutralnom pH, čvrsto vežu mRNA i smanjuju njezinu razgradnju, no zbog pozitivnog naboja mogu biti citotoksični i dovesti do ekstracelularnoga oslobađanja sadržaja zbog vezanja za negativno nabijene molekule u serumu. Zbog toga se uglavnom koriste tercijarni amini koji su pri neutralnom pH nenabijeni, pa ne dolazi do interakcije s komponentama u serumu, a pri nižem se pH ioniziraju i vežu za negativno nabijene molekule na površini stanica, destabiliziraju membranu te dolazi do poželjne endocitoze

(Gu i sur., 2022.; Zhang i sur., 2022.). U kationske lipide ubrajaju se DOTMA (1,2-di-*O*-octadecenil-3-trimetilamonij-propane), koji se koristi u cjepivima protiv kolorektalnoga karcinoma i melanoma, i DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonij-propane) koji se isto koristi u terapiji kolorektalnoga karcinoma te kao profilaksa kod raznih virusnih bolesti kao što su bolesti izazvane HIV-om, citomegalovirusom (CMV) i respiratornim sincicijskim virusom (RSV) (Hou i sur., 2021.; Brito i sur., 2014.). U cjepivima protiv korona virusa koristili su se noviji, sintetički kationski lipidi dobre farmakokinetike i odlične sposobnosti dostavljanja mRNA do stanica, a to su SM-102 (Moderna) i ALC-0315 (BioNTech). Iako imaju mnoge benefite, velik nedostatak im je opasnost od alergijskih reakcija (temperatura, bol, oticanje) čiji uzrok mogu biti kationski lipidi koji dovode do stvaranja proupalnih citokina IL-1 β i IL-6 i posljedično navedenih simptoma (Gu i sur., 2022.). No osim kationskih lipida, do ovoga može doći i zbog reakcije na PEG zbog stvaranja anti-PEG protutijela nakon cijepjenja prvom dozom cjepiva (Polack i sur., 2020.).



Slika 4. Unos mRNA u stanicu putem lipidnih nanočestica (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Polipeptidi se također proučavaju za dostavljanje mRNA zbog velikog broja pozitivno nabijenih aminskih skupina koje potječu od aminokiselina kao što je arginin. Protamin je smjesa kationskih polipeptida koji, s jedne strane spontano veže mRNA zbog velike količine pozitivnog naboja te tako štiti mRNA od razgradnje nukleazama, a s druge strane služi i kao pomoćno

sredstvo u cjepivu. Kompleks mRNA-protamin, ovisno o veličini, ima različit utjecaj na stanice imunosnoga sustava. Veće čestice aktiviraju monocite i potiču lučenje tumorskoga nekrotičnog faktora alfa (TNF α), dok čestice manje od 450 nm stimuliraju dendritičke stanice na lučenje interferona alfa (IFN α) (Rettig i sur., 2010.). Primjena protamina kao nosača trenutno je ograničena radi smanjene učinkovitosti u translaciji mRNA i samim time slabijega stvaranja imunosti. Uzrok tome može biti prevelika hidrofilnost protamina zbog koje puno teže, u odnosu na LNP, ulazi u stanice i oslobađa mRNA u citosol. Trenutno se ovaj problem pokušava riješiti tako da se poveća hidrofobnost čestice dodatkom kationskih lipida ili dodatkom destabilizirajućih agensa koji olakšavaju oslobađanje mRNA unutar stanice (Siewert i sur., 2020.).

Korištenje polimera kao nosača bila bi dobra opcija s obzirom na učinkovitost dostavljanja mRNA do ciljnih stanica i održavanja molekule mRNA stabilnom, ali je također i limitirano s obzirom na njihove toksične učinke. Polimeri koji se istražuju su polietilenimin (PEI), poliamidoamin dendrimer (PAMAM) i polisaharidi. PEI ima jedinstvene prednosti kao nosač mRNA. Kako raste njegova molekulska masa, povećava se i prijenos mRNA, no isto tako i njegova toksičnost. Cjepivo protiv HIV-a koje sadržava mRNA koja kodira za glikoprotein gp120 HIV-a, kod miša je uzrokovalo nastanak velike količine protutijela na virus, no zbog toksičnosti nije moguća klinička primjena. Isto vrijedi i za PAMAM dendrimer s kojim je razvijeno učinkovito cjepivo, također kod miševa, protiv Zika virusa, H1N1 i Ebole (Chahal i sur., 2016.). U budućim istraživanjima potrebno je naglasak staviti na promjenu strukture ili uvođenju nekih pomoćnih molekula kojima bi se očuvale dobre strane polimernih nosača, a u velikoj mjeri smanjila njihova toksična djelovanja (Li i sur., 2022.).

Najpotentnije antigen prezentirajuće stanice imunosnoga sustava jesu dendritičke stanice koje preko MHC I i MHC II molekula prezentiraju antigene T limfocitima, i CD8+ i CD4+. Osim T limfocita aktiviraju i B limfocite koji stvaraju protutijela. Upravo zbog ovoga razloga smatra se da bi bile dobre za transfekciju mRNA cjepivima, a osim što su učinkovite, nema potrebe za korištenjem klasičnoga nosača već se mRNA *ex vivo* unosi u dendritičke stanice elektroporacijom. To je proces gdje pod utjecajem visokoga napona u membrani stanica nastaju pore, te mRNA kroz pore ulazi u citoplazmu dendritičkih stanica. Ovakve dendritičke stanice, napunjene mRNA, unose se u primatelja autolognoga cjepiva i pokreće se stanicama posredovan imunosti odgovor zbog čega se ovakva cjepiva uglavnom koriste za terapiju karcinoma (Pardi i

sur., 2018.). Problemi koji se ovdje javljaju jesu veliki troškovi, proces formulacije je složen, a i predstavlja izazov u smislu ponovljivosti (Sasaki i sur., 2022.). Iduće generacije ovih cjepiva bit će usmjerene na promjenu s *ex vivo* na *in vivo* modifikaciju dendritičkih stanica na način da će mRNA biti kapsulirana u nanočestice koje će imati ligande specifične za receptore na dendritičkim stanicama (Benteyn i sur., 2014.). Stoga će na različite načine mRNA biti ciljano isporučena dendritičkim stanicama što bi rezultiralo širim imunskim odgovorom.

4.1.2. Vrste mRNA cjepiva

Do Covida-19 koji se pojavio 2019. godine, sva klinička istraživanja mRNA cjepiva bila su usmjerena na cjepiva za liječenje malignih bolesti kao što su melanom, karcinom prostate, akutna mijeloidna leukemija i HIV. No od 2020. kada su uspješno razvijena mRNA cjepiva protiv infektivne bolesti koja je uzrokovala globalnu pandemiju, mnoga mRNA cjepiva za prevenciju infektivnih bolesti i liječenje karcinoma došla su do kliničkih istraživanja. Krenulo se još i u istraživanje cjepiva za genetske i kardiovaskularne poremećaje. Što se tiče genetskih poremećaja, istraživanja su uglavnom usmjerena na nedostatak metaboličkih enzima što dovodi do nemogućnosti obrade metaboličkih produkata. U cjepivima za takve bolesti dodaje se gen za ekspresiju tog enzima, i transkripcijom mRNA dolazi i do njegove sinteze, te se tako usporava napredak bolesti. Kod kardiovaskularnih poremećaja ciljna meta je proprotein konvertaza subtilizin/keksin tipa 9 (PCSK9) koji dovodi do hiperkolesterolemije i ateroskleroze (Fang i Chen, 2022.). mRNA kodira Cas9 i sgRNA koje stvaraju kompleks, izrezuju dio PCSK9 lokusa i tako smanjuju sintezu kolesterola i njegovu količinu u jetri.

