

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ena Buljubašić
7547/BT

**Proizvodnja cjepiva protiv gripe
tehnologijom životinjskih stanica**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Proizvodnja cjepiva protiv gripe tehnologijom životinjskih stanica

Ena Buljubašić, 0058212598

Sažetak: Gripa (ili influenza) je virusna, infektivna i respiratorna bolest koja godišnje zarazi do milijardu ljudi diljem svijeta. Pojavljuje se svake godine kao sezonska bolest, 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. Znanstveni napredak u razumijevanju stanične biologije te unaprjeđenje proizvodnih postupaka pomoću životinjskih stanica omogućilo je procesnim biotehnolozima prijelaz s konvencionalnih na nove, produktivnije i brže proizvodne postupke. U radu će se razmotriti epidemiologija gripe, struktura virusa gripe te proizvodnja virusnih cjepiva i cjepiva protiv gripe. Cilj rada je prikazati trenutačne trendove i potrebe u proizvodnji cjepiva protiv gripe, s osobitim naglaskom na proizvodnju u staničnim kulturama.

Ključne riječi: virusna cjepiva, gripa, stanična kultura

Rad sadrži: 37 stranica, 7 slika, 2 tablice, 77 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

Datum obrane: 15. rujan 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

Animal cell technology in influenza vaccine production

Ena Buljubašić, 0058212598

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 disease, 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 thesis, the epidemiology of influenza, influenza virus structure and the viral vaccine manufacturing is described. The main goal here is to introduce current trends and challenges in influenza vaccine production, as well as to emphasize the importance of animal cell technology in this process.

Keywords: viral vaccines, influenza, cell cultures

Thesis contains: 37 pages, 7 figures, 2 tables, 77 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Igor Slivac, PhD, associate professor

Defence date: September 15th 2020

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Gripa	2
3. Virus gripe	5
3.1. Građa virusa i antigena karakterizacija.....	6
4. Virusna cjepiva i cijepljenje	10
4.1. Vrste virusnih cjepiva	11
4.2. Sastav virusnih cjepiva	15
4.3. Proizvodnja virusnih cjepiva	16
5. Proizvodnja cjepiva protiv gripe	21
5.1. Proizvodnja cjepiva pomoću kulture životinjskih stanica	25
5.2. Univerzalno cjepivo protiv gripe.....	27
6. Zaključak	30

1. Uvod

U pisanoj se povijesti prvi put pandemija gripe spominje 1580. godine. U prošleme stoljeću virusi gripe uzrokovali su čak tri pandemije - *španjolsku*, *azijsku* te *hongkonšku gripu*, pri čemu je od *španjolske gripe* oboljelo više od 25% svjetske populacije i umrlo oko 50 milijuna ljudi. Prva i posljednja pandemija gripe u 21. stoljeću dogodila se 2009. godine, uzrokovao ju je A(H1N1) virus, dok je bolest prozvana *svinjskom gripom*. Osim gripa pandemijskih razmjera, svake godine svjedoci smo sezonskim epidemijama od kojih godišnje oboli do milijarda ljudi. Većina ljudi bolest preboli uz lake do srednje simptome, a oboljeti mogu sve dobne skupine. Ipak, pod posebnim oprezom trebaju biti određene rizične skupine kao što su imunokompromitirane osobe, mala djeca i stariji od 60 godina. 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 i javnom zdravstvu 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 SPF kokošnjih jaja (eng. *specific pathogen free*). Osim razvoja novih učinkovitijih tehnologija, mnogi istraživači u potrazi su za univerzalnim cjepivom protiv gripe koje bi omogućilo zaštitu protiv svih podtipova virusa gripe.

U ovom radu, nakon opisa same bolesti, njenog uzročnika te najvažnije preventivne metode, dat je osvrt na konvencionalne metode proizvodnje i trendove u biotehnološkoj proizvodnji cjepiva protiv gripe, počevši od odabira imunogene čestice pa do njenog pakiranja u formulirano cjepivo. Pritom je naročito istaknuta primjena kulture životinjskih stanica, kao ključnog alata u proizvodnji navedenog cjepiva.

2. Gripa

Kao jedna od najčešćih zaraznih bolesti sezonskog karaktera s vrhuncem u zimskim mjesecima, gripa (ili influenza) akutna je respiratorna bolest koju uzrokuju virusi gripe, a prenosi se kapljičnim putem, izravno i neizravno. Uglavnom bivaju zahvaćeni nos, grlo te pluća, a prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) najčešći su simptomi vrućica, suhi kašalj, glavobolja, bol u mišićima i zglobovima, umjerena slabost, bolno grlo i hunjavica. Bolest se pojavljuje u blažim do teškim oblicima, mogući su i asimptomatski slučajevi, dok u pojedinaca može rezultirati smrću. U slučaju blažeg do srednjeg oblika bolesti uglavnom nije potrebna medicinska pomoć, dok oporavak traje oko tjedan dana. Dodatne komplikacije u oboljelih od gripe mogu se javiti u obliku pneumonije, miokarditisa, sepse, dok kronični bolesnici mogu pretrpiti pogoršanje medicinskog stanja. Pod najvećim su rizikom od dodatnih komplikacija ljudi stariji od 65 godina, kronični bolesnici, imunokompromitirani, trudnice i djeca mlađa od pet, a osobito dvije godine (Centres for Disease Control and Prevention, 2019a).

U slučaju zaraze preporuka za oboljele koji ne pripadaju rizičnim skupinama jest da ostanu kod kuće kako bi smanjili rizik od infekcije drugih te da se liječe simptomatski, što može podrazumijevati primjenu, primjerice, lijekova za sniženje temperature te proizvode za sprječavanje grlobolje, hunjavice i glavobolje. Oboljele od gripe koji se pak ubrajaju u visoko rizične skupine liječi se antiviralnim lijekovima uz simptomatsko liječenje (World Health Organisation, 2018a). Europski centar za prevenciju bolesti i kontrolu (ECDC), agencija Europske unije zadužena za nadzor infektivnih bolesti, zajedno sa Svjetskom zdravstvenom organizacijom preporučuju oseltamivir i zanamivir kao antivirusne lijekove za liječenje gripe (sezonske, pandemijske i zoonotičke). Oseltamivir i zanamivir inhibitori su neuraminidaze (NA), enzima ključnog za širenje virusa u nove stanice pa stoga njegova inhibicija sprječava virusnu infekciju (Shahrour, 2001). Antivirusni lijekovi u liječenju gripe primjenjuju se samo u slučaju kada pacijent ima kliničke simptome kompatibilne s gripom za koju su potvrdile javne zdravstvene ustanove da kruži u određenoj populaciji ili ako se specifičnim dijagnostičkim testom potvrdi zaraza (Allen i sur., 2006). U slučaju potrebe za primjenom antivirusnog lijeka, ključno je da se daju čim se pojave specifični simptomi i da od njihove pojave nije prošlo više od 48 sati.

