

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Proizvodnja cjepiva protiv gripe - dosezi i izazovi

Trends and challenges in influenza vaccine technology

Igor Slivac*, Ena Buljubašić, Višnja Gaurina Srček, Marijan Logarušić

Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: islivac@pbf.unizg.hr

Sažetak

Gripa (ili influenza) je virusna, infektivna i respiratorna bolest koja godišnje zarazi do milijardu ljudi diljem svijeta. Pojavljuje se svake godine kao sezonska gripa, no u povijesti se svakih nekoliko desetaka godina javljala i kao pandemija. Njezin nepovoljan učinak na pojedinca i društvo može se spriječiti upotrebom cjepiva, tj. cijepljenjem. Prvo odobreno cjepivo protiv gripe proizvedeno je u embrioniranom kokošjem jajetu prije skoro 80 godina, a po sličnom tehnološkom načelu proizvode se i današnja cjepiva. Napredak u razumijevanju stanične biologije te unaprjeđenje proizvodnih postupaka pomoću kulture stanica omogućilo je stručnjacima prijelaz s konvencionalnih na nove, produktivnije i brže proizvodne postupke. U radu se najprije razmatra epidemioški aspekt gripe, struktura virusa gripe, a zatim dosezi i izazovi u suvremenoj proizvodnji cjepiva protiv gripe. U završnom dijelu ističu se potrebe i trendovi u izradi univerzalnog cjepiva protiv gripe.

Cljučne riječi: biotehnologija, virusna cjepiva, virus gripe, gripa, influenza, cijepljenje

Abstract

Influenza (flu) is a viral, contagious, respiratory disease that annually infects up to a billion people worldwide. It appears each year as a seasonal flu, but through history, it appeared as pandemic illness once in every several decades. Its harmful effects on human health and consequently to the society can be prevented by vaccination. The first approved influenza vaccine was made almost 80 years ago using embryonated hen eggs and the same technology is still in use for most available vaccines today. The development of cell biology and improvement of cell culture manufacturing techniques enabled the transition from conventional to novel, more efficient vaccine production methods. In this work we describe the epidemiology of influenza, influenza virus structure as well as current influenza vaccine manufacturing approaches. A brief overview of universal vaccine development and its urgency is discussed in the final section of the paper.

Keywords: biotechnology, influenza vaccine, influenza virus, flu, vaccination

Uvod

Gripa ili influenza je akutna bolest dišnog sustava uzrokovana virusom gripe. Poznata je od davnina, a prve je simptome opisao otac zapadne medicine Hipokrat u 5. stoljeću stare ere. Virus gripe je vrlo adaptibilan i jedinstveno brze evolucije pa može inficirati kako ljude tako i životinje. Interspecijska transmisija i promjenjivost virusa ključni su razlozi zašto je gripa praktično neiskorijenjiva bolest koja se redovito javlja kao sezonska epidemija, a svakih 25 do 30 godina i kao pandemija (Madhav i sur., 2017; Woolhouse i Gowtage-Sequeira, 2005). U prošlom stoljeću virusi gripe uzrokovali su čak tri pandemije - španjolsku, azijsku te hongkonšku gripu, pri čemu je od španjolke oboljelo više od 25% svjetske populacije (Tablica 1). Zbog stradavanja samo mlađe populacije, gripa iz 1977/78 ne smatra se pandemijom. Prva i posljednja pandemija gripe u 21. stoljeću dogodila se 2009. godine, uzrokovao ju je A(H1N1) virus, dok je bolest prozvana svinjskom gripom jer se pretpostavlja da je izvorni prijenosnik bila svinja. Osim gripa pandemijskih razmjera, svake godine svjedoci smo sezonskim epidemijama od kojih godišnje oboli do milijarda ljudi (World Health Organisation, 2019). U svrhu sprječavanja i kontrole te akutne respiratorne zarazne bolesti, provodi se cijepljenje. Cjepiva protiv gripe biofarmaceutici su od iznimne važnosti za javno zdravstvo iz lokalne, ali i globalne perspektive. No, unatoč kontinuiranom razvoju tehnologija za proizvodnju cjepiva i novim postignućima u biotehnologiji i virologiji, gripa i dalje godišnje predstavlja jednu od najvećih prijetnji ne samo javnom zdravstvu već i

gospodarskom sektoru. Zbog karakterističnih promjena na razini genoma virusa gripe, antigenog skretanja i antigene izmjene, proizvođači cjepiva protiv gripe svake godine mijenjaju i prilagođavaju sastav samog cjepiva ovisno o podtipovima virusa gripe za koje se pretpostavlja da će te sezone kružiti u populaciji. Kako bi u što manjem vremenu osigurali što veće količine cjepiva, što je posebice važno u slučaju pojave pandemijske gripe, naglasak je stavljen na razvoj tehnologija koje za proizvodnju virusnih antigena upotrebljavaju stanične linije i rekombinantnu tehnologiju. Takve nove tehnologije nastoje zamijeniti konvencionalnu proizvodnju cjepiva protiv gripe s pomoću embrioniranih kokošjih jaja. Osim razvoja novih učinkovitijih tehnologija, mnogi istraživači u potrazi su za univerzalnim cjepivom protiv gripe koje bi omogućilo zaštitu protiv svih podtipova virusa gripe. Osnovna podjela virusnih cjepiva jest na živa (oslabljena), neživa (inaktivirana) i podjedinična. Za razliku od živih cjepiva koja sadrže cijelu, ali oslabljenu, virusnu česticu, neživa cjepiva mogu sadržavati cijelu neaktivnu virusnu česticu ili njene dijelove (fragmente). Imunosni odgovor organizma na živo oslabljeno cjepivo najbliži je odgovoru organizma na prirodnu infekciju, što je najveća prednost takvih cjepiva jer su na taj način aktivirani svi imunosni aspekti potrebni za dugotrajan i učinkovit adaptivni imunitet. Pritom su stupanj atenuacije i genska stabilnost izrazito važni kako bi se izbjegla mogućnost reverzije virusa u patogeni oblik (Dimmock i sur., 2016; Rodrigues i sur., 2015). Većina današnjih cjepiva protiv gripe spada u



skupinu inaktiviranih i fragmentiranih cjepiva. Ona sadrže kemijskim ili fizikalnim postupcima inaktiviranu virusnu česticu. Za kemijsku inaktivaciju uobičajeno se upotrebljavaju formaldehid, glutaraldehid i β -propiolakton, a za fizikalnu toplina ili UV zračenje (Jiskoot i sur., 2019; Rodrigues i sur., 2015). Čestice tako gube mogućnost replikacije, a ovisno o tretmanu su i strukturno promijenjene, što ponekad smanjuje njihovu imunogenost te tako biva najveći nedostatak u usporedbi s živim oslabljenim cjepivima. Prednost inaktiviranih cjepiva nad živim oslabljenim cjepivima je što se ne smiju čuvati zamrznuta, već na temperaturi 2-8 °C, a to olakšava njihovu distribuciju (Dimmock i sur., 2016). Podjedinjena cjepiva sadrže specifičnu virusnu komponentu, tj. fragment koji ima antigene karakteristike. To je često virusna ovojnica ili samo njen protein s epitomom koji će u organizmu izazvati dovoljno snažan imunogen odgovor bez izazivanja infekcije. (Rodrigues i sur., 2015). Podjedinjena cjepiva mogu biti klasična i rekombinantna. Klasična podjedinjena cjepiva dobivaju se izravnom izolacijom određene virusne komponente iz samog virusa koji se razara neionskim deterdžentom ili dietil-eterom. Takva se cjepiva nazivaju još i fragmentirana cjepiva (eng. split vaccines) (Gallo-Ramírez i sur., 2015). Metodama genetičkog inženjerstva 80-ih godina prošloga stoljeća dobivena su rekombinantna podjedinjena cjepiva. Ona podrazumijevaju proizvodnju samo virusnih proteina antigenih svojstava unutar pogodnog heterolognog ekspresijskog sustava poput kvasca, bakterija ili životinjskih stanica (Pujar i sur., 2015). U ovu skupinu cjepiva spadaju i tzv. virusu slične čestice, odnosno VLP (eng. virus-like particles). One su sastavljene samo od (nekih) komponenti virusne ovojnice, posloženih tako da oponašaju prirodnu virusnu česticu, ali bez mogućnosti replikacije zbog odsutnosti genetskog materijala. Takvo je primjerice cjepivo Ceravrix protiv HPV-a, ali i cjepivo protiv gripe tvrtke Novavax, trenutno u drugoj fazi

kliničkog ispitivanja (Chen i sur., 2020). Neka od pojedinih cjepiva znatno su manje imunogena od izvornih patogena, pa se zato doziraju sa spojevima poticateljima imunosti tzv. pojačivačima ili adjuvansima (npr. cjepiva protiv HVB, HVA, HPV). Cjepiva sastavljena od nukleinskih kiselina sadrže genski materijal (DNA ili mRNA) čijom ekspresijom ili translacijom u cijepljenom organizmu nastaje virusna komponenta odgovorna za izazivanje imunogenog odgovora (Jiskoot i sur., 2019). Za učinkovitost cijepljenja ovom vrstom cjepiva bitan je nosač ili vektor koji će uspješno dovesti nukleinske kiseline do ciljnih stanica organizma. U tu svrhu mogu se koristiti različiti, više ili manje kompleksni spojevi, a ponekad i drugi nepatogeni virusi, tzv. pomoćni virusi, poput adenovirusa ili vakcinija virusa. Na kliničkom ispitivanju su cjepiva ovog tipa protiv virusa Ebola, HIV i SARS-CoV-2, ali i za gripu tvrtke Inovio (Chen et al 2020). Ako se cjepivo protiv jedne bolesti dozira s cjepivom protiv neke druge ili više njih riječ je o tzv. kombiniranom cjepivu. Takvo je npr. MMR cjepivo protiv ospica, zaušnjaka i rubele. Osim kombiniranih, postoje i polivalentna cjepiva koja sadrže imunogene više virusnih sojeva koji izazivaju istu bolest, kao što je četverovalentno cjepivo protiv gripe koje štiti protiv podtipova A(H1N1), A(H3N2) i obje linije virusa tipa B (Victoria i Yamagata) (Centres for Disease Control and Prevention, 2020; Maletic Neuzil i Ortiz, 2016). Objve vrste cjepiva praksa su već desetljećima jer se na taj način smanjuje broj ukupnih doza cjepiva koje pojedinac mora primiti.