4.1.2.1. mRNA cjepiva za infektivne bolesti

Godišnje velik broj ljudi u svijetu umire od gripe. Sadašnja cjepiva uglavnom ciljaju protein hemaglutinin koji olakšava ulazak virusa u stanice, no kako virus vrlo brzo mutira, svake godine potrebna je modifikacija komponente hemaglutininskoga antigena (Chaudhary i sur., 2021.). Konvencionalna cjepiva često imaju dug proces proizvodnje, probleme s pročišćavanjem i pojavom mutacija virusa tijekom razvoja u kokošjim jajima zbog čega budu neučinkovita kod ljudi. Razvojem mRNA bila bi osigurana brza proizvodnja u slučaju pojave novoga soja virusa influence, a to bi moglo biti i univerzalno cjepivo koje bi osiguravalo imunost protiv nekoliko sojeva virusa gripe. Prva demonstracija učinkovitog cjepiva bila je 2012. godine. Tri

intradermalne injekcije štatile su miševе od sojeva H1N1 i H5N1. Razvojem novijih nosača mRNA, te modifikacijom mRNA (modifikacija nukleozida, te samoumnažajuća mRNA), a i otkrićem konzerviranoga epitopa hemaglutinina, koji je prisutan na većem broju sojeva, bilo bi moguće sintetizirati takvo cjepivo. Moderna je 2016. imala dva kandidata u fazi I kliničkih istraživanja. Oba se cjepiva sastoje od modificirane mRNA, koja ekspirira hemaglutinin, inkapsulirane u lipidnu nanočesticu, a primjenjiva su u dvije doze te štite od sojeva H10N8 i H7N9. Nuspojave su bile ograničene na bol na mjestu ubrizgavanja, crvenilo, bol u mišićima, bol u zglobovima, glavobolju, umor i zimicu/simptome nalik običnoj prehladi (Chaudhary i sur., 2021.).

Respiratorni sincicijski virus glavni je uzročnik akutnih infekcija donjih dišnih puteva, a trenutno još uvijek ne postoji cjepivo za prevenciju bolesti. Trenutni kandidati za cjepivo ciljaju F protein koji olakšava unos virusa u stanicu, a sadrže mRNA koja ekspirira ili nativni F protein ili stabiliziranu prefuzijsku konformaciju F proteina koja izaziva dobar odgovor protutijela. Moderna ima tri različita kandidata mRNA cjepiva u, dva za odrasle i jedno za djecu. Cjepiva za odrasle, koja su trenutno u fazi I kliničkih istraživanja, dovela su do snažnoga humoralnog odgovora uključujući razvoj protutijela, odgovor CD4+ T limfocita, te nije bilo ozbiljnih nuspojava, dok je u cjepivu za djecu mRNA dodatno optimirana da bi se pojačala translacija i povećala imunogenost cjepiva, te se trenutno nalazi u fazi II/III kliničkih istraživanja.

Cjepivo protiv bjesnoće već je odobreno, no kako i dalje dolazi do zaraze virusom bjesnoće potrebno je razviti učinkovitije cjepivo. CureVac razvio je svoje cjepivo, prvo koje nije uzrokovalo dovoljan odgovor organizma zbog slabe učinkovitosti isporuke, te drugo u kojem je mRNA inkorporirana u LNP. U predkliničkim istraživanjima drugo cjepivo dovelo je do velike proizvodnje protutijela, te aktivacije CD8+ i CD4+ T limfocita, te je bilo dobro podnošljivo.

Do danas nije razvijeno učinkovito cjepivo protiv HIV-a, iako se istražuje unazad 30 godina. Jedan od razloga svakako je antigenska raznolikost proteina ovojnice HIV-a i 'glikanskoga štita' koji skriva ključne epitope proteina ovojnice. Nova strategija cijepljenja jest izolacija široko neutralizirajućih monoklonskih protutijela VRC01 koji ciljaju CD4 vezno mjesto glikoproteinske ovojnice HIV-a, a cjepivo sadrži modificiranu mRNA, koja ekspirira VRC01, inkapsuliranu u LNP.

U fazi III kliničkih istraživanja trenutno se nalazi Modernino cjepivo protiv CMV-a, za koji još ne postoji odobreno cjepivo. Cjepivo sadrži modificiranu mRNA inkapsuliranu u LNP. CMV

uzrokuje infekciju koja inače nije veliko zdravstveni problem, no ukoliko se zarazi trudnica, može prenijeti virus na dijete što dovodi urođenih mana kao što je gubitak sluha, a teže infekcije mogu dovesti i do smrti (trials.modernatx.com).

4.1.2.2. mRNA cjepiva za terapiju karcinoma

Cjepiva za liječenje karcinoma dijele se na preventivna i terapijska cjepiva. Otprilike 15 % karcinoma kod ljudi povezuje se s virusima zbog čega cjepiva predstavljaju profilaktičku mjeru protiv određenih vrsta raka (Gu i sur., 2022.). Primjenjuju se ili uz pomoć nosača, LNP ili protamina, ili *ex vivo* transfekcijom dendritičkih stanica. Mnoga cjepiva nisu uspjela proći fazu III kliničkih istraživanja, te se došlo do zaključka da je potrebno istovremeno ciljanje više antigena povezanih s tumorima (TAA) ili neoantigena.

Više od 90 % pacijenata s melanomom izražava barem jedan od četiri TAA, a to su NY-ESO-1, MAGE-A3, tirozinaza i TPTE. BioNTech FixVAC razvija cjepivo koje je u fazi I i kodira sva četiri TAA melanoma (Gu i sur., 2022.). Cjepivo je pokazalo odlično djelovanje kod pacijenata sa stabilnom bolesti, dok je kod pacijenata s neoperabilnim melanomom 2021. počelo ispitivanje faze II u kombinaciji s Libtayo (cemiplimab). Iako se ovaj tip cjepiva istražuje još i za terapiju karcinoma prostate i nemalih stanica pluća, postoji i ograničenje vezano uz razvoj cjepiva usmjerenih na TAA. Ograničen broj TAA identificiran je za solidne tumore, te zbog čestih mutacija dolazi do otpornosti tumora na te lijekove. Osim toga TAA ciljana terapija može dovesti do autoimunih reakcija, i ozbiljnih nuspojava.

mRNA cjepiva koja kodiraju neoantigene imaju prednosti jer je ekspresija neoantigena ograničena samo na tumore, te će imunski odgovor T limfocita biti usmjeren specifično na njih i neće doći do oštećenja zdravoga tkiva, te neoantigeni uzrokuju produljeni odgovor T limfocita i aktivnost memorijskih stanica. Svaki pacijent s tumorom ima svoj jedinstveni profil neoantigena. Individualiziranim pristupom koji između ostaloga obuhvaća i sekvenciranje može se postići brza i učinkovita identifikacija i odabir neoantigena, te se može pripremiti monoklonsko ili poliklonsko mRNA cjepivo (Gu i sur., 2022.). 2017. šest pacijenata s melanomom primilo je ovaj tip cjepiva, pri čemu kod četiri pacijenta nije došlo do recidiva bolesti, a kod dva pacijenta s plućnim metastazama postignuta je remisija nakon relapsa (Gu i sur., 2022.). Trenutno je aktivno 21 kliničko ispitivanje ovakvih cjepiva. Modernino cjepivo koje kodira do 34 neoantigena završilo je fazu I, te se kombinira s pembrolizumabom za terapiju solidnih tumora. BioNTech je

razvio kombinaciju personaliziranoga mRNA cjepiva s atezolizumabom, terapiju za liječenje lokalno uznapredovalih ili metastatskih solidnih tumora (kolorektalni karcinom, trostrukonegativni rak dojke, karcinom nemalih stanica pluća). Problem ovih cjepiva jest dizajn cjepiva (HLA tipizacija, analiza TCR, jačina vezanja neoantigena i MHC) te priprema cjepiva koje može trajati do 160 dana, a pacijenti s uznapredovalim tumorima zahtijevaju što hitnije liječenje.