Dijagnosticiranje gripe uobičajeno se provodi na temelju simptoma, dok se dijagnoza potvrđuje medicinsko-laboratorijskim dijagnostičkim testovima. Testiranje na virus gripe posebno se preporučuje pacijentima koji su primljeni na liječenje u bolnicu, dok isto nije nužno u blažim slučajevima, posebice u razdobljima cirkulacije virusa gripe u lokalnim zajednicama. Medicinsko-laboratorijski dijagnostički testovi također omogućuju razlikovanje gripe od drugih viralnih i bakterijskih respiratornih bolesti sličnih simptoma, tj. *influenza-like illnesses*, među

kojima je i infekcija COVID-19 uzrokovana aktualnim virusom SARS-CoV-2 čija se pojava u provinciji Hubei u Kini vremenski podudarala s vrhuncem sezonske gripe (Kong i sur., 2020). 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. Svaku metodu mora biti odobriti Američka agencije za hranu i lijekove (FDA). U mnogim laboratorijima diljem svijeta kao jedna od najčešće upotrebljivanih tehnika provodi se RT-PCR, odnosno lančana reakcija polimerazom, koristeći se reverznom polimerazom u tri koraka – ekstrakcija viralne RNA, reverzna transkripcija i amplifikacija te detekcija fluorescentno označenih PCR produkata (Vemula i sur., 2016). Osim u svrhu zdravstvene zaštite, ispravno provedena dijagnostika neophodna je kako bi na vrijeme detektirali nove vrste i podtipove virusa gripe koji kruži u određenoj populaciji čime doprinosimo razvoju cjepiva za nadolazeću sezonu.

Kao najučinkovitija mjera prevencije i zaštite provodi se cijepljenje protiv gripe. Prema američkom Centru za kontrolu bolesti i prevenciju (CDC) cijepljenje smanjuje broj oboljelih od gripe i smanjuje rizik od ozbiljnih komplikacija koje mogu rezultirati hospitalizacijom i smrću. WHO posebno preporučuje cijepljenje trudnica, djece starosti između 6 mjeseci i 5 godina, starijih od 65 godina, kroničnih bolesnika i zdravstvenih radnika. Sastav cjepiva protiv sezonske gripe promjenjiv je, a regulira ga WHO čije sastavnice kontinuirano prate cirkulaciju virusa u svijetu na temelju čega dva puta godišnje izdaju preporuke za proizvodnju cjepiva za nadolazeću sezonu. Osim cijepljenja, prevencija ovisi i o ponašanju pojedinca, pa se tako zaraza i širenje virusa gripe može smanjiti pravilnim i redovnim održavanjem higijene, primjenom samoizolacije u slučaju simptoma i izbjegavanja bliskih kontakata s oboljelima.

Gripa se kroz ljudsku povijest pojavljivala kao pandemijska, zoonotička i redovno se pojavljuje kao sezonska gripa. Životinjska gripa koja prijeđe na čovjeka naziva se zoonotička. Primjer su pandemijska svinjska gripa, odnosno gripa koju uzrokuje virus tipa A podtipa H1N1 iz 2009. godine ili ptičja gripa uzrokovana virusom A(H5N1) koja se pojavila 1997. te rezultirala milijunima infekcija na peradi i nekoliko stotina slučajeva zaraze u ljudi (World Health Organisation, 2018b). I sezonske i zoonotičke gripe mogu postati pandemijske, a u prosjeku se pojavljuju jednom u 25 – 30 godina. Ipak, najviše novih pandemija, i gripe i drugih bolesti, zoonotičkog su podrijetla i posljedica transmisije patogena sa životinje na čovjeka (Madhav i sur., 2017 prema Murphy, 1998; Woolhouse i Gowtage-Sequeira, 2005).

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 2017. godine govore da

sezonska gripa godišnje zarazi oko milijardu ljudi, usmrti do 650 000 ljudi diljem svijeta, od kojih je do 72 000 samo u Europi. Otprilike 5 – 15% ukupne svjetske populacije zarazi se gripom tijekom jedne sezone (WHO Regional Office for Europe, n.d.). 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).

U medicinskom časopisu *Lancet* 2019. godine objavljena je analiza priznata od strane WHO provedena na temelju podataka 33 države koje čine 57% svjetske populacije u razdoblju od 1999. do 2015. godine, *Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study*. Analiza tako navodi da je stopa smrtnosti od gripe i respiratornih bolesti povezanih s gripom najveća u ljudi starijih od 75 godina, što korelira s podacima američkog CDC-a prema kojima oko 90% umrlih od gripe u SAD-u čine stariji od 65 godina (Centres for Disease Control and Prevention, 2019b). Također, prema spomenutoj analizi od ukupnog broja umrlih 42% su mlađi od 65 godina, dok CDC-evi podaci za SAD navode kako su 37% ukupno hospitaliziranih mlađi od 65 godina. Jedan od zaključaka bio je i da je veći udio umrlih u državama nižih i srednje nižih prihoda. Druga pak analiza, također iz 2019. godine, *Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project*, obradila je podatke 31 države članice WHO iz razdoblja 2002. do 2011., izuzevši pandemiju iz 2009., pri čemu su krajnji zaključci o smrtnosti u različitim dobnim skupinama bili slični prethodnoj spomenutoj analizi te je iznijela prosječnu stopu smrtnosti od gripe koja iznosi 5.9 na 100 000 ljudi. Statistički podaci stoga variraju ovisno o proučavanom geografskom području, razdoblju godine, tipu, podtipu i soju virusa gripe, ekonomskoj situaciji te starosti proučavane populacije.

3. Virus gripe

Povijest otkrića virusa gripe i put koji su znanstvenici prošli do njega saželi su Taubenberger i suradnici 2008. i Oldstone 2019. godine u svojim radovima. Prema njima godina 1892. važna je za sam začetak virologije – Dmitrii Ivanovski dokazao je da uzročnik mozaične bolesti duhana infektivni, nevidljivi agens koji prolazi kroz filter nepropustan za bakterije. Iste godine Richard Pfeiffer sa svojim timom otkriva novu bakteriju, *Bacillus influenzae*, danas poznatu kao *Haemophilus influenzae*. Za nju su tvrdili da je uzročnik pandemije gripe koja se dogodila 1892. godine zato što je tada izolirana iz kliničkih uzoraka uzetih od teže oboljelih pacijenata. Ta je teorija dominirala i u razdoblju *španjolske gripe*, no tek se poslije otkrilo da *B. influenzae* nije bila uzročnik same gripe, već sekundarnih bakterijskih pneumonijskih infekcija u ljudi oboljelih od gripe. Nakon što je 1933. godine otkriven i izoliran humani virus gripe tipa A, započet je razvoj prvih cjepiva i imunih seruma. Kratak vremenski pregled ključnih događaja za razumijevanje virusa gripe i razvoj cjepiva protiv gripe prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Pregled ključnih događaja u razvoju cjepiva protiv gripe (Oldstone, 2019.; <https://www.who.int/influenza/gip-anniversary/en/>; <https://www.historyofvaccines.org/>)

Godina	Zaslужni	Događaj
1933.	W. Smith, C. Andrewes, P. Laidlaw	Izolacija humanog virusa gripe (tip A)
1940.	T. Francis	Izolacija virusa gripe tipa B
1941.	G. Hirst	Otkriće hemaglutinina
1945.	T. Francis, J. Salk, G. Hirst, F. Davenport, E. Kilbourne i dr.	Razvoj inaktiviranog cjepiva protiv gripe i njegova prva primjena
1967.	H.G. Pereira	Prijedlog povezanosti humanog virusa gripe i virusa ptičjeg podrijetla
1981.	J. Skehel, D. Wiley, I. Wilson i dr.	Otkriće strukture i funkcije hemaglutinina
2003.	tvrtka MedImmune	Razvijeno živo oslabljelo cjepivo protiv gripe i odobreno od FDA
2012.	tvrtka Novartis	Prvo odobreno virusno cjepivo protiv gripe proizvedeno kulturom stanica (<i>Flucelvax</i>)

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 (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 (World Health Organisation, 2019). Divlje morske ptice poput patki i galebova smatraju se primarnim domaćinima virusa gripe tipa A (Dimmock i sur., 2016; Wille i Holmes, 2020). Povremeno se dogodi prijelaz virusa gripe s divljih ptica na perad, što može rezultirati zarazom čovjeka, a u konačnici i epidemijama odnosno pandemijama gripe (Wille i Holmes, 2020).