U ovom radu, nakon kraćeg opisa povijesti, prevencije i uzročnika gripe, dat je osvrt na konvencionalne biotehnoške metode proizvodnje cjepiva protiv gripe. Na kraju rada iznose se trendovi u razvoju tzv. univerzalnog cjepiva kojim bi se trajno stalo na kraj toj bolesti.

Tablica 1. Povijest pandemije gripe i razvoja cjepiva. U stupcu „Vezano“ nalaze se imena stručnjaka koji su doprinijeli navedenom događaju, tvrtke proizvođači cjepiva ili broj stradalih od pandemije.

Table 1. Timeline of major influenza pandemics and vaccine development milestones. The column „Vezano“ indicates the names of experts contributing to the (flu) vaccine development, the names of flu vaccine manufacturing companies and death toll of flu pandemics.

Godina	Događaj	Vezano
412. p.n.e.	Prvi opis simptoma gripe	Hipokrat
1580.	Prva (dobro) dokumentirana pandemija gripe	Visoka stopa smrtnosti u Euroaziji i Africi
1796.	Prvo cjepivo (velike boginje)	E. Jenner
1892.	Otkriće virusa	D.J. Ivanovski
1918.-1919.	Španjolska gripa (H1N1)	Broj preminulih: 20 do 50 milijuna Stanovnika na planetu: 1,8 milijardi
1933.	Izolacija humanog virusa gripe (tip A)	W. Smith, C. Andrewes, P. Laidlaw
1940.	Izolacija virusa gripe tipa B	T. Francis
1941.	Otkriće hemaglutinina	G. Hirst
1942-1945.	Razvoj inaktiviranog cjepiva protiv gripe i njegova prva primjena	T. Francis, J. Salk, G. Hirst, F. Davenport, E. Kilbourne i dr
1957.-1958.	Azijska gripa (H2N2)	Broj preminulih: 1 do 2 milijuna Stanovnika na planetu: 2,9 milijardi
1967.	Prijedlog povezanosti humanog virusa gripe i virusa ptičjeg porijekla	H.G. Pereira

1968.-1969.	Hongkonška gripa (H3N2)	Broj preminulih: 1 do 3 milijuna Stanovnika na planetu: 3,5 milijardi
1977.-1978.	Ruska gripa (H1N1)	Broj preminulih: 800 tisuća, uglavnom mlađih od 25godina Stanovnika na planetu: 4,2 milijardi
1981.	Otkriće strukture i funkcije hemaglutinina	J. Skehel, D. Wiley, I. Wilson i dr.
2003.	Prvo (EU, SAD) odobreno živo oslabljeno cjepivo protiv gripe, intranazalna aplikacija (<i>FluMist</i>)	MedImmune
2007.	Prvo odobreno cjepivo protiv gripe proizvedeno u kulturi životinjskih stanica (<i>Optaflu</i>)	Novartis
2009.-2010.	Svinjska gripa (H1N1)	Broj preminulih: 200 do 600 tisuća Stanovnika na planetu: 6,8 milijardi
2013.	Prvo odobreno rekombinantno cjepivo protiv gripe (<i>Flu-Blok</i>)	Protein Science Corporation, Sanofi Pasteur od 2017.

Gripa - dijagnostika i prevencija

Kao jedna od najčešćih zaraznih bolesti sezonskog karaktera s vrhuncem u zimskim mjesecima, bolest se pojavljuje u blažim do teškim oblicima, a mogući su i asimptomatski slučajevi. Nažalost u pojedinaca može rezultirati smrću zbog komplikacija u obliku pneumonije, miokarditisa i sepse. Od navedenih komplikacija pod najvećim su rizikom ljudi stariji od 65 godina, kronični bolesnici, imunokompromitirani, trudnice i djeca mlađa od pet godina. U slučaju zaraze preporuka za oboljele koji ne pripadaju rizičnim skupinama je samoizolacija te simptomatsko liječenje. Oboljele od gripe koji se pak ubrajaju u visoko rizične skupine liječi se, osim simptomatski, i protivirusnim lijekovima (antivirocicima) (World Health Organisation, 2019). Europski centar za prevenciju bolesti i kontrolu (ECDC), agencija Europske unije zadužena za nadzor infektivnih bolesti, zajedno sa Svjetskom zdravstvenom organizacijom (WHO) preporučuju oseltamivir i zanamivir kao antivirusne lijekove za liječenje gripe (sezonske, pandemijske i zoonotičke). Oba su spoja inhibitori neuraminidaze (NA), enzima ključnog za širenje virusa u nove stanice pa stoga njegova inhibicija sprječava virusnu infekciju (Shahrour, 2001). Antivirusni primjenjuju se samo u slučaju kada pacijent ima kliničke simptome kompatibilne s gripom za koju su javne zdravstvene ustanove potvrdile da kruži u određenoj populaciji ili ako se specifičnim dijagnostičkim testom potvrdi zaraza (Allen i sur., 2006). Dijagnosticiranje gripe uobičajeno se provodi na temelju simptoma, dok se dijagnoza potvrđuje medicinsko-laboratorijskim dijagnostičkim testovima. Neke od dijagnostičkih metoda koje su u primjeni jesu izolacija virusa u kulturi stanica, imunofluorescentni testovi, amplifikacija nukleinskih kiselina, tj. PCR testovi, imunokromatografski testovi i dr. (Vemula i sur., 2016). Osim u svrhu zdravstvene zaštite, ispravno provedena dijagnostika neophodna je kako bi na vrijeme detektirali nove tipove i podtipove virusa gripe koji kruži u određenoj populaciji čime doprinosimo razvoju cjepiva za nadolazeću sezonu. Kao mjera prevencije i zaštite od gripe provodi se cijepljenje. Cijepljenje se ubraja među najučinkovitije medicinske metode u sprječavanju bolesti i smrtnih ishoda uzrokovanih virusnim infekcijama. Smatra se da je ono spasilo više života od bilo koje druge medicinske metode u posljednjih 50 godina te se nalazi među glavnim razlozima za svjetsku demografsku tranziciju koja podrazumijeva produljenje prosječnog životnog vijeka čovjeka, povećan udio starijih u društvu, urbanizaciju, napuštanje sela i razvoj megagradova (Bloom i Lambert, 2016). Cijepljenje, ili

vakcinacija, je unos posebno pripremljenog biološkog preparata (cjepiva ili vakcine) u organizam, čime se izaziva imunosna zaštita od bolesti, tj. njenog uzročnika (patogena). Protivirusna cjepiva razvijena su kako bi u organizmu potaknula imunosni odgovor u obliku specifičnih proteinskih molekula (protutijela ili imunoglobulina) i specifičnih stanica (T-limfocita) koje će reagirati na ponovni susret s određenim virusnim antigenom. S obzirom na to da imunosni sustav organizma reagira na antigene u cjepivu, nije nužno da njime u organizam unesemo cijelu virusnu česticu, već su za stimulaciju imunosnog sustava putem cjepiva dovoljne samo molekule antigenih karakteristika. Cijepljenje doprinosi izravno onima koji su primili cjepivo, ali i neizravno onima koji se nisu cijepili, tako što se povećanjem udjela cijepljene populacije (procjepljenosti) stvara grupni imunitet pa se smanjuje sveukupna izloženost patogenima (Bloom i Lambert, 2016). Cijepljenje smanjuje broj oboljelih od gripe i smanjuje rizik od ozbiljnih komplikacija koje mogu rezultirati hospitalizacijom i smrću. Svjetska zdravstvena organizacija posebno preporučuje cijepljenje trudnica, djece starosti između 6 mjeseci i 5 godina, starijih od 65 godina, kroničnih bolesnika i zdravstvenih radnika. Prva kolektivna cijepjenja protiv gripe započela su početkom četrdesetih godina prošloga stoljeća u vojsci SAD. Korišteno je još nepotpuno istraženo živo oslabljeno cjepivo koje je sadržavalo viruse tipova A i B. Nedugo nakon se krenulo i s cijepljenjem stanovništva, no ubrzo se opaža nepodudaranje između virusnog soja u cjepivu i sezonskog virusa. Praćenje genske promjenjivosti patogena kao glavnog uzroka navedenog nesklada te nadzor širenja bolesti obveza je međunarodne organizacije Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). Ona je osnovana 1952. godine, a djeluje u sklopu WHO u suradnji s medicinsko-dijagnostičkim laboratorijima diljem svijeta (Barberis i sur., 2016). Osim cijepjenja, prevencija ovisi i o ponašanju pojedinca, pa se tako zaraza i širenje virusa gripe mogu smanjiti pravilnom higijenom, samoizolacijom zaraženih i izbjegavanjem bliskih kontakata s oboljelima. Ipak, najviše novih pandemija, uključujući gripu, posljedica su prijenosa patogena sa životinje na čovjeka. Primarnim domaćinima virusa gripe među životinjama smatraju se ptice vodarice i papkari. Prema Madhav i suradnicima (2017) svake je godine vjerojatnost od pandemije gripe koja bi mogla uzrokovati oko 6 milijuna smrti procijenjena na 1% te se smatra da upravo ona, od svih bolesti, ima najveći pandemijski potencijal. Podaci iz WHO iz 2019. godine govore