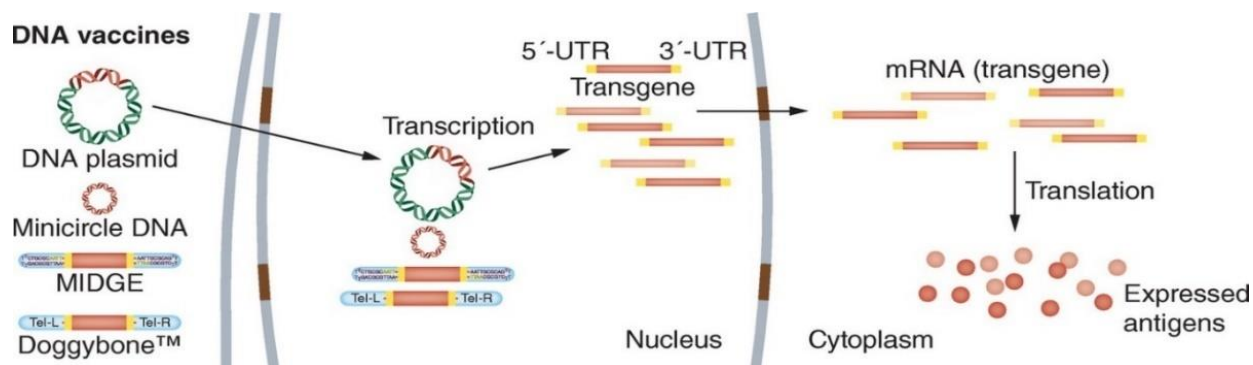
Cjepivo koje sadrži transficirane dendritičke stanice s mRNA koja kodira za TAA odobreno je 2010. za liječenje raka prostate. Funkciju dendritičkih stanica određuju kostimulacijske/koinhibitorne molekule na staničnoj površini, aktivirajući i inhibitorni citokini. Stoga, da bi se ojačala njihova funkcija, potrebno je modificirati uklopljenu mRNA. mRNA moguće je dodati sekvencu za kodiranje adjuvansa koji povećavaju imunostimulatorno djelovanje dendritičkih stanica, zatim kodiranje CD70 i CD40L, te TLR4, te je moguća i kombinacija s ipilimumabom. Iako cjepiva imaju svoje prednosti, nedostaci koji bi se prvo trebali riješiti jesu dug proizvodni proces, visoki troškovi i loše ciljanje tumora..

4.2. DNA cjepiva

Nakon što se početkom 90-ih godina 20. stoljeća mRNA počela smatrati previše nestabilnom i preskupom za izradu cjepiva, velik interes javio se za istraživanje DNA u ove svrhe. Do 2010. izašao je velik broj radova koji su se bavili upravo ovim pitanjem no tada je interes pao zbog problema koji su se javili vezano uz primjenu DNA kao cjepiva. Glavni su razlozi bili prenizak unos DNA kao plazmidne DNA (pDNA) u stanice što rezultira smanjenom imunizacijom, ugradnja pDNA u genomsku DNA i aktivacija onkogeni koji uzrokuju stvaranje karcinoma, te moguć razvoj autoimunih bolesti zbog stvaranja anti-DNA protutijela (Matić i Šantak, 2022.).

DNA cjepiva sadrže pDNA za koju se može reći da se sastoji od dva dijela. Jedan dio čine sekvencije odgovorne za ekspresiju antigena. To su virusni promotor, promotor CMV-a ili majmuskog virusa 40 su najbolji promotori za optimalnu ekspresiju, zatim sekvencija koja kodira za antigen i poli(A) rep (Gurunathan i sur.,2020.). Drugi dio sastoji se od bakterijskih sekvencija koje su bitne za umnažanje i selekciju u bakterijama. U njih se ubrajaju ishodište replikacije koje omogućuje razmnožavanje plazmida u *Escherichia coli*, najčešće je to ishodište replikacije u PUC plazmidu, i sekvencija za otpornost na antibiotike koja dovodi do selekcije plazmida u bakterijskoj kulturi (Hasson i sur., 2015.). Najčešće su korišteni geni za rezistenciju

na ampicilin i kanamicin (Gurunathan i sur.,2020.). Iz pDNA zatim može nastati kružna DNA u koju se ubrajaju pDNA ili minikružna DNA, te linearna DNA, odnosno MIDGE DNA, te linearna DNA čiji su krajevi kovalentno povezani, Doggybone™ DNA (Shafaati i sur., 2021.).



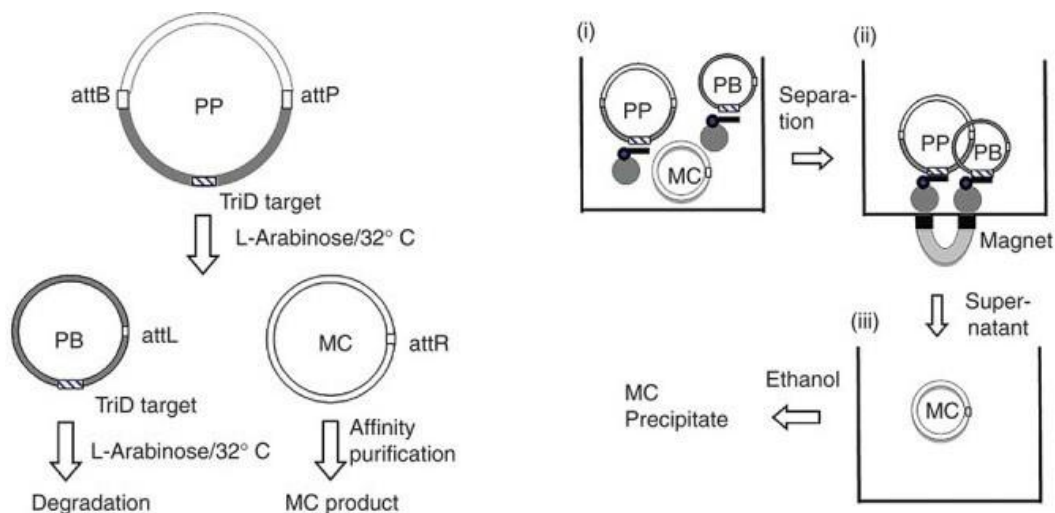
Slika 5. Vrste DNA u cjevivima (www.ncbi.nlm.nih.gov)

4.2.1. Sinteza DNA

Sinteza, odnosno za ovu vrstu može se reći i umnažanje, pDNA započinje pripremom bakterijskih stanica za unos pDNA što se vrši elektroporacijom. Nakon toga slijedi fermentacija u mediju koji sadrži glukozu ili glicerol, te soli, vitamine i izvore ugljika. Tijekom fermentacije dolazi do umnažanja pDNA u bakterijama. Potom slijedi skupljanje i liza bakterijskih stanica. Prvo dolazi do skupljanja bakterijskih stanica procesom centrifugiranja ili tangencijalnom filtracijom. Uglavnom se preferira tangencijalna filtracija, no ukoliko se provodi centrifugiranje, provodi se „solid-bowl“ jer kod centrifugiranja s diskovima, zbog velike brzine, nastaje pDNA kod koje je superuzvojnica prisutna oko 40 %, što je nedostavno (Kong i sur., 2008.). Tijekom lize bakterijskih stanica potrebno je očuvati pDNA uz istovremenu razgradnju endogene bakterijske DNA. Razlikuju se kemijske, fizikalne i mehaničke metode koje se mogu u te svrhe upotrijebiti. Kemijska metoda obuhvaća inkubaciju u alkalnom mediju s pH~12. Problem kod ove metode jest u tome što se ne može spriječiti razgradnja pDNA. Fizikalna metoda uključuje više temperature, te može i ne mora sadržavati lizozime. Mehanička metoda obuhvaća uporabu novih autolitičkih sojeve *E. coli*. Bakterijska se DNA uklanja vezivanjem na netopljive stanične ostatke, a pDNA se ekstrahira u blago kiselim puferkim uvjetima s niskim udjelom soli (Xenopoulos i Pattnaik, 2014.). Idući korak je uklanjanje netopljivih ostataka, a metode koje se koriste su filtracija, centrifugiranje i adsorpcija u proširenom sloju, vrsta kromatografije koja je djelotvorna kod viskoznih tekućina (engl. *expanded bed adsorption*, EBA). Zatim nastupa

taloženje u dva dijela. Prvo se talože nečistoće (proteini, endotoksini, ostatci DNA) koje se onda uklanjaju dekantiranjem, filtracijom ili centrifugiranjem. Za to se koristi kombinacija detergenta i pufera s visokim udjelom soli, a mogu biti dodani polietilenglikol i kaotropne soli koje kidaju vodikove veze u nečistoćama. To su litijev, magnezijev ili kalcijev klorid te amonijev ili natrijev acetat odnosno amonijev sulfat. Tijekom ovog dijela ne dolazi do taloženja pDNA zbog njezine hidrofilnosti (Xenopoulos i Pattnaik, 2014.). pDNA se naknadno taloži uz alkohol, polietilenglikol ili detergentima, a zatim se ponovno vrši filtracija. Uz detergent cetil-trimetilamonij-bromid moguće je taloženje pDNA izravno iz lizata koji je nastao primjenom neke od fizikalnih metoda. Ovim načinom taloženja pa ponovnim otapanjem nastaje pDNA čistoće oko 99 %. Posljednji koraci uključuju kromatografiju, tangencijalnu filtraciju kojom se izmjenjuje pufer, te finalna filtracija kroz pore veličine 22 μm .