3.1. Građa virusa i antigena karakterizacija

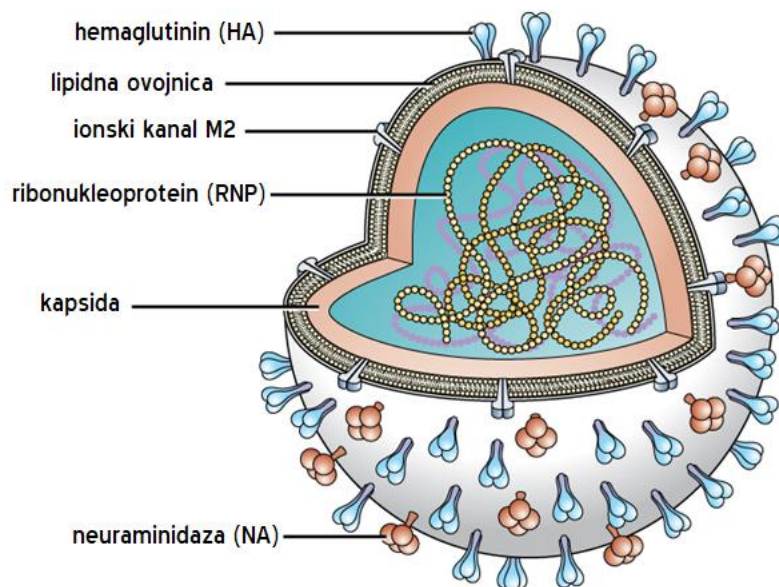
Virusi gripe su jednolančani, negativno uvijeni RNA virusi iz porodice *Orthomyxoviridae*. Već spomenuta tri tipa virusa gripe – A, B i C, međusobno se razlikuju, osim po domaćinima i virulentnosti, i po broju segmenata RNA te razlici u građi proteina koji čine vanjski omotač i matriks. Tako virusi tipa 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, 2011; James i Whitley, 2017; 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 i dva NA podtipa najčešće uzrokuju epidemije. Riječ je o podtipovima H1, H2 i H3 te N1 i N2 (Bouvier i Palese, 2011). Vrste tj. linije (eng. *lineages*) virusa tipa B jesu B/Yamagata i B/Victoria.

Standardna nomenklatura virusa gripe sastoji se od vrste organizma iz kojeg je virus izoliran (u slučaju da nije humanog podrijetla), lokacije na kojoj je virus izoliran, godine izolacije te HA i NA podtipa u slučaju da je riječ o virusu gripe tipa A (Bouvier i Palese, 2011). Tako bi oznaka za humani virus tipa A izoliranog u Kaliforniji pod brojem 7 2009. godine i podtipa H1N1 bila A/Kalifornija/7/2009 (H1N1).

Površina virusa gripe tipa A, tj. njegov vanjski omotač, prekriven je šiljastim 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 njezino napuštanje. 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 nestrukturna proteina NS1 i NS2. 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 (RNP) kompleks koji se sastoji od segmenata RNA, nukleoproteina NP i RNA polimeraze (James i Whitley, 2017; Kawaoka i Neumann, 2014). Prikaz opisane strukture virusa gripe vidljiv je na slici 1.

Građa virusa gripe tipa B slična je građi 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, 2011).

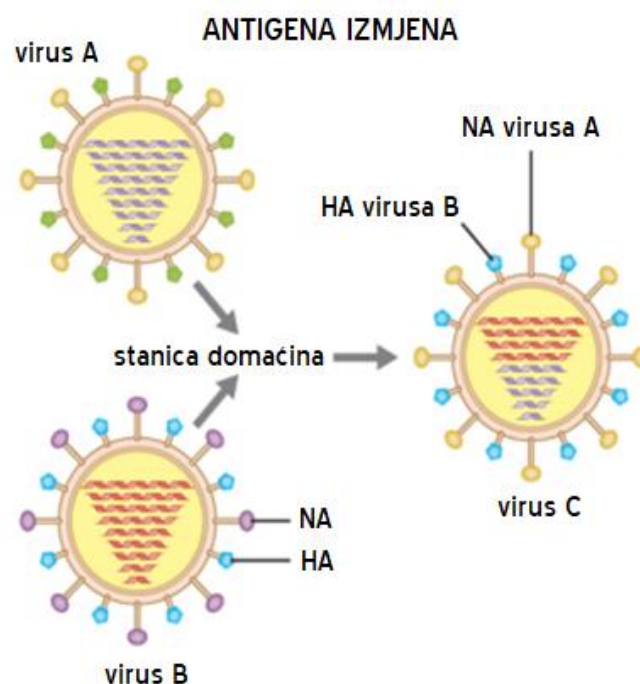


Slika 1. Struktura virusa gripe.
(prilagođeno prema <https://chromoscience.com/2020/05/04/the-influenza/>)

Karakteristična virusna genomska struktura, posebice njezina segmentiranost, omogućuje antigeno skretanje (eng. *antigenic drift*) i antigenu izmjenu (eng. *antigenic shift*). Antigene promjene i mutacije u genima za glikoproteine HA i NA omogućuju evoluciju i nastanak novih sojeva virusa. Takvi virusni sojevi kojima su promijenjene antigene karakteristike mogu zaraziti domaćina čak i ako je domaćin već prethodno prebolio gripu i stekao imunitet, tj. posjeduje protutijela koji bi u slučaju ponovnog kontakta s određenim virusom gripe izazvali imunološki odgovor organizma. Stoga takav imunitet stečen nakon zaraze određenim sojem virusa gripe s vremenom postaje neučinkovit u obrani organizma od drugih sojeva virusa gripe (Dimmock

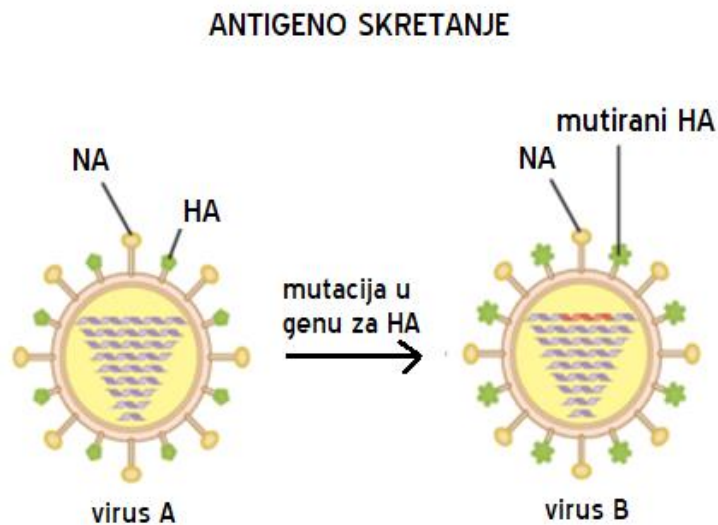
i sur., 2016; Neuzil i Oritz, 2016). Zbog toga postoji konstantna potreba za razvojem novih i unaprjeđenjem postojećih cjepiva, a još je veća potreba za razvojem univerzalnog cjepiva protiv gripe.