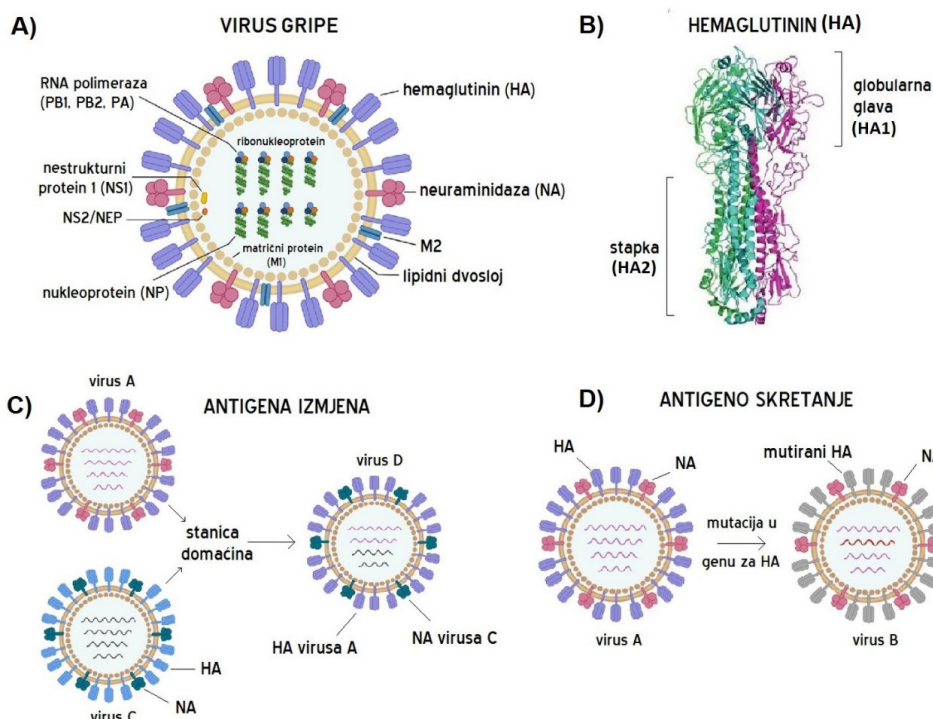
da standardna sezonska gripa godišnje zarazi do milijardu ljudi, usmrti do 650 000 ljudi diljem svijeta, od kojih je do 72 000 u Europi. Otprilike 5 do 15% ukupne svjetske populacije zarazi se gripom tijekom jedne sezone. Sezona gripe u područjima umjerene klime podrazumijeva zimska razdoblja, dakle od travnja do rujna na južnoj hemisferi i od listopada do ožujka na sjevernoj hemisferi. U tropskim je krajevima sezona gripe dulja i, za razliku od područja umjerene klime u kojima se uglavnom

tijekom jedne sezone pojavi vrhunac broja zaraženih, često se tijekom godine pojavljuje više vrhunaca (Wille i Holmes, 2020). Prema analizi podataka 31 zemlje članice WHO, prosječna stopa smrtnosti od gripe u razdoblju od 2002. do 2011., izuzevši pandemiju iz 2009., iznosi 5,9 na 100 000 ljudi (Paget i sur., 2019). Precizni podaci uglavnom variraju ovisno o proučavanom geografskom području, razdoblju godine, tipu i podtipu virusa, ekonomskoj situaciji te starosti ispitivane populacije.

Virus gripe

Tri su tipa virusa gripe – A, B i C koji mogu zaraziti čovjeka i uzrokovati respiratorne probleme. Virus gripe tipa C znatno je rjeđi i ne izaziva epidemije gripe poput tipova A i B (Maletic Neuzil i Ortiz, 2016). Za razliku od tipova B i C koji većinom djeluju na čovjeka, virusom gripe tipa A mogu se zaraziti i drugi sisavci, poput svinja te ptice. Povremeno se dogodi prijelaz virusa gripe s divljih ptica na perad, što može rezultirati zarazom čovjeka, a u konačnici i epidemijama odnosno pandemijama gripe. Virusi gripe su jednolančani, negativno uvijeni RNA virusi iz porodice Orthomyxoviridae (Slika 1A). Već spomenuta tri tipa virusa gripe A, B i C, međusobno se razlikuju, osim po domaćinima i virulentnosti, i po broju segmenata RNA te gradi proteina koji čine vanjski omotač i matriks. Tako virusi tipa A i B sadrže po 8 segmenata RNA, dok tip C sadrži 7 segmenata RNA. Virus gripe tipa A, dominantni patogen koji izaziva gripu i jedini tip virusa gripe koji može uzrokovati pandemiju (Monto i Fukuda, 2019), dodatno je još klasificiran u podtipove ovisno o površinskim glikoproteinima, odnosno različitim kombinacijama hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA) koji su ujedno odgovorni za njegova antigena svojstva i virulentnost (Bouvier i Palese, 2008; James i Whitley, 2017; Maletic Neuzil i Ortiz, 2016). Tako, primjerice, H1N2 označava virus koji ima podtip 1 HA i podtip 2 NA. Ukupno je otkriveno 18 HA podtipova i 11 NA podtipova

(Wei i sur., 2020), od čega tri HA (H1, H2, H3) i dva NA (N1, N2) podtipa najčešće uzrokuju epidemije (Bouvier i Palese, 2008). Vrste tj. linije virusa tipa B jesu B/Yamagata i B/Victoria. Površina virusa gripe tipa A, tj. njegov vanjski omotač, prekriven je šiljatim proteinskim strukturama (eng. spike proteins) koje su građene od glikoproteina HA i NA. Glikoproteini HA i NA, na kojima se nalaze glavni virusni epitopi koje ljudski organizam prepoznaje kao antigene, zaslužni su za prianjanje za površinu stanice domaćina i ulazak u stanicu. Osim glikoproteina HA i NA, specifični viralni proteini virusa gripe tipa A još su i proteini matriksa M1 i M2, heterotrimerne RNA polimeraze, nukleoprotein NP i dva nestrukturalna proteina NS1 i NS2 (NEP). Virusnu česticu okružuje lipidni dvosloj ispod kojeg se nalazi protein M1. Protein M2 jest transmembranski ionski kanal koji prolazi kroz lipidnu ovojnica. Samo središte virusa gripe jest ribonukleoproteinski kompleks (RNP) koji se sastoji od segmenata RNA, nukleoproteina NP i RNA polimeraza (James i Whitley, 2017). Građa virusa gripe tipa B slični gradi virusa tipa A te su ukupno četiri proteina ovojnice - hemaglutinin i neuraminidaza te proteini NB i BM2. Kod virusa tipa C, za razliku od tipova A i B, glavni glikoprotein koji gradi omotač jest fuzionirani hemaglutinin-esteraza protein (HEF), čija funkcija odgovara funkciji glikoproteina HA i NA, a uz njega se u manjoj mjeri nalazi i protein CM2 (Bouvier i Palese, 2008).



Slika 1. A) Građa virusa gripe (prilagođeno prema Jung i Lee (2020)) i B) struktura hemaglutinina (prilagođeno prema Kwong i sur. (2010)). C) Preraspodjela virusnih RNA segmenata (antigena izmjena) događa se u stanici domaćina nakon infekcije različitim tipom virusa. Sklapanjem novih virusnih čestica nastaju novi podtipovi virusa gripe. Na slici je prikazana infekcija virusima A i C pri čemu nastaje izmjenjeni virus D (BioRender.com). D) Ciljanom ili spontanom mutacijom u genu za glikoprotein HA u virusu A nastaje novi soj virusa (virus B) s mutiranim HA. Ova pojava zove se antigeno skretanje (stvoreno pomoću BioRender.com).

Figure 1. A) Influenza virus structure (adapted from Jung and Lee (2020)) and B) hemagglutinin (HA) structure (adapted from Kwong et al. (2010)). C) Redistribution of RNA segments of two viral subtypes inside the host cell leads to creation of a new viral subtype (BioRender.com). D) The changes in amino acid structure of HA, accumulated after induced or spontaneous mutations, are known as antigenic drift (BioRender.com).

Karakteristična genomna struktura virusa, posebice njezina segmentiranost, uzrok su dvjema pojavama koje se odražavaju na antigena svojstva virusa, a zovu se antigeno skretanje (eng. antigenic drift) i antigena izmjena (eng. antigenic shift). Radi se o promjenama u strukturi glikoproteina HA i NA uslijed promjena u kodirajućim genima, a koje vode nastanku novih sojeva virusa. Takvi novi sojevi mogu biti infektivni čak i ako je organizam već prethodno prebolio gripu i posjeduje protutijela za raniji tip virusa (Dimmock i sur., 2016; Maletic Neuzil i Ortiz, 2016). Kod antigene izmjene, virus određenog podtipa prima segment RNA koji kodira za HA ili NA od virusa gripe drugog podtipa koji može biti humanog ili nehumanog podrijetla. Takav oblik rekombinacije virusnog genoma zapravo je međusobna preraspodjela segmenata, a događa se u organizmu koji se istovremeno zarazi s dva virusa različitih podtipova. Između virusa tipa A i virusa tipa B ne događa se međusobna preraspodjela segmenata, a vijabilni virus novog podtipa (soja) nastat će samo u slučaju međusobne kompatibilnosti svih osam segmenata RNA (Dimmock i sur., 2016). Preraspodjelom segmenata dakle nastaju virusi s novim antigenim proteinima, pa ako populacija ne posjeduje imunitet protiv istih, posljedično se može dogoditi pandemija (Slika 1C). U slučaju antigenog skretanja radi se o promjenama aminokiselinskog sastava antigenih glikoproteina HA i NA uzrokovanih fiksiranim mutacijama, primjerice točkastim (Slika 1D). (Ziegler i sur., 2018). I antigeno skretanje i antigena izmjena u konačnici omogućuju prirodnu selekciju virusa samo onih antigenih varijanti koje su u mogućnosti adaptirati se i uzrokovati infekciju, izbjegavajući neutralizaciju protutijelima domaćinskog organizma (Wille i Holmes, 2020). Protutijela razvijena protiv glikoproteina HA sprječavaju infekciju pa je stoga HA glavni antigen na kojem se temelji većina cjepiva protiv gripe. Protutijela protiv HA dijele se na ona koja reagiraju s domenom globularne glave (podjedinica HA1) i ona koja reagiraju na domenu stapke (podjedinica HA2) (Slika 1B) (Soema i sur., 2015). Značajno je da je stapka stabilnija, tj. manje podložna promjenama od globularne glave. Protutijela koja reagiraju na NA, drugi najvažniji površinski protein virusa, ne sprječavaju infekciju, ali će smanjiti oslobađanje i širenje virusa. Količina HA u odobrenim cjepivima mora biti točno određena i standardizirana, dok količina NA može ovisiti o sastavu cjepiva i tehnološkom postupku (Wei i sur., 2020). Proteini M2 i NP također imaju antigena svojstva i važni su za replikaciju virusa, no imunosna reakcija u obliku protutijela na navedene proteine ne može neutralizirati virus (Wong i Webby, 2013).