Minikružna DNA optimizirani je DNA vektor koji ne sadrži okosnicu plazmida. Nastaje iz plazmidne DNA tako da nakon fermentacije, pod utjecajem arabinoze, dolazi do ekspresije gena za enzime I-SceI endonukleazu i ΦC31 integrazu (rekombinaza), koja je posrednik u rekombinaciji sekvenci attB i attP (Shafaati i sur., 2021.). Rekombinacijom nastaju minikružna DNA i mini plazmid koji sadrži bakterijsku sekvencu pDNA, a zatim restriksijski enzim I-SceI endonukleaza razgrađuje nastali mini plazmid (Shafaati i sur., 2021.). Nakon toga potrebno je još pročistiti nastali produkt. Proces pročišćavanja je vrlo sličan kao kod pDNA, no postoji noviji način kojim se učinkovitije uklanjaju zaostali mini plazmid i pDNA. To je TriD tehnologija koja se temelji na stvaranju trostruke spiralne strukture između polipirimidinskog oligonukleotida (Olig) i odgovarajuće sekvence u kružnoj DNA meti (Shafaati i sur. 2021.; Hou i sur., 2015.). Minikružna DNA se inkubira s biotiniliranim DNA oligonukleotidom (Olig) i tvori triplex DNA kompleks s odgovarajućim TriD sekvencama u mini plazmidu i pDNA (Hou i sur., 2015.). Nakon toga se uklanjaju magnetom obloženim streptovidinom, a minikružna DNA se taloži s etanolom. Na kraju nastaje produkt s 0,03 % ostalih nečistoća.



Slika 6. Pročišćavanje minikružne DNA (www.researchgate.net)

MIDGE vektori nastaju nakon pročišćavanja pDNA. Razgradnjom pDNA na određenim restrikcijskim mjestima pod utjecajem restrikcijskog enzima *EcoRI*, nastaju manji fragmenti i gen koji kodira za antigen (oligodeoksinukleotid). Zatim dolazi do povezivanja manjih fragmenata na krajeve oligodeoksinukleotida na način da se kovalentno spajaju i tvore oblik sličan bučici. Novonastali fragmenti idu u daljnje pročišćavanje na anion-izmjenjivačku kromatografiju, dok preostali fragmenti, uključujući i okosnicu pDNA, bivaju razgrađeni T7 DNA-polimerazom s egzonukleaznom aktivnošću (Schakowski i sur., 2001.).

Doggybone™ DNA nastaje enzimskim procesom nakon pročišćavanja pDNA kod koje je eukariotski gen okružen telomernim krajevima Tel-L i Tel-R. U prvom krugu amplifikacije taj se plazmid denaturira pod djelovanjem NaOH. U reakciji amplifikacije rotirajućega kruga (RCA) u kojem sudjeluje i enzim polimeraza, nastala DNA služi kao predložak, a nakon toga se razgrađuje restrikcijskim enzimima i egzonukleazom III (Scott i sur., 2015.). U tom procesu nastaju konkatemeri koji se prvo kidaju, a zatim spajaju TelN protelomerazom u Doggybone™ DNA koja se sastoji od dva gena za antigen povezana Tel-L i Tel-R. Zatim se provodi kromatografija u smislu pročišćavanja produkta, a nastali produkt zatim služi kao predložak u idućoj RCA reakciji.

4.2.1.1. Dizajniranje DNA

Virusni promotori, kao što je CMV ili SV40, iznimno su aktivni no podložni metilaciji kojom se inaktiviraju. Zbog toga se za ekspresiju više koriste eukariotski ili eukariotski/virusni hibridni

promotori koji ostaju aktivni tijekom duljega vremena (Hobernik i Bros, 2018.). Često se još koriste i promotori specifični za tip stanice kojima se ograničava ekspresija antigena i adjuvansa na dendritičke stanice, aktivirane B limfocite i makrofage koji su APC stanice (Shafaati i sur., 2021.). Ovim se načinom može spriječiti razvoj tolerancije koju uzrokuju mijeloidne supresorske stanice i makrofagi povezani s tumorom. Promotor koji kodira za Fascin-1 je DC specifičan promotor koji aktivira Th1 imunološki odgovor i CD8+ T limfocite, dok CMV promotor dovodi do kombiniranoga Th1/Th2 odgovora (Hobernik i Bros, 2018.). Problem koji se veže uz ovaj tip promotora jest eliminacija ekspresije antigena u B limfocitima čime se smanjuje indukcija humoralnoga imunogenog odgovora.

Optimizacija kodona, kao i kod mRNA cjepiva, bitna je kod DNA cjepiva pogotovo ako antigen nije ljudskoga podrijetla, te kako bi se ostvarila učinkovita ekspresija patogenoga proteina. Problem može predstavljati i prezentacija odnosno prepoznavanje samoga antigena. Navedeni problemi mogu se riješiti uvođenjem epitop specifičnih promjena na antigenu kako bi se povećao njegov afinitet za MHC molekulu, a na sličan način povećava se i afinitet antigen/MHC kompleksa prema receptoru T stanica. No u slučaju DNA cjepiva optimizacija kodona nije uvijek poželjna, rijetki kodoni nisu uvijek odgovorni za smanjenje brzine ekspresije, a česti kodoni ne dovode uvijek do povećane sinteze proteina. Zbog ovog razloga u ranoj fazi razvoja cjepiva trebali bi se uspoređivati originalni i kodonski optimizirani sljedovi. U nekim istraživanjima na miševima pokazano je kako optimizacija kodona nije dovela do povećanja imuniteta ili zaštite naspram patogena, te da je dovela do slabijega odgovora T stanica.

Dio plazmida u DNA cjepivima sadrži elemente bakterijske DNA, kao što je ishodišno mjesto replikacije bitno za umnožavanje u bakterijama i gen za rezistenciju na antibiotike. Ti bakterijski elementi mogu dovesti do nuspojava kao što su upalni procesi, ali i rezistenciju na antibiotike radi inkorporacije tih gena u ljudski genom. Zato se danas češće istražuje minikružna DNA kod koje su bakterijski elementi u potpunosti uklonjeni. Bitno je ostvariti i što bolji unos DNA u jezgru gdje dolazi do transkripcije pogotovo kod mitotički inaktivnih APC stanica. Zbog toga se uvodi SV 40 pojačivač na 5'-kraju promotora koji sadrži i nuklearni lokalizacijski signal na koji se vežu transkripcijski faktori u citoplazmi i dovode do aktivnoga transporta u jezgru. Mogu se koristiti i proteini koji vežu DNA, kao što je NFκB, koji također poboljšavaju unos u jezgru. Razvijena su i bicistronička cjepiva koja omogućuju primjenu jednoga plazmida koji nosi gen za antigen i gen za adjuvans. U tim cjepivima postoji jedan promotor za ekspresiju svih gena,

a geni su odijeljeni unutarnjim ribosomskim mjestom (IRES) koji omogućuje nezavisnu translaciju svakoga pojedinog gena. Umjesto IRES-a može biti virusna sekvenca T2A koja se nakon translacije razgradi endogenim proteazama.

4.2.1.2. Adjuvansi

Plazmidi inače sadrže nemetilirane deoksicitidilat-fosfat-deoksigvanilat (CpG) motive koji služe kao adjuvansi i aktiviraju urođeni odgovor preko TLR9 te stimuliraju produkciju IL-6, IL-12, TNF- α i INF- γ . Osim toga mogu poboljšati prezentaciju antigena preko monocita, makrofaga i dendritičkih stanica, inducirati proliferaciju B limfocita i stimulirati proizvodnju protutijela aktiviranih limfocita (Gurunathan i sur., 2000.). No potrebno je regulirati količinu motiva jer o tome ovisi hoće li se povećati ili smanjiti imunogenost cjepiva. Cjepivima se za dodatno povećanje imunogenosti dodaju još tradicionalni i molekularni adjuvansi.