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 (eng. *reassortment*), 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 (Kawaoka i Neumann, 2014), a vijabilni virus novog podtipa 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, posljedično se može dogoditi pandemija (Milián i Kamen, 2015). Na temelju genomske rekonstrukcije virusa A(H1N1) koji je uzrokovao tzv. španjolsku gripu 1918. pretpostavlja se da je upravo antigena izmjena bila odgovorna za jedinstvenu genomsku strukturu virusa koji se pamti kao jedan od najsmrtonosnijih u povijesti čovječanstva (Bouvier i Palese, 2011). Mehanizam antigene izmjene prikazan je na slici 2.



Slika 2. Mehanizam preraspodjele virusnih RNA segmenata (antigena izmjena) koji se događa u stanici domaćina prilikom dvostruke infekcije. Sklapanjem novih virusnih čestica prilikom takve dvostruke infekcije nastaju novi podtipovi virusa gripe. Na slici je prikazana dvostruka infekcija virusima A i B pri čemu nastaje izmjenjeni virus C (prilagođeno prema Parker i sur., 2016).

U slučaju antigenog skretanja radi se o ishodu fiksiranih mutacija, primjerice točkastih, u genima za površinske glikoproteine HA i NA koje dovode do antigenih promjena. Takve mutacije mogu rezultirati promjenom aminokiselinskog sastava, pri čemu je dovoljna promjena samo nekoliko ključnih aminokiselina od kojih je građen hemaglutinin da bi se stvorila nova antigena varijanta (Ziegler i sur., 2018). Primjer antigenog skretanja prikazan je na slici 3. Antigeno skretanje i antigena izmjena u konačnici omogućuju prirodnu selekciju virusa samo onih antigenih varijanti koje su u mogućnosti adaptirati se te izbjeći imunosni odgovor domaćina i uzrokovati infekciju (Wille i Holmes, 2020).



Slika 3. Mehanizam antigenog skretanja. Fiksiranom mutacijom u genu za glikoprotein HA u virusu A nastaje novi soj virusa (na slici virus B) s mutiranim HA (prilagođeno prema Parker i sur., 2016).

4. Virusna cjepiva i cijepljenje

Cijepljenje se ubraja među najučinkovitije medicinske metode u sprječavanju bolesti i smrtnih ishoda uzrokovanih virusnim infekcijama. Smatra se da je cijepljenje spasilo više života od bilo koje druge medicinske metode u posljednjih 50 godina te se nalazi među temeljnim razlozima za svjetsku demografsku tranziciju koja podrazumijeva produljenje prosječnog životnog vijeka čovjeka, povećan udio starijih u društvu, urbanizaciju, napuštanje sela i razvoj megagradova te smanjenje broja djece koja su umirala do 6. godine (Bloom i Lambert, 2016). Zahvaljujući cijepljenju, u potpunosti je istrijebljena bolest malih boginja, dok su neke druge, poput dječje paralize, na pragu istrijebljenja. Ipak, mnoge virusne bolesti i dalje su prisutne i predstavljaju problem za javno zdravstvo, uzrokuju teška oboljenja i smrt, pa i ekonomske gubitke diljem svijeta. Većina proizvedenih cjepiva namijenjena je djeci u sklopu programa obaveznog cijepljenja, a mnoge su bolesti za čiju se prevenciju proizvode cjepiva namijenjena i odraslima, posebice rizičnim skupinama, među kojima je gripa.

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). Antiviralna cjepiva razvijena su na način da u organizmu potaknu 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. Na taj način osigurana je trajna zaštita, tj. adaptivni imunitet, bez da je osoba preboljela bolest. Kako bi to postigli, razvijene su te se i dalje razvijaju različite vrste antiviralnih cjepiva koje se međusobno razlikuju po sastavu samog cjepiva o čemu će ovisiti i konačna imunogenost, podnošljivost i učinkovitost cjepiva. S obzirom na to da imunološki sustav organizma reagira na antigene u cjepivu, nije nužno da njime u organizam unesemo cijelu virusnu česticu, već su za simulaciju imunološkog sustava putem cjepiva dovoljne samo molekule s antigenim karakteristikama. Vrste virusnih cjepiva detaljnije će biti opisane u poglavlju 4.1.

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). Stoga imunizacija svakog pojedinca uglavnom nije potrebna da bi se virus iz određene populacije eliminirao (Dimmock i sur., 2016).

Unatoč brojnim pozitivnim stranama cijepljenja, postoje i određene nuspojave. Nuspojave mogu biti lokalne i sistemske, pri čemu su lokalne one najčešće i pojavljuju se po nekoliko sati nakon injekcije cjepiva (Centres for Disease Control and Prevention, 2019b). Lokalne su nuspojave bol, otečenost i crvenilo na mjestu cijepljenja, a posljedica su nealergijskih

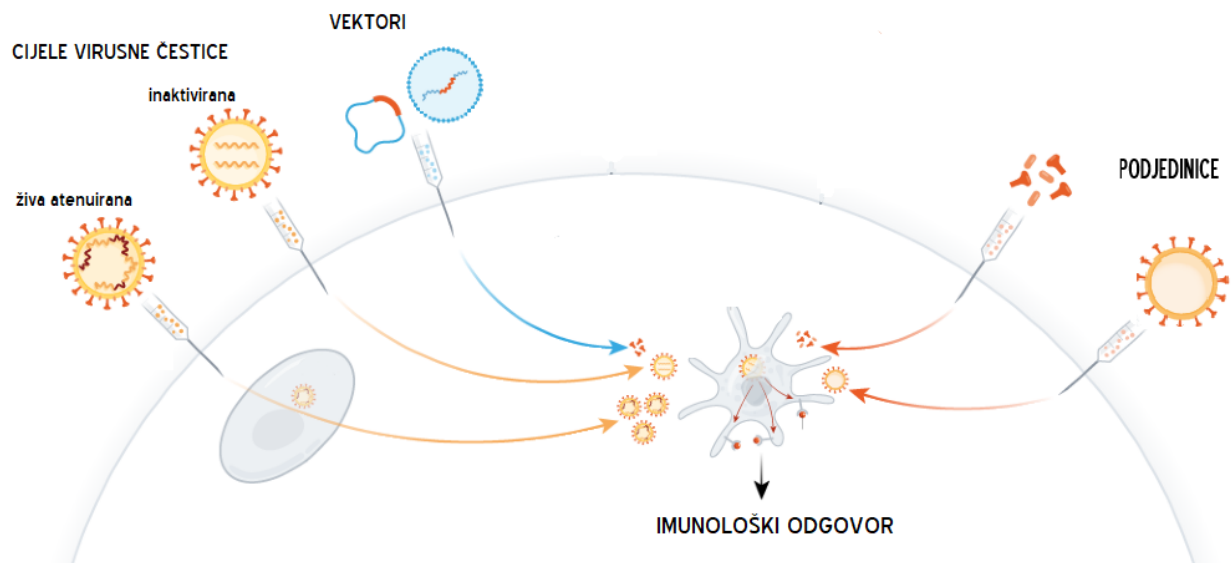
imunoloških zbivanja. Neželjene reakcije preosjetljivosti posredovane imunološkim mehanizmom, tj. alergijske reakcije mogu dovesti do anafilaksije, a mogu biti reakcija na antigen, ostatke medija u kojima je proizveden antigen, stabilizator, konzervans i dr. (Ivković-Jureković i sur., 2019). Postoje i određene kontraindikacije, kao što je alergija na određeni sastojak cjepiva, koje mogu biti specifične s obzirom na vrstu virusa protiv kojeg se cjepe te stanja organizma u kojima treba biti oprezan, a u takvim slučajevima potreban je temeljit pregled pojedinog pacijenta.