Cjepivo protiv gripe

Cjepiva protiv gripe upotrebljavaju se već više od 70 godina. Godine 1935. po prvi su puta znanstvenici iskoristili embrionirana jaja kokoši te umnožili virus žute groznice i gripe u tkivu živućeg pilećeg embrija. Dvadesetak godina kasnije značajni napredak u uzgoju životinjskih stanica in vitro omogućio je razvoj posve nove, učinkovitije tehnologije cjepiva. Unatoč tom napretku i brojnim pokušajima, prvo cjepivo protiv gripe proizvedeno tehnologijom stanica odobreno je u EU tek 2007. godine. Glavni cilj industrijske proizvodnje cjepiva jest osigurati sigurno i djelotvorno cjepivo, a da pritom proizvodnja bude što izdašnija, te sljedno tome i ekonomski isplativa. Biotehnoška proizvodnja virusnih cjepiva sastoji se od tri faze. Prvu čine uzvodni postupci (eng. upstream processing), koji uključuju izbor virusnog soja, pripremu virusnog supstrata kao i sam tijekom umnažanja virusa u supstratu. Nizvodni postupci (eng. downstream processing) druga su faza proizvodnje, a čini ju niz operacija izdvajanja i pročišćavanja virusnog imunogena iz supstrata. Konačna faza je formulacija proizvoda u komercijalni pripravak te provjera njegove čistoće i djelotvornosti (Jiskoot i sur., 2019; Wen i sur., 2015). Tehnologije odobrene za proizvodnju cjepiva protiv gripe u industrijskom mjerilu su: proizvodnja virusa pomoću oplodjenih (embrioniranih) kokošnjih jaja (in ovo), pomoću kulture životinjskih stanica te primjenom rekombinantne DNA u kulturi stanica kukaca. Novu tehnologiju pokušava uvesti kanadska tvrtka Medicigo

koja je proizvela cjepivo na principu čestica VLP u biljci duhana pomoću *Agrobacterium* vektora (D'Aoust i sur., 2008). Ono je još od 2014. na kliničkom ispitivanju, a najnoviji rezultati su vrlo ohrabrujući (<https://clinicaltrials.gov; NCT03739112>). Zbog činjenice da je svako novo optimiranje proizvodnih tehnika biofarmaceutskim kompanijama preskupo, većina cjepiva protiv gripe i dalje se proizvodi najstarijom tehnologijom tj. pomoću kokošnjih jaja. Unatoč zastarjelosti ove tehnologije, bez nje se ne mogu zadovoljiti godišnje potrebe za cjepivom koje su u uvjetima bez pandemije do 1,5 milijardi doza (Wei i sur., 2020). Međutim, predviđa se kako će u sljedećih desetak godina proizvodnja cjepiva pomoću staničnih kultura i tehnologije rekombinantne DNA rezultirati formulacijama veće učinkovitosti i posve zamijeniti in ovo tehnologiju. Tome doprinosi podatak istraživanja iz SAD-a po kojem su cjepiva proizvedena na staničnim kulturama 11% učinkovitija i s manje nuspojava, posebno u pacijenata starijih od 65 godina (Mirasol, 2019). Na odabir tehnologije cjepiva danas najviše utječu vrsta proizvoda i mjerilo proizvodnje. Kod izrade viševalentnih cjepiva, bilo kojom od postojećih tehnologija, svaki virusni soj ili imunogen proizvodi se i pročišćava zasebno, a onda se zajedno doziraju u konačnu formulaciju.

Odabir i izrada virusnog soja

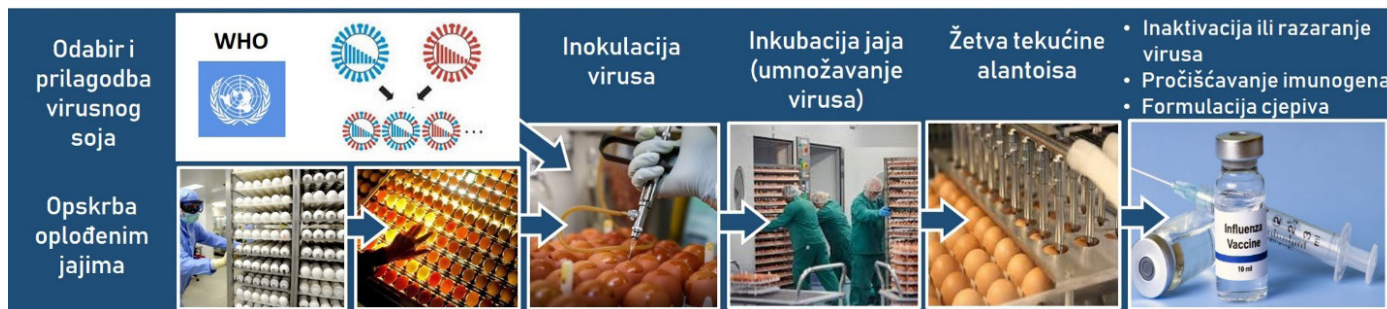
Glavna uloga organizacije GISRS je dva puta godišnje na temelju uvida u laboratorijske rezultate dati preporuke proizvođačima o virusnim sojevima koji bi se trebali naći u sastavu cjepiva za nadolazeću sezonu. Sama proizvodnja cjepiva je pomno vremenski isplanirana jer nakon što WHO objavi preporuke za njegov sastav, proizvođači imaju 6 mjeseci za proizvodnju oko 500 milijuna doza cjepiva (Milián i Kamen, 2015; Wei i sur., 2020). U slučaju pandemije isto bi cjepivo trebalo biti spremno u roku od nekoliko tjedana (Gallo-Ramírez i sur., 2015). Vremenska ograničenost je stoga jedan od najvećih izazova u proizvodnji cjepiva protiv gripe te poticaj za razvoj bržih i učinkovitijih proizvodnih postupaka. Nakon objave preporuka WHO, početni korak proizvodnje jest prikupiti ili konstruirati ishodišne virusne sojeve koji će se distribuirati proizvođačima diljem svijeta kako bi antigeni sastav cjepiva bio ujednačen (Milián i Kamen, 2015). Preporučeni, tj. potencijalni patogeni virusni sojevi izoliraju se iz kliničkih uzoraka te se provjerava njihov rast u jajima, a u slučaju slabog rasta, virus prolazi kroz tzv. antigenu izmjenu. Radi se o prirodnom mehanizmu preraspodjele RNA segmenata opisanom u prethodnom poglavlju. Potencijalnim patogenom zarazi se embrionirano kokošje jaje zajedno s laboratorijskim sojem virusa koji ima svojstvo dobrog rasta u jajima, a nije nužno patogen. Međusobnom preraspodjelom virusnih segmenata između dva virusa u jajetu nastat će novi hibridni virusi od kojih se izolira onaj koji ima svojstvo dobrog rasta u jajima i posjeduje antigene karakteristike koje odgovaraju preporukama WHO (Rajaram i sur., 2020). Drugi pristup pri konstruiranju preporučenih sojeva virusa pogodnih za tehnološku proizvodnju je primjena reverzne genetike. Genetski materijal željenog soja stvara se iz DNA komplementarne (cDNA) segmentima RNA patogenih virusnih sojeva pomoću enzima reverzna transkriptaza. Sekvence cDNA zatim se kloniraju u plazmidne vektore koji se unesu u stanice in vitro gdje se stvara željeni hibridni patogeni soj. Reverzna genetika pogodniji je pristup za proizvodnju virusa u staničnim kulturama od pristupa ko-infekcije u jajima koji može rezultirati virusima koji će davati visoke prinose u jajima, ali ne i u staničnim linijama sisavaca (Milián i Kamen, 2015). Prije pokretanja industrijske proizvodnje cjepiva, antigena svojstva odabranih hibridnih virusa testiraju se in vivo na miševima ili afričkim tvorovima. Još uvijek je važeće regulatorno pravilo da svaki odabrani virusni soj mora proći adaptaciju uzgoja in ovo prije distribucije proizvođačima cjepiva, bez obzira na tehnologiju proizvodnje.



Proizvodnja cjepiva protiv gripe pomoću kokošjih jaja

Uobičajena metoda proizvodnje cjepiva pomoću kokošjih jaja započinje inokulacijom ciljanog virusnog soja u alantoičnu šupljinu oplodjenog jajeta starog 9-11 dana. U jednom ciklusu proizvodnje iskoristi se 10 do 25 tisuća jaja (Slika 2). Inokulirani virus umnaža se u tkivu pilećeg embrija, razara stanice i nakuplja u tekućini alantoisa. Nakon dva ili tri dana inkubacije u kontroliranim uvjetima, jaja se pothlađuju, a zatim slijedi aseptično prikupljanje alantoične tekućine (Robinson, 2016). U nizvodnim postupcima, čestice virusa se ugušćuju zonalnim centrifugiranjem u sukroznom gradijentu, a onda slijedi njihova inaktivacija formaldehidom (0,02%, 24h) ili β -propiolaktonom (0,1%, 24h). Nakon dijafiltracije kojom se uklanja sredstvo inaktivacije, često

je sljedeći korak razlaganje virusa na podjedinice primjenom deterdženta (Triton X-100). Dijelovi razorenog virusa prikupljaju provedbom adsorpcijske kromatografije kojom se odstranjuje deterdžent. Zadnji korak je sterilna filtracija. Živa oslabljena cjepiva imaju zahtjevnije uzvodne postupke (zbog pripreme i selekcije oslabljenog soja), dok je nizvodno procesiranje minimalno i uključuje samo izolaciju virusa. U tom je slučaju konačani proizvod nestabilniji i zahtijeva čuvanje u zamrznutom obliku (Robinson, 2016). Formulirano cjepivo u potrebnim količinama za nadolazeću sezonu može se naći na tržištu za otprilike šest do sedam mjeseci od preporuke virusnog soja proizvođačima.