U tradicionalne se adjuvance ubrajaju alum (spojevi aluminijska), liposomi i polisaharid baziran na delta inulinskim česticama. Alum, koji se koristi već dugi niz godina, inducira fagocitnu staničnu smrt i povećani odgovor protutijela. Polisaharid djeluje tako da povećava humoralni i stanični odgovor organizma, a liposomi vežu DNA i olakšavaju unos te DNA u stanice spajajući se s membranom stanica. Utjecaj ovih adjuvansa na imunogenost vrlo je skromna, te se češće koriste djelotvorniji molekularni adjuvansi.

Plazmidi koji kodiraju za molekularne adjuvance kao što su citokini, kemokini, kostimulatorne molekule, TLR ligandi. S obzirom da su oni proupalni faktori, nakon izlučivanja u ekstracelularni prostor aktiviraju lokalne APC i stanice u limfnim čvorovima. Na ovaj način dolazi do dugotrajnoga izlučivanja molekula koje će potaknuti aktivnost imunonosnoga sustava, ali s obzirom da ne nastaju u velikim količinama, neće doći do pojave snažne reakcije.

Citokini su imunomodulatorni proteini koji utječu na okolne stanice i daju im signal kako trebaju reagirati. U cjepivima, geni za citokine mogu biti dio plazmida koji nosi gen za antigen ili dio zasebnoga plazmida. Jedan od najvažnijih adjuvantnih citokina je IL-2. IL-2 ima različite uloge koje uključuju diferencijaciju naivnih T limfocita u aktivne T limfocite i proliferaciju stanica prirodnih ubojica (NK stanice). Kod antivirusnih DNA cjepiva za HIV, gripu i SARS-CoV-2 pokazao je povoljno djelovanje na imunogenost, isto kao i kod cjepiva za mijeloičnu leukemiju što upućuje da bi molekularni adjuvansi mogli imati sposobnost ublažavanja simptoma kroničnih infekcija (Suschak i sur., 2017.). IL-12 djeluje tako da potiče Th1 odgovor

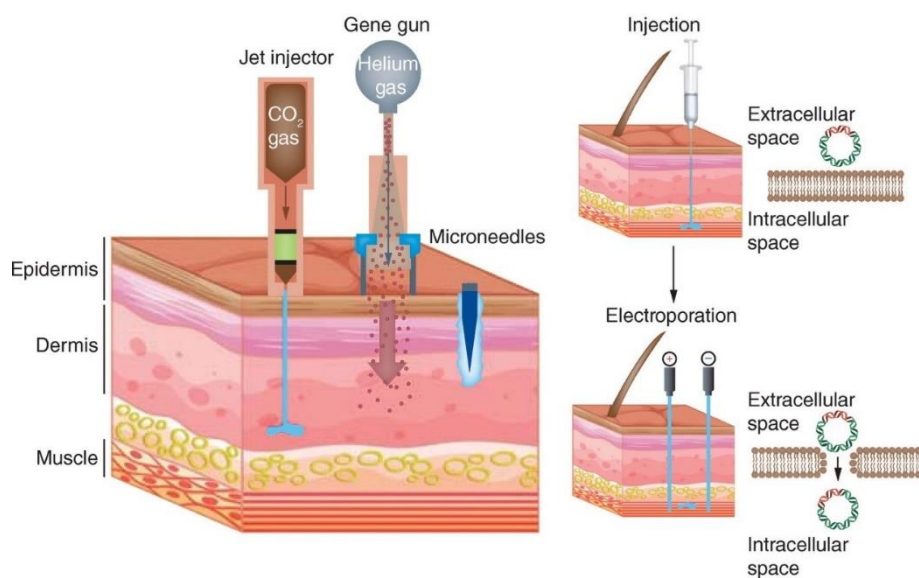
kojim se uglavnom aktiviraju antigen specifični CD8⁺ T limfociti i dolazi do ekspresije interferona γ i perforina. Ovo je bio prvi citokin koji se istraživao u navedene svrhe. Kod primjene cjepiva protiv bakterije *Yersinia pestis* ekspresija IL-12 dovela je do pojačanoga stvaranja IgA u mukozi i IgG u serumu, što je dovelo do veće zaštite organizma u odnosu na cjepivo koje je sadržavalo isključivo bakterijski antigen (Suschak i sur., 2017.; Yamanaka i sur., 2008.). Iako su ova istraživanja velikom većinom rađena na miševima, u kliničkim istraživanjima, između ostaloga za melanom i hepatitis B, IL-12 pokazao se sigurnim i djelotvornim u izazivanju CD4⁺ i CD8⁺ staničnoga odgovora (Suschak i sur., 2017.; Cha i Daud, 2012.). IL-15 je citokin koji, kao i IL-2, inducira proliferaciju NK stanica i T limfocita, te stvaranje antigen specifičnih CD8⁺. U istraživanjima je pokazano kako on najbolje djeluje u kombinaciji s drugim citokinima. Primjer je DNA cjepivo protiv *Toxoplasma gondii* u kojem su geni za ekspresiju IL-15 i IL-21, kao i kod cjepiva za bolest šaka, usta i stopala gdje je prisutna kombinacija IL-6, IL-7 i IL-15 (Li i Petrovsky, 2016.). Zadnji je granulocitno-makrofagni faktor rasta (GM-CSF) koji je odgovoran za privlačenje APC na mjesto cijepljenja i za sazrijevanje dendritičkih stanica. Istraživanja na miševima rađena su za bicistroničko cjepivo protiv HIV-a koje kodira za glikoprotein 120 i GM-CSF, te za cjepivo koje sadrži dva plazmida, jedan s informacijom za GM-CSF, drugi za antigen virusa bjesnoće. Iako su ova cjepiva stimulirala proizvodnju protutijela, te povećavala odgovor CD4⁺ T limfocita, ipak su potrebna dodatna istraživanja ovoga citokina jer se kombinacija GM-CSF kodirajućega plazmida i antigen kodirajućega plazmida pokazala loša u mnogim cjepivima. Došlo je do supresije odgovora organizma na DNA cjepivo, te GM-CSF nije pokazao nikakav učinak na odgovor T limfocita nakon primjene. Smatra se da je razlog tome što ovaj citokin može povećati populaciju mijeloidnih supresorskih stanica i tako potisnuti imunosni odgovor, te da je na humanim stanicama manje njegovih receptora u odnosu na mišje što također može uzrokovati smanjeni imunosni odgovor (Suschak i sur., 2017.).

4.2.1.3. Metode dostavljanja DNA u ciljne stanice

DNA cjepivo može se primijeniti intramuskularno, intradermalno, subkutano, intravenski, intranodalno i intranazalno. Prva istraživanja bavila su se intramuskularnom primjenom, no kasnije se pokazalo da su drugi načini primjene bolji. Intradermalnom primjenom povećana je imunogenost cjepiva, do ekspresije antigena došlo je u Langerhansovim stanicama, dendritičkim

stanicama i keratinocitima u koži, a Langerhansove stanice još odlaze i u okolne limfne čvorove gdje prezentiraju antigen T stanicama. Subkutano se primjenjuje DNA pod visokim tlakom pokazujući bolji imunosni odgovor nego kod intramuskularne primjene, isto kao i imunizacija sluznice nazalnom ili oralnom primjenom cjepiva.

Postoji nekoliko fizikalnih i kemijskih metoda koje služe za isporuku DNA u stanice. U fizikalne metode ubrajaju se genski pištolj, elektroporacija, „jet injectors“, i sustav mikroigala. Kod genskoga pištolja DNA je obložena česticama teških metala i pod visokim se tlakom unosi u ciljano tkivo. Prednosti ove metode jesu sigurnost, visoka učinkovitost, niska doza DNA i neinvazivnost, no nedostatak je visoka cijena. Elektroporacijom se DNA unosi u stanice na način da se pod visokim naponom stvaraju pore u membrani ciljanih stanica. Ova je metoda dosta učinkovita za unos DNA u stanice, ali dovodi i do upale zbog lokalnoga uništavanja tkiva, a to i povećava imunogenost cjepiva (Eusébio i sur.,2021.). Uređaj s mikroiglicama sastoji se od mikro igala koje se nalaze u nizovima i dovode do lokalizirane dostave DNA u epidermis i dermis. Postoji četiri načina na koje se izvodi cijepljenje, čvrste iglice koje su neposredno prije primjene obložene s DNA, zatim čvrste iglice od biopolimera koje se nakon primjene otapaju u dermisu i oslobađaju DNA, mikro iglice koje oštećuju kožu prije primjene transdermalnog flastera koji sadrži DNA i iglice napunjene DNA koja se oslobađa nakon uboda (Jorritsma i sur., 2016.). Mlazni injektor pod visokim pritiskom CO₂ stvara mlaz kojim se DNA kroz mali otvor unosi u kožu bez korištenja igle. Na ovaj način cjepivo može biti primijenjeno intradermalno, subkutano i intramuskularno.