4.1. Vrste virusnih cjepiva

Najosnovnija podjela virusnih cjepiva jest na živa i neživa. Za razliku od živih cjepiva koja sadrže cijelu virusnu česticu, neživa cjepiva, iako mogu sadržavati cijelu virusnu česticu koja je inaktivirana, sadrže manje dijelove virusa odnosno njegove podjedinice (Oxford Vaccine Group, 2019a).

Slikoviti prikaz vrsta virusnih cjepiva vidljiv je na slici 4., a ona se s obzirom na izvor antigena mogu podijeliti na:

- živa oslabljena (atenuirana)
- inaktivirana
- podjedinična
- cjepiva na osnovi nukleinskih kiselina.



Slika 4. Vrste virusnih cjepiva i način prezentacije antigena (prilagođeno prema Callaway, 2020).

Prva ikad upotrebljena i proizvedena cjepiva bila su živa viralna cjepiva koja su u sebi sadržavala oslabljenog (atenuiranog) uzročnika bolesti. Takva su bila cjepiva začetnika cijepjenja Edwarda Jennera protiv malih boginja i Pasteurovo cjepivo protiv bjesnoće. Virus koji se nalazi unutar živih cjepiva, odnosno živih oslabljenih cjepiva, unatoč oslabljenosti ima mogućnost replikacije u domaćinu, pa posljedično inducira imunski odgovor u organizmu (Ellebedy i Ahmed, 2015) osiguravajući dovoljnu količinu antigena, zbog čega se upotrebljavaju manje količine cjepiva (Jiskoot i sur., 2019). Imunski 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 imunološki aspekti potrebni za dugotrajan i efektivan adaptivni imunitet (Dimmock i sur., 2016). Stupanj atenuacije i genetička stabilnost izrazito su važni s obzirom na to da postoji mogućnost od reverzije u virulentan oblik (Dimmock i sur., 2016; Rodrigues i sur., 2015), iako je takav događaj rijedak jer oslabljeni sojevi uglavnom sadrže više mutacija (Jiskoot i sur., 2019). Stoga, zbog takvog rizika, slabije podnošljivosti i izrazite imunogenosti živih oslabljenih cjepiva, taj oblik cjepiva ne preporučuje se za cijepjenje imunokompromitiranih i djece slabijeg imuniteta. Virus koji se nalazi u cjepivu mora biti oslabljen do te granice da primjena cjepiva nema značajnih kliničkih nuspojava te stimulira efektivan i dugotrajan imunitet (Dimmock i sur., 2016), što se postiže selekcijom mutantnih sojeva koji pokazuju smanjenu virulenciju. Takvi mutantni sojevi dobivaju se, primjerice, uzgojem virusa u nekoliko generacija u domaćinu u kojem se inače slabije umnaža kako bi smanjio sposobnost replikacije u humanim stanicama.

Inaktivirana cjepiva sadrže kemijskim ili fizikalnim postupcima uništenu virusnu česticu. Za kemijsku inaktivaciju upotrebljavaju se formaldehid, glutaraldehid, β -propiolakton, a za fizikalnu toplina ili iradijacija (Jiskoot i sur., 2019; Rodrigues i sur., 2015). Sam proces inaktivacije ovisi o virusu te se sredstvo odnosno postupak inaktivacije određuje empirijski nastojeći dobiti nevirulentnu virusnu česticu koja će biti dovoljno imunogena. S obzirom na to da je virusna čestica inaktivirana i nema mogućnost replikacije, smanjena joj je imunogenost što je najveći nedostatak u usporedbi s živim oslabljenim cjepivima, pa se stoga cijepjenje s inaktiviranim cjepivima često primjenjuje u nekoliko doza i uz primjenu adjuvansa. Prednost inaktiviranih cjepiva nad živim oslabljenim cjepivima jest to što su stabilnija te se mogu transportirati pri normalnim temperaturama za razliku od živih oslabljenih čiji transport i čuvanje zahtijevaju primjenu hladnog lanca, što u određenim dijelovima svijeta često predstavlja problem. Kod inaktiviranih cjepiva ne postoji mogućnost od kontaminacije mikroorganizmima jer će se procesom inaktivacije virusa uništiti i prisutni kontaminanti (Dimmock i sur., 2016).

Klasična ili rekombinantna podjedinčna cjepiva sadrže specifičnu virusnu komponentu, tj. fragment koji ima antigene karakteristike. Takva komponenta proteinske je strukture, a ključno je da sadrži epitope koji će u organizmu izazvati dovoljno snažan imunološki odgovor bez izazivanja infekcije. Samo cjepivo ne sadrži genetički materijal virusa. Kao i inaktivirana, podjedinčna cjepiva zahtijevaju dodatak adjuvansa u svrhu povećanja imunogenosti i primjenu više doza te su sigurnija od živih oslabljenih cjepiva (Rodrigues i sur., 2015). Klasična podjedinčna cjepiva dobivaju se izravnom izolacijom određene virusne komponente iz samog virusa koji razorimo deterdžentom ili dietil-eterom (Kumar i sur., 2015). Takva se cjepiva nazivaju još i fragmentirana (eng. *split*) cjepiva (Gallo–Ramírez i sur., 2015). Metodama genetičkog inženjerstva 80-ih godina prošloga stoljeća dobivena su rekombinantna podjedinčna cjepiva. Ona podrazumijevaju heterolognu ekspresiju virusnih proteina koji imaju antigena svojstva unutar pogodnog ekspresijskog sustava što može biti kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, bakterija *Escherichia coli* ili stanice ovarija kineskog hrčka (*chinese hamster ovary (CHO)*) (Pujar i sur., 2015). Primjer su takvih rekombinantnih cjepiva tzv. virusu slične čestice, odnosno VLP (od eng. *virus-like particles*), čestice strukturno slične virusu jer oponašaju njegovu trodimenzionalnu strukturu, ali su neinfektivne i nemaju mogućnost replikacije zbog manjka genetskog materijala. Razlikujemo VLP bez ovojnice i s ovojnicom (kompleksnije jer sadrže lipidnu membranu) (Rodrigues i sur., 2016).

Peptidna cjepiva vrsta su podjedinčnih cjepiva koja su otišla korak dalje od unošenja samog virusnog antigena u organizam. S obzirom na to da su epitopi regije na antigenu na koja se vežu protutijela ili B-stanice imunološkog sustava, peptidna se cjepiva temelje na aminokiselinskim sekvencama, tj. peptidima koja su ustvari imunogeni epitopi, a u organizam se unose s pomoću nosača ili adjuvansa te izazivaju snažan imunološki odgovor (Jiskoot i sur., 2019).