Slika 2. Koraci u proizvodnji cjepiva pomoću embrioniranih kokošjih jaja (preuzeto i prilagođeno iz <http://www.vaccinews.net/>).
Figure 2. Major steps in influenza vaccine production with embryonated chicken eggs. (adapted from <http://www.vaccinews.net/>).

Unatoč još uvijek velikoj zastupljenosti, proizvodnja cjepiva pomoću embrioniranih kokošjih jaja smatra se neprikladnom zbog moguće nedostupnosti dovoljnih količina jaja, osobito u slučaju pandemije. U posebnim uzgajalištima gdje se zrak filtrira, a hrana i voda steriliziraju, uzgajaju se jata posebnih kokoši nesilica. Jaja tih kokoši su čista od skupine specifičnih patogena (eng. specific pathogen free), a da bi takva i ostala potrebni su posebni uvjeti njihovog skladištenja i transporta. Sve to utječe na ukupne troškove proizvodnje. Osim toga, problem je i u mogućim alergijama na rezidualne proteine jaja te relativno dugom vremenu potrebnom za plasman komercijalnog cjepiva. Manjkavosti ove tehnologije smatraju se razlogom za mnoge nepovoljne reakcije pacijenata i oko 79 000 smrtnih slučajeva u sezoni gripe 2017./2018. (Mirasol, 2019). Unatoč navedenim nedostacima, proizvodnja in ovo je vrlo značajna i godišnje osigurava oko 500 milijuna doza. Njeni su proizvodi inaktivirani i fragmentirani cjepiva poput Afluria (Seqirus), Flulaval (GSK) i Fluarix (GSK) koja su najčešće formulirana kao četverovalentna. Istog tipa je i Fluzone (Sanofi Pasteur), koje može doći kao pripravak dvostruko veće doze (HD) za stariju populaciju. Živa oslabljena cjepiva iste tehnologije su FluMist (MedImmune) i jedno cjepivo razvijeno kasnih osamdesetih godina prošlog stoljeća u ruskom Institutu za eksperimentalnu medicinu (Romanova, 2017).

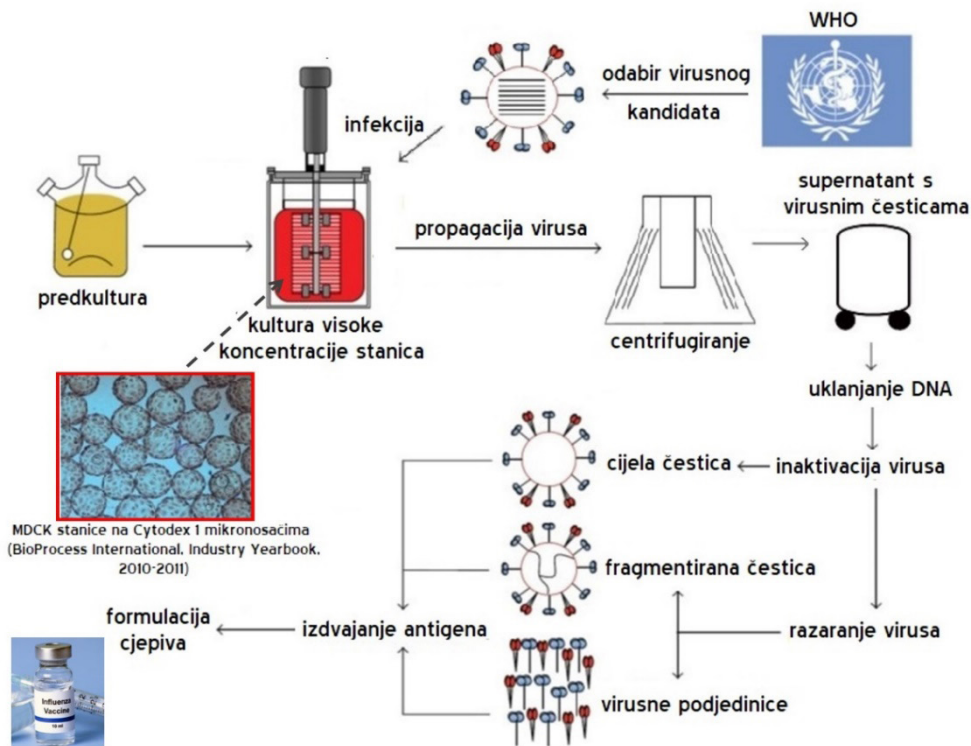
Proizvodnja cjepiva protiv gripe pomoću kulture životinjskih stanica

Kultura životinjskih stanica u istraživanju i proizvodnji cjepiva protiv gripe koristi se već desetljećima, ali je prvo cjepivo dobiveno pomoću stanica odobreno tek prije manje od dvadeset godina. Na tržištu danas ima nekoliko cjepiva dobivenih ovom tehnologijom, a za svako od njih korištena je jedna od tri kontinuirane (besmrtna) stanične linije: MDCK, Vero i Sf9. Većina akademskih istraživanja kao i sama tehnološka proizvodnja cjepiva protiv gripe provodi se pomoću MDCK stanica (eng. Madin Darby canine kidney). To su immortalizirane stanice porijeklom iz bubrega koker španijela, uspostavljene kao kultura in vitro prije više od 60 godina. Karakteristika im je relativno spori rast i manji prinos virusa od konkurentnih Vero stanica, ali poboljšanjem sastava hranjivog medija i samih tehnika uzgoja posljednjih 20 godina ta se svojstva znatno promijenila (Genzel i Reichel, 2009). Najčešće su uzgajane kao adherentna kultura koja raste imobilizirana na čvrstoj podlozi ili nosaču u tekućem hranjivom mediju. Tako se proizvodilo cjepivo Influvac (Abbot, Solvay), međutim proizvodnja mu je već desetak godina obustavljena. Mogući razlog toj obustavi je pojava kulture MDCK stanice koja raste suspenzijski (tj. novisna o imobilizaciji) u mediju bez dodanog seruma (MDCK 33016-PF), a koju je prije dva desteljeća licencirala tvrtka Novartis. Ovom staničnom linijom proizvode se polivalentna fragmentirana cjepiva Optaflu (EU) i Flucelvax (USA) (Doroshenko i Halperin, 2009). Osim MDCK, dugu povijest u tehnologiji cjepiva ima i Vero stanična linija. Radi se o stanicama izoliranim iz bubrega afričkog zelenog majmuna 60-ih godina prošlog stoljeća, i prva je kontinuirana

(besmrtna) stanična linija preporučena od WHO za proizvodnju cjepiva protiv gripe. Stanice rastu kao adherentna kultura i to, za razliku od MDCK, u više slojeva. Uspostava suspenzijske kulture nije se pokazala uspješnom jer su stanice prilično osjetljive na hidrodinamički stres i promjenu sastava medija pri takvom uzgoju. Viševalentno cjepivo Celvapan i jednovalentno Preflucel (Baxter) proizvodi su tehnologije Vero stanica (Montomoli i sur., 2012). Osim MDCK i Vero staničnih linija, pogodna kultura za proizvodnju cjepiva protiv gripe je i PER.C6 uspostavljena iz humanog embrionalnog retinoblastoma. Njena prednost je rast u suspenziji i znatno bolja genomska stabilnost u odnosu na MDCK i Vero, što je vrlo važno za održivost biotehnoških postupaka. Dosadašnja istraživanja pokazala su ipak nešto slabiju imunogenost cjepiva dobivenih iz ovih stanica pa je nužna dodatna optimizacija proizvodnje (Pérez Rubio i Eiros, 2018). U novije vrijeme spominje se i kultura stanica PBG.PK2.1 porijeklom iz bubrega svinje. Ona je kontinuirana, suspenzijska i raste dobro u kemijski definiranim mediju, a dosadašnja istraživanja pokazala su izvrsne rezultate u prinosu virusa što ih čini novim kandidatom za razvoj cjepiva (Gränicer i sur., 2019). U proizvodnji sezonskih cjepiva protiv gripe zastupljena je kultura suspenzijske linije MDCK stanica prilagođena hranjivom mediju bez seruma, te adherentna kultura Vero stanica uzgajana u hranjivom mediju s fetalnim govedim serumom. Serum se dodaje kao bogat izvor nutrijenata i poticatelj staničnog rasta, no sve se više izbjegava zbog oslozljavanja nizvodnih postupaka i visoke cijene (Jayme, 2007). Proizvodnja cjepiva

adherentnim kulturama u manjem mjerilu može se provesti u tzv. rotirajućim bocama ili višestrukim T-bocama. Stanice rastu prihvaćene za stijenku boca, prekrivene medijem, i tamo se inficiraju kad postignu odgovarajuću obraslost, tj. konfluentnost. Pri proizvodnji većih količina cjepiva, stanice se imobiliziraju na mikro-čestice tzv. mikronosače, i onda s hranjivim medijem unose u bioreaktor gdje bivaju suspendirane miješalima ili njihanjem (Bissinger i sur., 2019). Uzgoj suspenzijskih kultura znatno je ekonomičniji, pa stoga i poželjniji, jer je prijenos u veća tehnološka mjerila manje zahtjevan. Prvi korak je propagacija stanica u sustavima od 3 do 50 litara nekoliko dana, nakon čega se kultura prebacuje u bioreaktor većeg volumena (500 do 6000 litara). Kad stanična kultura dostigne koncentraciju od oko milijun stanica po mililitru, kreće se s infekcijom odabranim virusnim sojem. Prije toga potrebno je još zamijeniti medij za rast stanica medijem prilagođenim proizvodnji virusnih čestica. Za uspješnu virusnu infekciju u medij se dodaju i proteaze, poput tripsina, koje cijepaju hemaglutininski prekursor u aktivan oblik što omogućava bolju adsorpciju virusnih čestica na stanice. Ovakvim postupkom tijekom 3 do 5 dana može se proizvesti do milijardu čestica virusa gripe u mililitru kulture. Procijenjuje se da oko tisuću litara MDCK stanične kulture daje jednaku količinu virusa kao i 31 000 kokošjih jaja (Genzel i Reichel, 2009). Nizvodni postupci