Slika 7. Fizikalne metode dostavljanja DNA cjepiva u stanice (www.futuremedicine.com)

Kemijske metode za unos DNA iz cjepiva u stanice obuhvaća korištenje nosača kao što su liposomi, virosomi, prirodne i sintetske mikro- i nanočestice priređene od PEI, želatine, albumina, protamin poliglutamata, polidopamina i još mnogih drugih (Shafaati i sur., 2021.). Liposomi su male vezikule koje se sastoje od lipidnog dvosloja. Mogu biti neutralni, anionski ili kationski, no u ovom slučaju najučinkovitiji su kationski koji vežu DNA. Virosomi su vezikule slične liposomima, jedino što dodatno sadrže jest virusna proteinska ovojnica koja omogućuje fuziju sa staničnom membranom i unos DNA u stanice (Jorritsma i sur., 2016.). Glavni nedostatak virosoma je to što može doći do prepoznavanja virusnog proteina ovojnice ukoliko se organizam već prije susreo s tim virusom i tako dolazi do reakcije na virosom prije nego je dostavio DNA. Prirodni polimer je polisaharid kitozan, posebno njegov deacetilirani oblik. On je pozitivno nabijen s obzirom da sadrži slobodne aminske skupine, a one će vezati negativno nabijene fosfatne skupine DNA. Polisaharidi su inače dosta prihvatljivi jer su jeftini, biokompatibilni, biorazgradivi, a kitozan je pokazao i adjuvansno djelovanje u aktiviranju urođene i stečene imunosti. Da bi se dodatno povećala stimulacija imunosnoga odgovora moguće je kombinirati polimere s manoznim ligandima koji selektivno dostavljaju DNA APC stanicama. Sintetski polimeri su PEI i dendrimer, te mali peptidi koji prodiru u stanice (CPP). CPP modificiraju odgovor imunskih stanica i povećavaju učinkovitost cijepljenja. Sve mikro- i nanočestice imaju ulogu zaštite DNA od razgradnje nukleazama i što veći unos u stanice endocitozom.

4.2.2. Vrste DNA cjepiva

Do danas još ne postoji niti jedno DNA cjepivo koje je dozvoljeno za primjenu kod ljudi, no za veterinarsku primjenu odobrena su četiri cjepiva. Prva dva cjepiva odobrena su još 2005. godine kao profilaksa za virus zapadnog Nila i virus koji uzrokuje nekrozu kod lososa, te kasnije preostala dva odobrena cjepiva, jedno koje kodira za oslobađajući hormon za hormon rasta (GHRH) te drugo za liječenje melanoma kod pasa (Lee i sur., 2018.).

4.2.2.1. DNA cjepiva za infektivne bolesti

DNA cjepiva za infektivne bolesti primjenjuju se za HIV, malariju, Zika virus, gripu i CMV. Prva su istraživanja pokrenuta u svezi sa cjepivom protiv HIV-a, te su rezultati pokazali da je cjepivo dobro podnošljivo i sigurno, bez opasnosti integriranja DNA virusa u humani genom ili uzrokovanja autoimunih bolesti (Liu i Ulmer, 2005.). Istraživanja su pokazala da DNA cjepiva

dovode do pojačanoga odgovora imunosnoga sustava koji obuhvaća CD4+ i CD8+ T limfocite, uključujući i stvaranje proupalnih citokina kao što je INF γ .

Što se tiče cjepiva za hepatitis B, intradermalnom aplikacijom uz pomoć genskoga pištolja došlo je do aktivacije i B limfocita i stvaranja specifičnih protutijela, ali i do aktivacije T limfocita. U odnosu na cjepivo koje sadrži rekombinantni protein, stvaranje protutijela bilo je slabije kod DNA cjepiva, ali je zato bio snažniji odgovor T limfocita. CD4+ T limfociti započeli su Th1 odgovor izlučujući INF γ (Liu i Ulmer, 2005.). Iako još ne postoji odobreno DNA cjepivo za terapiju hepatitisa B, ova istraživanja pokazuju obećavajuće rezultate za budućnost.

4.2.2.2. DNA cjepiva za terapiju karcinoma

Postoje 3 vrste DNA cjepiva za terapiju karcinoma, to su kimerna, neoantigena i poliepitopska DNA cjepiva.

Kimerna DNA cjepiva kodiraju ksenogene antigene, odnosno proteine/peptide izvedene iz različitih vrsta čija je sekvenca homologna s vlastitim ortologom, te razlika između epitopa ortologa i prirodnoga proteina izaziva aktivaciju T i B limfocita (Riccardo i sur., 2014.). Moguće je dizajnirati i hibride koji kodiraju ksenogene i homologne antigene domene gdje ksenogeni dio može biti prepoznat i od strane dendritičkih stanica i predstaviti ih T limfocitima, ali i od strane B limfocita, a homologna sekvenca dodatno jača taj odgovor. Neka DNA cjepiva nastala su miješanjem gena štakora, miša, čovjeka i drugih vrsta čime se povećala imunogenost antigena i učinkovitost cjepiva (Lopes i sur., 2019.). Ova se cjepiva trenutno testiraju u svrhu liječenja melanoma, postoji i klinička studija za liječenje karcinoma prostate kod koje se koristi ljudski i mišji membranski antigen. Također, spomenuto cjepivo za liječenje melanoma kod pasa jest prvo odobreno ksenogeno DNA cjepivo.

Neoantigeni su novi epitopi na površini tumorskih stanica koji su nastali kao posljedica za tumor specifičnih DNA promjena. Prvo dolazi do sekvenciranja eksona iz tumora, te se identificiraju mutacije do kojih je došlo u usporedbi s podacima cijelog eksona iz normalnog tkiva (Lopes i sur., 2019.). Na ovaj način prepoznaju se antigeni koje prepoznaju MHC I i II molekule, te se *in vitro* provjerava njihova sposobnost da aktiviraju CD8+ T limfocite. Stoga se za neoantigena cjepiva može reći da su personalizirana cjepiva protiv raka prilagođena svakom pacijentu (Lopes i sur., 2019.). Problem vezan uz ovu vrstu cjepiva je, kao i kod mRNA cjepiva, vrijeme proizvodnje i povećanje točnosti identifikacije neoantigena, no u usporedbi s mRNA

cjepivima, čini se da DNA cjepiva izazivaju snažniji odgovor CD8+ T limfocita zbog čega su zapravo i bolja u odnosu na mRNA. Cjepivo za terapiju karcinoma dojke, prostate i bubrega u kombinaciji s monoklonskim protutijelima trenutno se nalaze u kliničkim istraživanjima.

Kod poliepitopskih DNA cjepiva potrebno je uzeti u obzir afinitet epitopa za MHC molekule na APC stanicama, te da, iako se glavnim imunosnim stanicama u antitumorskom odgovoru smatraju CD8+ T limfociti, korištenje epitopa koji će prepoznati CD4+ T limfociti moglo bi dovesti do još jačega i širega imunosnog odgovora. Kombinacija imunosnoga odgovora koju uzrokuju CD8+ i CD4+ T limfociti neophodna je za potpunu eradikaciju tumora (Lopes i sur., 2019.). Primjena poliepitopskoga DNA cjepiva u pretkliničkim studijama dovela je do smanjene stope rasta tumora i stvaranja metastaza, a u trenutnim kliničkim ispitivanjima testiraju se cjepiva protiv raka dojke, raka vrata maternice i raka jajnika.