Cjepiva na bazi nukleinskih kiselina, često spomenuta i kao vektorska cjepiva, u principu su srodna podjedinčnim cjepivima jer cjepivo sadrži genetički materijal čijom ekspresijom nastaje virusna komponenta odgovorna za izazivanje imunogenog odgovora u organizmu, ali upravo genetički materijal u sastavu cijepiva odvaja tu vrstu cjepiva od podjedinčnih. Genetički materijal jest plazmidni vektor, koji može biti DNA ili RNA, u koji je instertiran gen koji kodira za željeni antigen ili više njih. Glavni nedostaci takvih cjepiva jesu slaba imunogenost, pa ona zahtijevaju dodatak adjuvansa, moguća integracija DNA u genom domaćina, nedovoljna istraženost dugoročnih učinaka na organizam te slaba doprema. S pozitivne strane, takva su cjepiva relativno stabilne formulacije prilikom čuvanja i transporta, lako se proizvode u velikom mjerilu te induciraju i humoralni i stanični imunogeni odgovor (Jiskoot i sur., 2019). RNA,

odnosno mRNA, cjepiva imaju velik potencijal za razvoj brzih i učinkovitih cjepiva. Kako navode Pardi i suradnici (2018), mRNA je minimalan genetički vektor – siguran i bez rizika od nastanka infekcije ili insercijske mutageneze. Modifikacije na mRNA dodatno ju stabiliziraju, povećavaju njezinu translativnost, a formulacija uz molekulske nosače omogućuje učinkovitu dopremu mRNA do ribosoma u citosolu i brzu ekspresiju. I za DNA i mRNA cjepiva najveći je izazov postići učinkovitu *in vivo* dopremu do ciljnog mjesta u stanici. Dok za DNA mora proći citoplazmatsku i jezgrinu membranu da bi se u jezgri transkribirala, mRNA je spremna za translaciju pa je njezino ciljno mjesto endoplazmatski retikulum i ribosomi u citosolu. Zbog toga, i zbog nemogućnosti integracije u genom domaćina, mRNA cjepiva imaju veći potencijal za razvoj sigurnog i učinkovitog cjepiva od DNA cjepiva (Zhang i sur., 2019). Zbog prolaska citoplazmatske i jezgrine membrane nužno je da nosači molekula nukleinskih kiselina u cjepivima budu liposomnog karaktera.

Tablica 2. Sažeti prikaz različitih vrsta virusnih cjepiva.

Vrsta cjepiva	Specifičnost	Prednosti	Nedostaci	Primjeri
Živo oslabljeno	Spontano ili ciljano izmjenjeni (mutirani) sojevi virusa	Ne zahtijeva primjenu adjuvansa. Dobra imunogenost. Osigurava jak imunosni odgovor.	Moguća reverzija oslabljenog oblika u infektivni oblik i izazivanje bolesti. Nepogodan za imunokompromitirane. Transport i čuvanje zahtijevaju hladni lanac.	MMR cjepivo (protiv ospica, rubeole i zaušnjaka)
Inaktivirano	Termički ili kemijski uništene virusne čestice	Neinfektivnost. Stabilnost.	Slaba imunogenost. Zahtijeva primjenu adjuvansa. Cijepljenje u više doza.	gripa i dječja paraliza
Podjedinčno	Imunogeni dijelovi virusa	Neinfektivnost. Stabilnost. Pročišćenost. Mala mogućnost od nuspojava. Proizvodnja u kvascima.	Slaba imunogenost. Zahtijeva primjenu adjuvansa. Cijepljenje u više doza. Skuplja proizvodnja.	VLP cjepiva protiv hepatitisa B i humanog papiloma virusa (HPV)
Virusno vektorsko	Pomoćni virus kao nositelj gena imunogena patogenog virusa	Ulazi u stanice domaćina, ali se ne umnožava. Brzo se proizvodi. Prirodni adjuvans.	Poticanje imunosti protiv pomoćnog virusa. Nema odobrenih cjepiva za ljude.	HIV, EBOLA, COVID-19 (sve na kliničkom ispitivanju)
Cjepivo na osnovi nukleinskih kiselina	DNA ili mRNA virusnog antigena ili epitopa	Neinfektivnost. Dobra pročišćenost. Proizvodnja u bakterijama.	Moguća integracija DNA u genom domaćina. Slaba imunogenost. Nestabilnost. Nužna primjena adjuvansa i nosača/vektora. Skuplja proizvodnja.	mRNA cjepivo protiv COVID-19 (kliničko ispitivanje)

Ekspresija antigena može se postići i primjenom viralnih vektora. Princip takve imunizacije jest da rekombinantnim virusom tj. viralnim vektorom, u kojem je kloniran gen za željeni

antigen, zarazimo domaćina. Replikacijom rekombinantnog virusa unutar domaćina eksprimira se željeni antigen koji izaziva imunološki odgovor. Ovakav tip cjepiva u stvari je vrsta živih virusnih cjepiva s obzirom da unosom cjepiva unosimo živu, replicirajuću virusnu česticu. Ipak, živa rekombinantna cjepiva još su u razvoju, a najistraženiji je princip imunizacije pomoću adenovirusa kao virusnog vektora (Milián i Kamen, 2015). Nuspojave ovakvog virusnog vektorskog cjepiva mogu biti nepredvidive, pa je sigurnost ovakvog tipa cjepiva za ljudsku primjenu i dalje pod istraživanjem. Prednost je pak što takva cjepiva ne zahtijevaju primjenu adjuvansa i što takvi viralni vektori imaju potencijal za stvaranje velike količine antigena (Pinschewer, 2017). Bottomley i sur. (2016) napominju kako je većina ljudi već bila u doticaju s adenovirusom i posjeduje neutralizirajuća protutijela pa bi njegova primjena kao viralnog vektora mogla biti ograničena. Sve opisane vrste virusnih cjepiva sažete su u tablici 2.

Svako pojedinačno cjepivo protiv određene bolesti može se primijeniti s nekim drugim cjepivom, pa tako postoje kombinirana te polivalentna cjepiva. Kombinirana cjepiva praksa su već desetljećima jer se na taj način smanjuje broj ukupnih doza cjepiva koje pojedinac mora primiti. Primjer je takozvano „6u1“ DTaP-IPV-HiB-hep B kombinirano cjepivo protiv difterije, tetanusa, pertusisa, dječje paralize, *H. influenzae* tipa B i hepatitisa koji se, prema podacima Zavoda za javno zdravstvo i prema kalendaru cijepljenja u Republici Hrvatskoj, daje u tri doze (djeci s navršena dva mjeseca života, nakon dva mjeseca i u drugoj godini života) (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2019). Polivalentna cjepiva sadrže više sojeva istog antigena, tj. virusa, kao što je kvadrivalentno cjepivo protiv gripe koje štiti protiv podtipova A(H1N1), A(H3N2) i dvije vrste virusa tipa B (Centres for Disease Control and Prevention, 2020).

4.2. Sastav virusnih cjepiva

Kako bi konačno cjepivo bilo stabilno i učinkovito, osim izvora antigena, cjepivo mora sadržavati i tvari poput adjuvansa, konzervansa i stabilizatora. Konačan sastav cjepiva ovisit će ponajprije o kompleksnosti samog antigena, ali i o obliku cjepiva, tj. načinu unošenja cjepiva u organizam. Većina cjepiva unosi se u obliku tekućine intramuskularno ili supkutano (pod kožu) iglom. Drugi način jest unos cjepiva mukoznim tkivom kao što je oralan, intranazalni i intravaginalni unos, no takve su formulacije još u razvoju. Osim tekućih cjepiva, postoje i suhosmrznuti oblici (Jiskoot i sur., 2019).