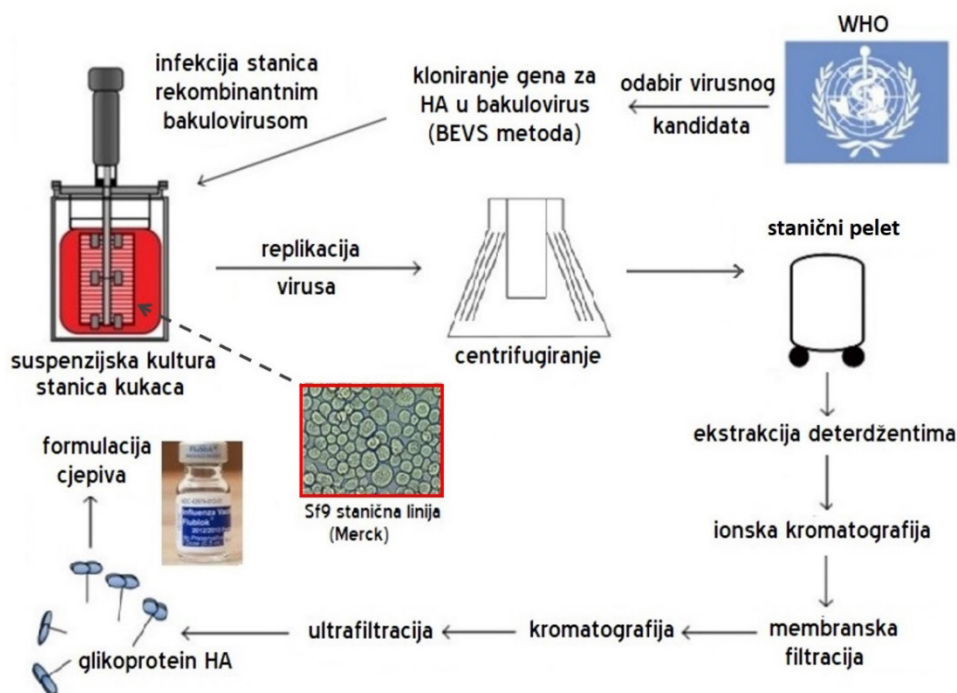
tj. postupci inaktivacije i pročišćavanja umnoženog virusa, započinju odvajanjem hranjivog medija s virusnim česticama od stanica odnosno mikronosača. To se najučinkovitije postiže blagim centrifugiranjem (suspendirane stanice) ili filtracijom (mikronosači). Virusi zadržani u mediju zatim se inaktiviraju određenim kemijskim sredstvom, primjerice formaldehidom ili β -propiolaktomom, a dodatno i drugim načinima, poput UV zračenja. U nastavku slijedi ugušćivanje inaktiviranih čestica procesima ultrafiltracije i diafiltracije uz uklanjanje nečistoća, a permeat se dalje pročišćava zonalnim centrifugiranjem ili kromatografski. Sljedeći važni korak je tretman endonukleazom (Benzonaza) radi eliminacije zaostalih nukleinskih kiselina. Regulatorne institucije vrlo su stroge po pitanju tragova svih vrsta nukleinskih kiselina u konačnom proizvodu kako bi se izbjeglo njihovo potencijalno onkogeno djelovanje. Ako se proizvodi fragmentirano cjepivo, sljedeći korak je tretman neionskim deterdžentima ili polisorbitima koji razaraju virus razlažući mu ovojnica. Prije same formulacije cjepiva obavlja se sterilna filtracija radi uklanjanja potencijalnih mikrobnih kontaminanata (Milián i Kamen, 2015). Standardni tijek proizvodnje (Slika 3), uključujući odabir i prilagodbu virusnog soja, traje skoro koliko i postupak in ovo, a dobru usporedbu hodograma obje tehnologije opisali su Chen i suradnici (2020).



Slika 3. Glavni koraci u proizvodnji cjepiva protiv gripe pomoću MDCK stanica (preuzeto i prilagođeno iz Milián i Kamen (2015)).
Figure 3. Major steps in influenza vaccine production with MDCK cell culture (adapted from Milián & Kamen (2015)).

Rekombinantna cjepiva protiv gripe proizvode se pomoću stanične linije Sf9 uspostavljene iz stanica noćnog leptira *Spodoptera frugiperda*. Osnova su im isključivo antigeni dijelovi virusa, tj. jedan ili više odabranih proteina virusnog omotača dobiveni tehnikama rekombinantne DNA. Zasad jedino rekombinantno cjepivo protiv gripe je FluBlok (Protein Sciences Corporation, Sanofi Pasteur), a proizvedeno je u kulturi suspenzijskih Sf9 stanica (expressSF+) u mediju bez seruma, koristeći bakulovirusni ekspresijski vektorski sustav (BEVS). Jedna od prednosti tehnologije rekombinantne DNA je što nema adaptacije preporučeneog soja virusa staničnom supstratu, već se proizvedeni rekombinantni proteini (antigeni) odmah podudaraju s onima u preporučenoj soju. Osim toga BEVS se temelji na korištenju za ljude nepatogenog bakulovirusa, te su pojačane mjere biološke zaštite

u proizvodnji nepotrebne. Princip djelovanja BEVS-a je infekcija Sf9 stanica rekombinantnim bakulovirusom koji služi kao vektor u koji je kloniran gen za HA preporučeneog virusnog soja. Ekspresijom gena u inficiranim Sf9 stanicama nastaju rekombinantne HA molekule (rHA) izrazito dobre konformacije (tj. antigenih svojstava). One u stanicama spontano agregiraju u strukture od 6 do 8 molekula i nakupljaju se u staničnoj membrani (Li i sur., 2015). Prikupljanje agregata iz kulture kreće već 2 do 3 dana nakon infekcije stanica, a postupak započinje ugušćivanjem stanica blagim centrifugiranjem i zatim liziranjem deterdžentom (Slika 4). Nizom kromatografskih i filtracijskih postupaka dolazi se do pročišćenih rHA. Od kloniranja HA gena do formulacije cjepiva može proći manje od 75 dana, što je dvostruko kraće nego u prethodne dvije tehnologije (Milián i Kamen, 2015)



Slika 4. Osnovni koraci proizvodnje rekombinantne molekule HA u Sf9 stanicama (preuzeto i prilagođeno iz Milián i Kamen (2015)).
Figure 4. Major steps in recombinant HA production in SF9 cell culture (adapted from Milián & Kamen (2015)).

Formulacija i sastav cjepiva protiv gripe

Budući da je put cjepiva od proizvođača do krajnjeg korisnika često dug, nužno je osigurati stabilnu formulaciju koja održava nativnu biološku strukturu antigena i njegovu imunogenost. Karakterizacija i kvantifikacija pročišćenih virusnih antigena najčešće se provodi standardnim hemaglutinacijskim testom s pilećim eritrocitima ili rijeđe imunodetekcijski (ELISA). Kako bi konačno cjepivo bilo stabilno i učinkovito, osim izvora antigena, cjepivo mora sadržavati i tvari poput adjuvansa, konzervansa i stabilizatora. Adjuvansi su imunostimulirajuće tvari čija je svrha povećati učinkovitost samog cjepiva pojačavajući imunostni odgovor na antigenu komponentu cjepiva (Jiskoot i sur., 2019; Priddy i Middaugh, 2015). Uglavnom se ne primjenjuju za živa oslabljena cjepiva, a kod inaktiviranih ili podjediničnih cjepiva doprinose smanjenju doze aplicirane cijepljenjem. Antigen se ili veže na molekulu adjuvansa ili s njom tvori koloid. Najstariji i danas često korišteni adjuvansi su koloidni aluminijevi spojevi (hidroksidi, fosfati i sl.), tu su zatim emulzije tipa ulje u vodi, a od novijih monofosforil-lipid A (MPL) koji je dio bakterijskog endotoksina i dolazi u kompleksu s aluminijevim hidroksidom (Dimmock i sur., 2016, Jiskoot i sur., 2019). Inaktivirano cjepivo protiv gripe Fluad (Sequirus) proizvedeno tehnologijom in ovo sadrži kao adjuvans vodenu emulziju ulja skvalen (MF59) i najčešće se koristi za stariju populaciju koja sprječava razvoja potreban imunostni odgovor. Nepovoljne nuspojave cijepjenja poput narkolepsije pripisane adjuvansu AS03 (emulzija skvalena i α -tokoferola) u monovalentnom fragmentiranom cjepivu Pandemrix (GSK), razvijenom in ovo u vrijeme pandemije 2009., izazvale su polemike o sigurnosti adjuvansa u cjepivima (Christensen, 2016). Konzervansi, poput timerosala, spoja na bazi netoksičnog organoživnog spoja, dodaju se kako bi se spriječio rast bakterija i gljivica. Neka cjepiva protiv gripe, naročito ona kojima se cijepi s više doza, sadrže timerosal, iako se njegov dodatak sve više izbjegava (World Health Organisation, n.d.). Nakon što se odredi bioaktivni oblik imunogena, formulacijom se zadaju fizikalni i kemijski uvjeti u kojima će imunogen takav i ostati (Priddy i Middaugh, 2015). Zato se cjepivu dodaju stabilizirajuće tvari koje održavaju potrebnu pH-vrijednost i redoks-potencijal. Zbog čuvanja cjepiva na niskim