5. ZAKLJUČAK

Cjepiva temeljena na nukleinskim kiselinama predstavljaju velik napredak u zdravstvu. Uspoređujući ih s konvencionalnim cjepivima razvidno je da je proizvodnja jednostavnija i brža, ne postoji opasnost od razvoja bolesti nakon primjene cjepiva, te aktiviraju bolji humoralni i stanični imunogeni odgovor organizma. Međusobno se razlikuju u mnogim elementima. Što se tiče stabilnosti DNA cjepiva su *in vivo* i *in vitro* puno stabilnija u odnosu na mRNA. Upravo iz tog razloga mRNA je tijekom proizvodnje podložna mnogim modifikacijama koje su prethodno spomenute (optimizacija kodona, struktura kape, duljina poli(A) repa). Te modifikacije osiguravaju njezinu stabilnost i translaciju. Glavni nedostatak DNA cjepiva i jedna od stvari koja najviše zabrinjava u svezi s DNA cjepivima jest mogućnost integracije u genom domaćina. Ta je opasnost posebice zabrinjavajuća kod cjepiva za virusne infekcije s obzirom da bi integracija DNA iz cjepiva u blizini protoonkogenog mogla dovesti i do razvoja tumora. S druge strane, kod mRNA cjepiva ne postoji opasnost od ovakvih događaja. Razlika je i u mjestu dostavljanja nukleinske kiseline, mRNA nakon unosa u stanicu ostaje u citoplazmi gdje dolazi do translacije, dok DNA nakon ulaska u stanicu mora još doći do jezgre gdje će se odvijati transkripcija. Proizvodnja same DNA je dosta jednostavna te osim pročišćavanja ne zahtjeva dodatne korake, dok je za sintezu mRNA potrebna sinteza DNA predloška, uklanjanje nusprodukata koji su nastali tijekom transkripcije, formiranje kape. No iako je sam proces dulji i skuplji, *in vitro* transkripcija je iznimno učinkovita te iz jednoga DNA predloška može nastati jedan ili dva reda veličine više mRNA. Iako i DNA i mRNA cjepiva imaju svoje prednosti i nedostatke, jedan od glavnih nedostataka, zbog kojeg danas još nisu u širokoj primjeni, je imunogenost koja je u kliničkim istraživanjima na ljudima ispod očekivanja.

6. LITERATURA

- Benteyn D, Heirman C, Bonehill A, Thielemans K, Breckpo K. mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2014, 14, 161-176
- Brito LA, Chan M, Shaw CA, Hekele A, Carsillo T, Schaefer M, Archer J, Seubert A, Otten GR, Beard CW, Dey AK, Lilja A, Valiante NM, Mason PW, Mandl CW, Barnett SW, Dormitzer PR, Ulmer JB, Singh M, O'Hagan DT, Geall AJ. A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. *Molecular Therapy*, 2014, 22, 2118-2129
- Cannarozzi G, Schraudolph NN, Faty M, von Rohr P, Friberg MT, Roth AC, Gonnet P, Gonnet G, Yves Barral Y. A role for codon order in translation dynamics. *Cell* 2010, 141, 355-367
- Cha E, Daud A. Plasmid IL-12 electroporation in melanoma. *Hum Vaccin Immunother.*, 2012, 8, 1734-1738
- Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, Sidik SM, Lourido S, Langer R, Bavari S, Ploegh HL, Anderson DG. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016., 113, 4133-4142
- Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.*, 2021, 20, 817-838
- Eusébio D, Neves AR, Costa D, Biswas S, Alves G, Cui Z, Sousa A. Methods to improve the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. *Drug Discovery Today*, 2021, 26, 2575-2592
- Fang H, Chen Q. Applications and challenges of biomaterial mediated mRNA delivery. *Explor Target Antitumor Ther.*, 2022, 3, 428-444.
- Fynan EF, Lu S, Robinson HL. One Group's Historical Reflections on DNA Vaccine Development. *Hum Gene Ther.*, 2018, 29, 966-970
- Gagnon P, Goričar B, Peršič Š, Černigoj U, Štrancar A. Two new capture options for improved purification of large mRNA. *Cell & Gene Therapy Insights*, 2020, 6, 1035–1046
- Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *J Biol Chem*, 2006, 281, 1857-67

- Gu Y, Duan J, Yang N, Yang Y, Zhao X. mRNA vaccines in the prevention and treatment of diseases. *MedComm* (2020), 2022., 3, e167
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization. *Annual Review of Immunology*, 2020, 18, 927–974
- Hasson SSAA, Al-Busaidi JKZ, Sallam TA. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, 5, 344-353
- Hobernik D, Bros M. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? *Int J Mol Sci.*, 2018, 19, 3605
- Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater.*, 2021, 6, 1078-1094
- Hou XH, Guo XY, Chen Y, He CY, Chen ZY. Increasing the minicircle DNA purity using an enhanced triplex DNA technology to eliminate DNA contaminants. *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2015, 1, 14062
- Jorritsma SHT, Gowans EJ, Grubor-Bauk B, Wijesundara DK. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine.*, 2016, 34, 5488-5494
- Kim SC, Sekhon SS, Shin WR, Ahn G, Cho BK, Ahn JY, Kim YH. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Mol Cell Toxicol.*, 2021, 18, 1-8
- Kong S, Rock CF, Booth A, Willoughby N, O'Kennedy RD, Relton J, Ward JM, Hoare M, Levy MS. Large-scale plasmid DNA processing: evidence that cell harvesting and storage methods affect yield of supercoiled plasmid DNA. *Biotechnol Appl Biochem.*, 2008, 51, 43-51
- Lee J, Arun Kumar S, Jhan YY, Bishop CJ. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater.*, 2018, 80, 31-47
- Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines.*, 2016, 15, 313-29
- Li M, Wang Z, Xie C, Xia X. Advances in mRNA vaccines. U: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Aranda F, Berraondo P, Galluzzi L, Amsterdam, Elsevier, 2022, 295-316

Liang Y, Huang L, Liu T. Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Front Bioeng Biotechnol.*, 2021, 9, 766764

Liu MA, Ulmer JB. Human Clinical Trials of Plasmid DNA Vaccines. *Advances in Genetics*, 2005, 25–40

Lopes A, Vandermeulen G, Pr at V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res.*, 2019, 381, 46

Matić Z, Šantak M. Current view on novel vaccine technologies to combat human infectious diseases. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2022, 106, 25-56

Nitika, Wei J, Hui AM. The Delivery of mRNA Vaccines for Therapeutics. *Life (Basel)*, 2022, 12, 1254

Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.*, 2018, 17, 261-279

Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Perez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina WV, Cooper D, Frenck Jr RW, Hammitt LL, Türeci Ö, Nell H, Schaefer A, Ünal S, Tresnan DB, Mather S, Dormitzer PR, Sahin U, Jansen KU, Gruber WC. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.*, 2020, 383, 2603-2615

Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharmaceut Med.*, 2022, 36, 11-20

Rettig L, Haen SP, Bittermann AG, von Boehmer L, Curioni A, Krämer SD, Knuth A, Pascolo S. Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling. *Blood*, 2010, 115, 4533-4541

Riccardo F, Bolli E, Macagno M, Arigoni M, Cavallo F, Quaglino E. Chimeric DNA Vaccines: An Effective Way to Overcome Immune Tolerance. U: Current Topics in Microbiology and Immunology. Savelyeva N, Ottensmeier C, Cam, Springer, 2014, str. 99-122

Sasaki K, Sato Y, Okuda K, Iwakawa K, Harashima H. mRNA-Loaded Lipid Nanoparticles Targeting Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 1572

Schakowski F, Gorschlüter M, Junghans C, Schroff M, Buttgereit P, Ziske C, Schöttker B, König-Merediz SA, Sauerbruch T, Wittig B, Schmidt-Wolf IG. A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. *Mol Ther.*, 2001, 3, 793-800

Scott VL, Patel A, Villarreal DO, Hensley SE, Ragwan E, Yan J, Sardesai NY, Rothwell PJ, Extance JP, Caproni LJ, Weiner DB. Novel synthetic plasmid and Doggybone DNA vaccines induce neutralizing antibodies and provide protection from lethal influenza challenge in mice. *Hum Vaccin Immunother.*, 2015, 11, 1972-82

Shafaati M, Saidijam M, Soleimani M, Hazrati F, Mirzaei R, Amirheidari B, Tanzadehpanah H, Karampoor S, Kazemi S, Yavari B, Mahaki H, Safaei M, Rahbarizadeh F, Samadi P, Ahmadyousefi Y. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virol.*, 2021, 17, 49–66

Siewert CD, Haas H, Cornet V, et al. Hybrid biopolymer and lipid nanoparticles with improved transfection efficacy for mRNA. *Cells*, 2020, 9, 2034

Sousa Â. DNA Vaccines: Methods and Protocols. New York, Springer Science+Business Media, LLC, 2021. str. 15 – 19

Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother.*, 2017, 13, 2837-2848

Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, Xiao H, Liang XJ, Yuanyu Huang Y. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol Adv.*, 2020., 40

Whitley J, Zwolinski C, Denis C, Maughan M, Hayles L, Clarke D, Snare M, Liao H, Chiou S, Marmura T, Zoeller H, Hudson B, Peart J, Johnson M, Karlsson A, Wang Y, Nagle C, Harris C, Tonkin D, Fraser S, Capiz L, Zeno CL, Meli Y, Martik D, Ozaki DA, Caparoni A, Dickens JE, Weissman D, Saunders KO, Haynes BF, Sempowski GD, Denny TN, Johnson MR. Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials. *Translational research*, 2022, 242, 38 – 55

Xenopoulos A, Pattnaik P. Production and purification of plasmid DNA vaccines: is there scope for further innovation? *Expert Review of Vaccines*, 2014, 13, 1537–1551

Yamanaka H, Hoyt T, Yang X, Golden S, Bosio CM, Crist K, Becker T, Maddaloni M, Pascual DW. A nasal interleukin-12 DNA vaccine coexpressing *Yersinia pestis* F1-V fusion protein confers protection against pneumonic plague. *Infect Immun.*, 2008, 76, 4564-73

Zhang C, Ma Y, Zhang J, Kuo JCT, Zhang Z, Xie H, Zhu J, Liu T. Modification of Lipid-Based Nanoparticles: An Efficient Delivery System for Nucleic Acid-Based Immunotherapy. *Molecules*, 2022, 27, 1943

Zohra FT, Chowdhury EH, Tada S, Hoshiba T, Akaike T. Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007, 358, 373–378

Mrežne stranice korištene tijekom izrade diplomskog rada

A Vaccine Against COVID-19 Would Be the Latest Success in a Long Scientific History, 2020., <https://time.com>, pristupljeno 15. 9. 2022.

A Clinical Trial of a Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in Healthy Women 16 to 40 Years of Age, <https://trials.modernatx.com>, pristupljeno 5. 11. 2022.

The tangled history of mRNA vaccines, 2021., <https://www.nature.com>, pristupljeno 15. 9. 2022.

Vaccine Development Throughout History, 2021., <https://www.cureus.com>, pristupljeno 15. 9. 2022.

What are nucleic acid vaccines and how could they be used against COVID-19?, 2020., <https://www.gavi.org>, pristupljeno 15. 9. 2022.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Zanimanje za razvojem cjepiva temeljenih na nukleinskim kiselinama pojavio se prije trideset godina, no zadnjih deset godina intenzivno se istražuju mogućnosti primjene takvih cjepiva za prevenciju infektivnih bolesti, terapiju tumora i genetičkih poremećaja. Razlog tolikoga interesa za njihovim razvojem jest velik potencijal ovih cjepiva. Osim što uzrokuju humoralni i stanični imunski odgovor aktivacijom i T i B limfocita proces njihove proizvodnje je jednostavan te, nakon primjene, ne postoji opasnost od razvoja burne reakcije, pa čak i bolesti. Glavni nedostatak ovih cjepiva jest nedovoljna imunogenost odnosno stimulacija imunsnoga sustava. Smatra se da je nedovoljna imunogenost takvih cjepiva povezana s njihovom nestabilnošću i nedostatnom dostavom nukleinskih kiselina u stanice. Istraživanja su dovela do brojnih rješenja navedenih problema. Inkorporacijom nukleinskih kiselina u sustave koji su djelotvorni u njihovoj dostavi u stanice, povećava se sinteza antigena, a time i stimulacija imunsnoga sustava. Posebnim dizajniranjem i modifikacijom molekula nukleinskih kiselina, kao što je optimizacija kodona i modifikacija baza kod mRNA ili dodatak adjuvanasa kod DNA, povećava se njihova stabilnost i imunogenost. Zahvaljujući ovim metodama danas je u tijeku velik broj kliničkih istraživanja koja bi vrlo brzo mogla dovesti do svakodnevne primjene ovih cjepiva u prevenciji i terapiji bolesti.

SUMMARY

Interest in the development of vaccines based on nucleic acids appeared thirty years ago, but in the last ten years their application has been intensive for the prevention of infectious diseases and therapy of cancer and genetic disorders. The reason for so much interest in their development is the great potential of these vaccines. In addition to causing a humoral and cellular immune response by activating both T and B lymphocytes, the process of their production is simple and, after application, there is no danger of developing a violent reaction or even disease. The main drawback of these vaccines is insufficient immunogenicity, i.e. stimulation of the immune system, which is due to instability and insufficient delivery of nucleic acids to cells due to a large amount of negative charge. To date, many solutions have been discovered that could solve this problem. By incorporating nucleic acids into systems that are effective in delivering them to cells, the synthesis of antigens increases, and thus the stimulation of the immune system. Special design and modification of nucleic acid molecules, such as codon optimization and base modification in mRNA, and the addition of adjuvants to DNA increase their stability and, also, immunogenicity. Thanks to these methods, a large number of clinical researches are in circulation today, which could very soon lead to the daily use of these vaccines in the prevention and treatment of diseases.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Koncept razvoja cjepiva utemeljenih na nukleinskim kiselinama

Barbara Preis

SAŽETAK

Zanimanje za razvojem cjepiva temeljenih na nukleinskim kiselinama pojavio se prije trideset godina, no zadnjih deset godina intenzivno se istražuju mogućnosti primjene takvih cjepiva za prevenciju infektivnih bolesti, terapiju tumora i genetičkih poremećaja. Razlog tolikoga interesa za njihovim razvojem jest velik potencijal ovih cjepiva. Osim što uzrokuju humoralni i stanični imunogeni odgovor aktivacijom i T i B limfocita proces njihove proizvodnje je jednostavan te, nakon primjene, ne postoji opasnost od razvoja burne reakcije, pa čak i bolesti. Glavni nedostatak ovih cjepiva jest nedovoljna imunogenost odnosno stimulacija imunogenog sustava. Smatra se da je nedovoljna imunogenost takvih cjepiva povezana s njihovom nestabilnošću i nedostatnom dostavom nukleinskih kiselina u stanice. Istraživanja su dovela do brojnih rješenja navedenih problema. Inkorporacijom nukleinskih kiselina u sustave koji su djelotvorni u njihovoj dostavi u stanice, povećava se sinteza antigena, a time i stimulacija imunogenog sustava. Posebnim dizajniranjem i modifikacijom molekula nukleinskih kiselina, kao što je optimizacija kodona i modifikacija baza kod mRNA ili te dodatak adjuvanasa kod DNA, povećava se njihova stabilnost i imunogenost. Zahvaljujući ovim metodama danas je u tijeku velik broj kliničkih istraživanja koja bi vrlo brzo mogla dovesti do svakodnevne primjene ovih cjepiva u prevenciji i terapiji bolesti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 7 grafičkih prikaza, 0 tablica i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: mRNA cjepiva, DNA cjepiva, imunogenost, imunološki odgovor, infektivne bolesti, karcinom

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Donatella Verbanac, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivan Pepić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The concept of developing vaccines based on nucleic acids

Barbara Preis

SUMMARY

Interest in the development of vaccines based on nucleic acids appeared thirty years ago, but in the last ten years their application has been intensive for the prevention of infectious diseases and therapy of cancer and genetic disorders. The reason for so much interest in their development is the great potential of these vaccines. In addition to causing a humoral and cellular immune response by activating both T and B lymphocytes, the process of their production is simple and, after application, there is no danger of developing a violent reaction or even disease. The main drawback of these vaccines is insufficient immunogenicity, i.e. stimulation of the immune system, which is due to instability and insufficient delivery of nucleic acids to cells due to a large amount of negative charge. To date, many solutions have been discovered that could solve this problem. By incorporating nucleic acids into systems that are effective in delivering them to cells, the synthesis of antigens increases, and thus the stimulation of the immune system. Special design and modification of nucleic acid molecules, such as codon optimization and base modification in mRNA, and the addition of adjuvants to DNA increase their stability and, also, immunogenicity. Thanks to these methods, a large number of clinical researches are in circulation today, which could very soon lead to the daily use of these vaccines in the prevention and treatment of diseases.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 7 figures, 0 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: mRNA vaccines, DNA vaccines, immunogenicity, immune response, infectious diseases, cancer

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Donatella Verbanac, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2022.