Adjuvansi su imunostimulirajuće tvari čija je svrha povećati učinkovitost samog cjepiva pojačavajući imunosni odgovor na antigenu komponentu cjepiva (Jiskoot i sur., 2019; Priddy i Middaugh, 2015). Ne primjenjuju se za živa oslabljena cjepiva. Antigen se ili veže na molekulu

adjuvansa ili s njom tvori emulziju (ako je riječ o adjuvansu na bazi ulja) (Dimmock i sur., 2016). Zbog lokalnih reakcija koje izazivaju, mnogi otkriveni adjuvansi nisu dopušteni za ljudsku primjenu, dok su dopušteni koloidne aluminijske soli (hidroksidi, fosfati) te MF59 (ulje skvalena) (Dimmock i sur., 2016) i od novijih monofosforil-lipid A (Jiskoot i sur., 2019).

Konzervansi, poput formaldehida i derivata fenola, dodaju se u cjepiva, najčešće multidozna, kako bi spriječili rast bakterija i gljivica. Prema podacima WHO količina formaldehida u cjepivima nekoliko je stotina puta manja od količine poznate da šteti ljudima (World Health Organisation, n.d.).

Budući da je put od proizvođača do krajnjeg pojedinca koji prima cjepivo dug, nužno je osigurati stabilnu formulaciju koja održava nativnu biološku strukturu antigena i njegovu imunogenost. Nakon što se odredi stabilni oblik antigena, određuju se fizikalni i kemijski uvjeti u kojima će takav i ostati (Priddy i Middaugh, 2015). Stoga se u cjepivu nalaze stabilizirajuće tvari koje održavaju određenu pH-vrijednost, ionsku snagu i redoks-potencijal. Zbog čuvanja cjepiva na niskim temperaturama poželjne su i termostabilne formulacije, odnosno termalni stabilizatori kao što su *anti-freezing* agensi koji sprječavaju agregaciju aluminijskih soli (koje su dodane kao adjuvansi) pri niskim temperaturama (Pelliccia i sur., 2016). Neki su od stabilizirajućih agenasa $MgCl_2$, $MgSO_4$ laktoza-sorbitol i sorbitol-želatina (World Health Organisation, n.d.).

U nekim cjepivima mogu se pronaći antibiotici u tragovima koji su upotrebljavani za sprječavanje bakterijskih kontaminacija te za selekciju transformanata tijekom proizvodnje rekombinantnih cjepiva. Antibiotici koji uglavnom izazivaju alergije, poput penicilina, ne upotrebljavaju se u procesu proizvodnje. U tragovima se mogu pronaći i proteini jajeta (ovalbumin) ako je cjepivo proizvedeno u kokošjim jajima te proteini kvasca u slučaju proizvodnje cjepiva s pomoću kvasaca (Oxford Vaccine Group, 2019b).

4.3. Proizvodnja virusnih cjepiva

Poput svakog biotehnološkog procesa, proizvodnja virusnog cjepiva sastoji se od *upstream* i *downstream* procesa. Proizvodni procesi ovise o vrsti cjepiva, tj. antigena, a glavni cilj jest proizvesti sigurno i učinkovito cjepivo. Tri su glavne faze proizvodnje. Prva faza je uzvodni postupak (eng. *upstream processing*), što uključuje pripremu supstrata za proizvodnju antigena kao i sam tijek proizvodnje istog. Nizvodni postupak ili pročišćavanje (eng. *downstream processing*) druga je faza u biotehnološkoj proizvodnji virusnih cjepiva, a sastoji se od tehnoloških operacija za izdvajanje proizvedenog antigena iz supstrata. Konačan korak

je formulacija proizvoda i testiranje njegove aktivnosti (Jiskoot i sur., 2019; Wen i sur., 2015). Važni parametri ovih postupaka su: tip cjepiva koji se proizvodi, virusni soj, ekspresijski sustav, supstrat za uzgoj (medij), način kultivacije i mjerilo proizvodnje.

Budući da se virusi ne mogu replicirati izvan živog organizma, da bi proizveli njihovu veliku količinu, virus mora inficirati domaćina. Tako je prvo masivno proizvedeno cjepivo bilo cjepivo Edwarda Jennera protiv malih boginja uzgojeno na koži živih životinja, a slijedilo ga je cjepivo protiv zaušnjaka proizvedeno na pripravcima od leđne moždine. Godine 1935. prvi su put znanstvenici iskoristili SPF jaja te proizveli cjepiva protiv žute groznice i gripe. Otkriće staničnih kultura odnosno *in vitro* kultivacije životinjskih stanica omogućilo je učinkovitiju proizvodnju cjepiva ponajprije zbog veće mikrobiološke čistoće i kvalitete. Uslijedio je prvi odobreni proizvod dobiven *in vitro* kultivacijom životinjskih stanica za ljudsku primjenu, i to cjepivo protiv dječje paralize uzgojeno na primarnoj kulturi stanica bubrega majmuna 1954. godine (Griffiths, 2007). Poliovirus koji se nalazi u cjepivu protiv dječje paralize godinama prije odobrenja prvog cjepiva uzgajan je na različitim životinjskim tkivima poput leđne moždine majmuna, moždanog i mišićnog tkiva ljudskog embrija, no svi prijašnji pokušaji nisu davali sigurno i učinkovito cjepivo (History of Vaccines, 2018) Prve takve stanične kulture upotrebljavane u svrhu proizvodnje virusnih cjepiva bile su primarne, zatim su se razvile humane diploidne stanične linije, dok je vrhunac postignut razvojem kontinuiranih (imortaliziranih) staničnih linija (Gallo–Ramírez, 2015; Robinson, 2016). Primarne stanične kulture direktno su prenijete iz živog tkiva u laboratorijske uvjete bez supkultivacije, no bile su nepogodne za uzgoj virusa jer se takve kulture sastoje od različitih tipova stanica. Stoga su za ujednačeniju proizvodnju razvijene stanične linije koje su sadržavale samo jedan tip stanica. Danas upotrebljavane stanične linije uglavnom su humanog/animalnog podrijetla, a u primjeni su i kulture stanica insekata (Gallo–Ramírez i sur., 2015).

Uobičajena metoda proizvodnje cjepiva s pomoću SPF jaja započinje inokulacijom ciljanog virusa u oplodeno jaje staro 10-11 dana, pri čemu upotrebljena vrsta virusa mora imati dobru mogućnost replikacije u tkivu pilećeg embrija. Nakon nekoliko dana inkubacije (48 – 72 h) uz kontroliranu temperaturu i vlažnost zraka slijedi prikupljanje virusa te daljnji procesi pročišćavanja i formulacija cjepiva (Robinson, 2016). Nizvodni postupak u proizvodnji inaktiviranih i fragmentiranih podjedinčnih cjepiva podrazumijeva post-tretman inaktivacije, odnosno razlaganja virusne čestice na podjedinice. Živa oslabljena cjepiva tako imaju zahtjevniji uzvodni postupak (zbog pripreme i selekcije oslabljenog soja), dok je nizvodno procesiranje minimalano te je konačan proizvod nestabilniji i zahtijeva čuvanje u zamrznutom obliku (Robinson, 2016).