temperaturama poželjne su termostabilne formulacije, odnosno dodatak spojeva koji sprječavaju agregaciju aluminijevih soli (dodane kao adjuvansi) pri niskim temperaturama (Pelliccia i sur., 2016). Neki su od stabilizirajućih agensa magnezijeve soli, natrijev glutamat, laktoza-sorbitol, želatina-sorbitol i sl. (World Health Organisation, n.d.). Pored tvari koje se dodaju radi očuvanja i poboljšanja cjepiva, u sastavu nekih od formuliranih doza zaostaju neškodljive količine spojeva korištenih tijekom proizvodnje. Tako se ponekad mogu naći tragovi inaktivirajućih spojeva poput formaldehida ili ostaci antibiotika koji su korišteni za sprječavanje bakterijskih kontaminacija tijekom proizvodnje pomoću životinjskih stanica. Antibiotici koji mogu izazvati alergije, poput penicilina, ne upotrebljavaju se u procesu proizvodnje. U tragovima se mogu pronaći i neškodljive količine proteina jajeta kod primjene tehnologije in ovo te proteina i nukleinskih kiselina domaćinskih stanica ili samih virusa. Konačna formulacija ovisi ponajprije o složenosti samog imunogena, ali i o načinu unošenja cjepiva u organizam. Količina imunogena (HA, NA i M1) svakog pojedinog soja, u jednoj dozi cjepiva postavlja se na 15 do 45 mikrograma. Zajedno s nekim od gore navedenih dodataka oni čine suspenziju u izotoničnom fosfatnom puferu koja se unosi intramuskularno ili supkutano iglom. Alternativno, cjepivom FluMist (MedImmune) koje se proizvodi kao sprej za intranazalnu primjenu moguće je cijepjenje putem sluznice (Jiskoot i sur., 2019).

Nova generacija cjepiva protiv gripe

Zbog izazovne proizvodnje cjepiva protiv gripe, proizvođači teže k jednostavnijim i idealnijim rješenjima. Rajaram i suradnici (2020) ističu tri razloga zbog kojih današnja cjepiva ne pružaju potpunu zaštitu. Pored nepodudaranja virusnih sojeva u cjepivu s onim u populaciji (kako zbog novih antigenih varijanti tako i kasnih preporuka nadležnih organizacija) tu su još i individualne razlike u našem imunom odgovoru, te adaptacija virusa na proizvodni supstrat. Adaptacija virusa na stanice pilećeg embrija podrazumijeva antigene promjene koje su se dogodile tijekom umnažanja virusa u jajima. Stanice sisavaca i stanice ptica imaju različite

površinske receptore, a s obzirom da tijekom proizvodnje cjepiva stanice pileta inficiramo virusom prilagođenim na infekciju stanica sisavaca, virus se mora adaptirati na nove receptore. Prilikom te adaptacije mogu se dogoditi promjene antigenih karakteristika virusa zbog kojih će takvo cjepivo biti manje učinkovito. U razdoblju od 2002. do 2015. godine zabilježeno je čak pet slučajeva nepodudaranja sezonskih virusnih sojeva sa sojevima u sastavu cjepiva po preporuci WHO (Rajaram i sur., 2020). Ovakvi nepovoljni događaji već desetljećima usmjeravaju istraživanja na stvaranje tzv. univerzalnog cjepiva protiv gripe. Za njegov razvoj ključan je pronalazak očuvanih antigenih regija na virusu gripe koje bi u cijepjenom organizmu potaknule tzv. unakrsno-reaktivni imunitet. On se temelji na stvaranju neutralizirajućih protutijela koja reagiraju s više virusnih podtipova zbog sličnosti njihovih antigena. Takva je primjerice HA2 podjedinica koja čini većinski dio stapke HA glikoproteina. Iako je HA2 subdominantniji dio molekule HA u poticanju imunostne reakcije (dominantni imunogen je globularna glava tj. HA1 podjedinica HA), očuvanost stapke i poticanje stvaranja široko neutralizirajućih protutijela u organizmu omogućili su različite pristupe u svrhu razvoja univerzalnog cjepiva temeljenih upravo na stapci HA. Osim stapke HA, očuvanima se pokazala i većina ostalih virusnih proteina poput NA, M2e regija M2 ionskog kanala, nukleoprotein (NP) te protein matriksa M1 (Chen i sur.,

2020; Jang i Seong, 2019; Kumar i sur., 2018; Pica i Palese, 2013) koji se mogu proizvesti rekombinantno ili čak sintetski. U ovome je trenutku nekolicina kandidata za univerzalno cjepivo protiv gripe u fazi kliničkog ispitivanja, no niti jedno još nije izašlo na tržište. Vodeći kandidat je M-001 rekombinantno peptidno cjepivo proizvedeno u *E. coli* (Phillipson i sur., 2019) koje sadrži epitope podrijetlom iz proteina matriksa M1, NP i HA. M-001 trenutno se nalazi u trećoj fazi kliničkog ispitivanja koje se provodi na 12 463 ljudi, a završetak se očekuje u prosincu 2020. (<https://clinicaltrials.gov>; NCT03450915). Drugi potencijalni kandidati su primjerice MVA-NP+M1 (NP i M1 epitopi eksprimirani pomoću adenovirusnog vektora), Flu-V (sintetički peptid, sadrži epitope NP, M1 i M2) te OXV836 (VLP koji prezentira NP) (Chen i sur., 2020; Del Campo i sur., 2019; Fukuyama i sur., 2020). OXV836 i Flu-V završili su drugu fazu kliničkog ispitivanja (NCT03594890, NCT03180801), dok je MVA-NP+M1 u drugoj fazi i završetak ispitivanja očekuje u listopadu 2021. (NCT03880474). Tablica 2 donosi sažeti prikaz najznačajnijih pristupa u razvoju tzv. cjepiva nove generacije opsežnije opisanih u nizu novijih, uglavnom preglednih radova: Chen i sur. (2020), Harding i Heaton (2018), Krammer (2016), Kumar i sur. (2018), Jang i Seong (2019), Jazayeri i Poh (2019), Madsen i Cox (2020), Nachbagauer i Palese (2020) i Sautto i sur. (2018).

Zaključci

Napredak razvoja cjepiva protiv gripe je spor, ali učinkovit, i u posljednja dva desetljeća potvrđen na tehnološkoj i kliničkoj razini. Najbolji dokazi tome su prijelaz s tehnologije in ovo na kulturu životinjskih stanica, razvoj rekombinantnih podjedinčnih cjepiva kao i aerosolna vakcinacija. Dodatni naponi svakako su potrebni u stvaranju brže i izdašnije proizvodnje cjepiva. Drugačiji smjer razvoja, koji bi smanjio ulaganja u unaprijeđenje tehnologija, je razvoj univerzalnog cjepiva. Naime, njime bi se izbjegla povremena odstupanja u predviđanju sezonskog patogena, osigurala učinkovita i dugotrajna zaštita protiv većine (ili svih) sojeva virusa, ali i rasteretio često intenzivan postupak proizvodnje cjepiva. U najboljem slučaju gripa bi postala bolest prošlosti. U jeku pandemije nove respiratorne bolesti COVID-19, i pod prijetnjom nekih budućih, takav ishod je više nego poželjan.

Tablica 2. Pregled strategija razvoja nove generacije cjepiva protiv gripe.

Table 2. Overview of strategies for development of new generation influenza vaccine.

Pristup	Princip	Prednosti	Nedostaci	Perspektiva
Bezglavo HA cjepivo	Uklonjena globularna glava (HA1). Cjepivo prezentira samo stapku molekule (HA2).	Očuvanost HA2. Unakrsna imunostna reakcija.	Zahtjevna priprema. Nestabilna konformacija. Nova konformacija mijenja epitope HA2.	Konstruiranje mini-HA ili VLP koji prezentiraju samo epitope HA2. Prezentiranje HA2 ili mini-HA na molekulama feritina.
Kimerno HA cjepivo	HA sastavljeni od standardne HA2 i neuobičajenih HA1. Višestrukim doziranjem HA različitih HA1, potiče se imunostni odgovor prema HA2.	Nativna struktura HA. Učinkovita unakrsna imunostna reakcija i za sezonske i pandemijske sojeve virusa.	Imunostna subdominantnost HA2. Višestruke doze. Stvaranje protutijela za irelevantne HA1.	Završena prva faza kliničkog ispitivanja za dva tipa cjepiva (<i>Clinical Trials</i> : NCT03300050, NCT03275389)
Glikanski štit	Uvođenje glikanskih skupina na HA1 (hiperglikolizacija) preusmjerava imunostni odgovor prema HA2. Uklanjanje glikana sa HA i NA kako bi otkrili zaštićene i očuvane antigene regije.	Očuvanost regija. Unakrsna imunostna reakcija. Stvaranje protutijela za NA.	Utjecaj na konformaciju HA. Moguće mutacije unutar otkrivenih antigenih regija.	Proizvodnja monoglikoliziranog HA u jajima uz kifunenzin i endoglikozidazu H.
VLP čestice	Podjedinčna cjepiva koja prezentiraju odabrane očuvane virusne antigene komponente, primjerice znatno očuvani M2e.	Dobra imunogenost. Aktivacija staničnog i humoralnog imuniteta. Proizvodnja rekombinantnom tehnologijom, u životinjskim stanicama i biljkama.	Primjena adjuvansa. Primjena samog M2e neučinkovita. Zahtjevna proizvodnja (razvoj proizvodnog sustava i optimizacija proizvodnog procesa).	Kombinacija više očuvanih virusnih antigenih komponenti i epitopa.



Izabrani epitopi	Peptidno cjepivo kao mješavina više virusnih epitopa.	Kombinacija više epitopa. Sigurnost. Proizvodnja rekombinantnom tehnologijom i sintetički.	Neispravna konformacija epitopa. Slaba imunogenost. Nužni adjuvansi i nosači (liposomi, virosomi)	Vodeći kandidati za univerzalno cjepivo <i>M-001</i> te <i>FLU-v</i> .
------------------	---	--	---	--

Literatura

- Allen U. D., Aoki F. Y. i Stiver H. G. (2006) The use of antiviral drugs for influenza: recommended guidelines for practitioners. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5) 273-284.
- Barberis I., Myles P., Ault S.K., Bragazzi N.L., Martini M. (2016) History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(3) 115-120.
- Bissinger T., Fritsch J., Mihut A., Wu Y., Liu X., Genzel Y., Tan W.S., Reichl U. (2019) Semi-perfusion cultures of suspension MDCK cells enable high cell concentrations and efficient influenza A virus production. *Vaccine*, 37(47) 7003-7010.
- Bloom B.R., Lambert P.H. (ed) (2016) Preface. U: *The Vaccine Book*, str. 15-17, 2. izd., Academic Press, Elsevier, London, UK.
- Bouvier N. M., Palese P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 49-53
- Centres for Disease Prevention and Control (2020) Influenza (Flu): Quadrivalent Influenza Vaccine. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/quadrivalent.htm>. Pristupljeno 25. kolovoza 2020.
- Chen J., Liu Y., Tseng Y., Ma C. (2020) Better influenza vaccines: an industry perspective. *Journal of Biomedical Science*, 27(33).
- Christensen D. (2016) Vaccine adjuvants: Why and how. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(10) 2709–2711.
- D'Aoust M.A., Lavoie P.O., Couture M.M.J i sur. (2009) Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnology Journal*, 6(9) 930–940.
- Del Campo, J., Pizzorno, A., Djebali, S., Bouley, J., Haller, M., Pérez-Vargas i sur. (2019). OVX836 a recombinant nucleoprotein vaccine inducing cellular responses and protective efficacy against multiple influenza A subtypes. *NPJ Vaccines*, 4(1) 1-14.
- Dimmock N.J., Easton A.J. i Leppard K.N. (ed) (2016) *Introduction to Modern Virology*, 7. izd., John Wiley & Sons, Blackwell Publishing, Chichester, UK.
- Doroshenko A. i Halperin S. A. (2009) Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Review of Vaccines*, 6(8) 679–688.
- Fukuyama H., Shinnakasu R., Kurosaki T. (2020). Influenza vaccination strategies targeting the hemagglutinin stem region. *Immunological Reviews*, 296(1) 132-141.
- Gallo-Ramírez L., Nikolay A., Genzel Y., Reichl U. (2015) Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production. *Expert Rev Vaccines*, 14(9) 1181-1195.
- Genzel Y., Reichl U. (2009) Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 8(12) 1681-1692.
- Gränicher G., Coronel J., Pralow A., Marichal-Gallardo P., Wolff, M., Rapp, E. i sur. (2019) Efficient influenza A virus production in high cell density using the novel porcine suspension cell line PBG. PK2. 1. *Vaccine* 37(47) 7019-7028.
- Harding A. T., Heaton N. S. (2018). Efforts to Improve the Seasonal Influenza Vaccine. *Vaccines*, 6(2) 19.
- Jang Y. H. i Seong B. L. (2019) The quest for a truly universal influenza vaccine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 344.
- Jayme D. (2007) Development and Optimization of Serum-free and Protein-free Media. U: Stacey G. i Davis J. (ed): *Medicines from Animal Cell Culture*, str. 29-40. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Jazayeri S. D., Poh C. L. (2019) Development of Universal Influenza Vaccines Targeting Conserved Viral Proteins. *Vaccines*, 7(4) 169.
- Jiskoot W., Kersten G. F., Mastrobattista E., Slütter B. (2019) Vaccines. U: Crommelin D.J.A., Sindelar R.D., Meibohm B., (ed) *Pharmaceutical Biotechnology*, str. 281- 304. Springer, Cham, Švicarska.
- Jung H. E., Lee H. K. (2020). Host Protective Immune Responses against Influenza A Virus Infection. *Viruses*, 12(5) 504.
- Krammer F. (2016) Novel universal influenza virus vaccine approaches. *Current Opinion in Virology*, 17 95-103.
- Kumar A., Meldgaard T. S. i Bertholet S. (2018) Novel Platforms for the Development of a Universal Influenza Vaccine. *Frontiers in Immunology*, 9 600.
- Kwong P.D. i sur. (2010) Structural Biology and the Design of Effective Vaccines for HIV-1 and Other Viruses. U: Georgiev V. (ed): *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Infectious Disease. Humana Press, Totowa, New Jersey, SAD*.
- Li X., van Oers M. M., Vlak J. M., Braakman I. (2015) Folding of influenza virus hemagglutinin in insect cells is fast and efficient. *Journal of Biotechnology*, 203 77-83.
- Madhav N., Oppenheim B., Gallivan M., Mulembakani P, Rubin E., Wolfe N. (2017) Pandemics: Risks, Impacts, and Mitigation. U: Jamison D.T, Gelband H, Horton S. (ed): *Improving Health and Reducing Poverty*, 3. izd., The International Bank for Reconstruction and Development, The World Bank.
- Madsen A., Cox R. J. (2020) Prospects and challenges in the development of universal influenza vaccines. *Vaccines*, 8(3) 361.
- Maletic Neuzil, K., Ortiz, J. R. (2016) Influenza Vaccines and Vaccination Strategies. U: Bloom B. i Lambert P. (ed): *The Vaccine Book*, str. 420-440. 2. izd. Academic Press, Elsevier, London, UK.
- Milián E., Kamen A. A. (2015) Current and Emerging Cell Culture Manufacturing Technologies for Influenza Vaccines. *BioMed Research International*.
- Mirasol F. (2019) Modernizing Flu Vaccine Manufacturing. *BioPharm International*, 32(11).
- Monto A. S. i Fukuda K. (2020) Lessons from influenza pandemics of the last 100 years. *Clinical Infectious Diseases*, 70(5) 951-957.
- Montomoli E, Khadang B, Piccirella S, Trombetta C, Mennitto E, Manini I, Stanzani V, Lapini G. (2012) Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. *Expert Rev Vaccines*, 11(5) 587-94.
- Nachbagauer R., Palese P. (2020) Is a universal influenza virus vaccine possible? *Annual Review of Medicine*, 71 315-327.
- Paget J., Spreuwenberg P., Charu V., Taylor R. J., Iuliano A. D., Bresee J., Simonsen L., Viboud C., Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network, GLaMOR Collaborating Teams (2019) Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates

- and predictors from the GLaMOR Project. *Journal of Global Health* 9(2) 020421.
- Pelliccia M., Andreozzi P., Paulose J., D'Alicarnasso M., Cagno V., Donalisio M., i sur. (2016) Additives for vaccine storage to improve thermal stability of adenoviruses from hours to months. *Nature Communications*, 7(1) 1-7.
- Pérez Rubio A., Eiros J.M. (2018) Cell culture-derived flu vaccine: Present and future. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 14(8) 1874-1882.
- Phillipson J. E., Babecoff R., Ben-Yedidia, T. (2019) Is a universal influenza vaccine feasible? *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy* 7.
- Pica N., Palese P. (2013) Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Prospects and Challenges. *Annual Review of Medicine*, 64 189-202.
- Priddy T.S., Middaugh C.R. (2015) Stabilization and Formulation of Vaccines. U: Wen E. P., Ellis R. i Pujar N.S. (ed): *Vaccine Development and Manufacturing*, str. 237-260., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, SAD.
- Pujar, N. S., Sagar, S. L., Lee, A. L. (2015) History of Vaccine Process Development. U: Wen E. P., Ellis R. i Pujar N.S. (ed): *Vaccine Development and Manufacturing*, str. 15-38. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, SAD.
- Rajaram S., Boikos C., Gelone D.K., Gandhi A. (2020) Influenza vaccines: the potential benefits of cell-culture isolation and manufacturing. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 8 1-10.
- Robinson J.M. (2016) Vaccine Production: Main Steps and Considerations. U: Bloom B. i Lambert P. (ed): *The Vaccine Book*, str. 78-96. 2. izd. Academic Press, Elsevier, London, UK.
- Rodrigues A. F., Soares H.R., Guerreiro M.R., Alves P.M., Coroadinha A.S. (2015) Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology. *Biotechnology Journal*, 10 1329-1344.
- Romanova J. (2017) Influenza vaccines manufacturing in continuous cell lines: problems and solutions. *MIR J*, 4(1) 1-9.
- Sautto G. A., Kirchenbaum G. A., Ross T. M. (2018) Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virology Journal*, 15(1) 1-12.
- Shahrouf N. (2001) The Role of Neuraminidase Inhibitors in the Treatment and Prevention of Influenza. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 1(2) 89-90.
- Soema P. C., Kompier R., Amorij J. P., Kersten G. F. (2015) Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94 251-263.
- Vemula S. V., Zhao J., Liu J., Wang X., Biswas S., Hewlett I. (2016) Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses* 8(4) 96.
- Wei C. J., Crank M. C., Shiver J., Graham B. S., Mascola J. R., Nabel G. J. (2020) Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1 14.
- Wen E.P., Ellis R., Pujar N.S. (ed) (2015) Preface. U: *Vaccine Development and Manufacturing*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, SAD.
- Wille M., Holmes E. C. (2020) The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10 (7).
- Wong S. S., Webby R. J. (2013) Traditional and new influenza vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (3) 476-492.
- Woolhouse M. E., Gowtage-Sequeria S. (2005) Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (12) 1842-1847.
- World Health Organisation (n.d.) Components of a Vaccine. Vaccine safety basics, e-learning course. Dostupno na: <https://vaccine-safety-training.org/vaccine-components.html>. Pristupljeno 25. kolovoza 2020.
- World Health Organization (2019) Global influenza strategy 2019-2030. World Health Organization. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311184>. Pristupljeno 5. studenog 2020.
- Ziegler T., Mamahit A., Cox N. J. (2018) 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 12 (5) 558-565.