Iako se takva proizvodnja *in ovo* upotrebljava i danas, mnogo je njenih nedostataka. Za dobivanje SPF jaja uzgajaju se posebne kokoši nesilice, a cijeli postupak uzgoja je prilično skup, pa i rizičan, jer zahtjeva visoku čistoću uzgajališta (sterilan zrak, sterilna hrana) te posebne uvjete skladištenja jaja. Proizvodnja cjepiva s pomoću SPF jaja smatra se neprikladnom zbog nesklada u potrebama i dostupnosti istih, naročito u slučajevima pandemije. Osim toga, problem je i u mogućim alergijama na rezidualne proteine jajeta, kontroli velike količine SPF jaja te duljem vremenu proizvodnje. Manjkavosti takve vrste proizvodnje smatraju se razlogom za mnoge nepovoljne reakcije pacijenata i oko 79 000 smrtnih slučajeva u sezoni gripe 2017./2018. (Mirasol, 2019). Stoga, kao brža i učinkovitija tehnološka alternativa upotrebljava se kultivacija virusa u kulturama životinjskih stanicama. Osim jednostavnijeg *scale-upa*, veće reproducibilnosti, mogućnosti za brži odgovor na potencijalne pandemije, takve tehnologije bazirane na staničnim kulturama doprinose i smanjenju cijene ukupne proizvodnje te su minimalizirale kontaminacije. Ukratko, smatra se da proizvodnja s pomoću staničnih kultura proizvođačima omogućava da u kraćem vremenu proizvedu veće količine cjepiva (Milián i Kamen, 2015).

Proizvodnja cjepiva korištenjem kulture stanica sastoji se od dvije faze: ekspanzije stanica i proizvodnje virusa. Ekspanzija stanica odvija se u propagatorima u mediju prilagođenom za rast stanične biomase šaržnim ili perfuzijskim postupkom. Druga faza započinje infekcijom stanične biomase virusom i nastavlja se kao faza proizvodnje virusnih čestica. Stanične linije koje se upotrebljavaju u proizvodnji cjepiva uglavnom su adherentne i zahtijevaju čvrstu površinu za rast i razmnožavanje, pa stoga obje faze proizvodnje u velikom mjerilu i u bioreaktorima s mehaničkim miješalima zahtijevaju primjenu mikronosača. U manjim industrijskim i laboratorijskim mjerilima umjesto bioreaktora s mehaničkim miješalom i mikronosača upotrebljavaju se *roller* boce i T-boce (Pujar i sur., 2016). Što se tiče proizvodnje u velikom mjerilu, najčešće se proces vodi kao diskontinuirani šaržni u bioreaktorima s mehaničkim miješalima (*stirred-tank bioreactor, STR*). Šaržni procesi u češćoj su uporabi od kontinuiranih zbog većih viralnih prinosa i bolje stabilnosti virusnih čestica. U bioreaktoru nužno je postići minimalne sile smicanja i omogućiti visoke stupnjeve prijenosa kisika (*oxygen transfer rate, OTR*) (Gallo–Ramírez i sur., 2015). Iako je većina staničnih linija adherentna, postoje i u razvoju su suspenzijske stanice koje ne zahtijevaju mikronosače, pa su mnogo bolji izbor za industrijsku proizvodnju zbog lakšeg vođenja i regulacije. Nedostaci primjene mikronosača jesu njihova cijena, problemi s odlaganjem otpada, potreba za visokom koncentracijom stanica, a u slučaju da se upotrebljava *serum-free* medij, potrebni su rekombinantni adhezijski faktori zbog slabog prijanjanja stanica na mikronosače u takvom mediju (Gallo–Ramírez i sur., 2015).

Nizvodni postupak u procesu proizvodnje cjepiva s pomoću staničnih linija sastoji se od uklanjanja stanica, ostataka razorenih stanica i mikronosača, uglavnom dubinskom filtracijom i centrifugiranjem te membranskom filtracijom (Kalbfuss-Zimmermann i Reichl, 2016). Uz stanice i njihove ostatke nužno je i uklanjanje stanične DNA, što se postiže kromatografijom (Kramberger i sur., 2015). Zatim slijedi pročišćavanje antigena kromatografskim tehnikama (poput ionske izmjene i biospecifične kromatografije) te krajnje formulacije proizvoda i njegove analize. Naravno, navedeni postupci moraju biti provedeni u sterilnim uvjetima. Detaljniji opis biotehnološkog procesa proizvodnje cjepiva u staničnoj kulturi na primjeru cjepiva protiv gripe bit će opisan u poglavlju 5. Najveći prinosi u takvim procesima postižu se odabirom ispravne stanične linije i njegovim provođenjem pri optimalnim parametrima (temperatura, pH, koncentracija otopljenog kisika, sastav medija,...) (Gallo–Ramírez i sur., 2015).

Nadalje, rekombinantna podjedinična cjepiva, u koja se ubrajaju i VLP cjepiva, proizvode se fermentacijskim postupcima s pomoću heterolognih domaćina koji mogu biti bakterije i kvasci te stanične linije insekata i sisavaca (Kalbfuss-Zimmermann i Reichl, 2016). Najveći izazov pri proizvodnji podjediničnih cjepiva jest prepoznati koji točno antigeni najbolje induciraju imunitet (Rodrigues i sur., 2015 prema Levine i sur., 1997). Uz identifikaciju odgovarajućeg antigena nužno je i identificirati gene koji kodiraju za iste. Odabrani geni kloniraju se u odgovarajući vektor kojim zatim transformiramo ili transficiramo stanice odgovarajućeg ekspresijskog sustava (Jeffs, 2007). Stanice u kojima se nalazi željeni klonirani gen uzgajaju se uz primjenu odgovarajućih bioprocenih parametara u svrhu proizvodnje antigena koji se pročišćava te upotrebljava u formulaciji konačnog proizvoda. Tijekom proizvodnje poželjno je da se eksprimirani proteini, tj. virusne podjedinice ili peptidi izlučuju ekstracelularno, odnosno u medij, što olakšava cjelokupno nizvodno procesiranje. U slučaju intracelularnog nakupljanja antigena potrebno je lizirati stanice, a postupak liziranja jednostavniji je pri uporabi staničnih kultura sisavaca nego bakterija kao ekspresijskog sustava (Kalbfuss-Zimmermann i Reichl, 2016). Jedna od mogućih tehnoloških prednosti rekombinantnih cjepiva jest mogućnost ugradnje odgovarajuće sekvence, tj. biljega (eng. *tag*) u vektor, uz sekvencu za željeni antigen. Ekspresijom biljega nastaje slijed aminokiselina koji ne utječe na antigena svojstva, ali za koji postoje specifična protutijela koja se mogu iskoristiti u biospecifičnoj kromatografiji, pa je na taj način olakšano pročišćavanje samog antigena.

Peptidna cjepiva mogu se proizvoditi tehnologijom rDNA postupcima koji sličje proizvodnji opisanih rekombinantnih cjepiva te sintetičkim, tj. kemijskim putem (Soema i sur., 2015).

Najvažniji korak u proizvodnji vektorskih cjepiva jest konstrukcija plazmidnog vektora. Konstruirani plazmidni vektor mora imati mogućnost replikacije u *E. coli* i uspješnu transkripciju

željenih gena u transficiranim stanicama. Kako bi izbjegli replikaciju plazmida u stanicama sisavaca, plazmid sadrži ishodište replikacije specifično za *E. coli*, a integracija u genom domaćina izbjegava se uporabom kružnih i superuvijenih plazmida čije sekvence dokazano ne smiju imati nikakve nenamjerne homologije s genomom domaćina (Chartrain, 2016). Takve transformirane stanice *E. coli* uzgajaju se u bioreaktorima osiguravajući im optimalne koncentracije nutrijenata i kisika u svrhu dobivanja velike količine plazmida. Kako bi osigurali učinkovitu dopremu plazmida do ribosoma u citoplazmi stanica, cjepivo se formulira koristeći se lipidnim ili polimernim nanonosačima koji ga štite od degradacije (Jiskoot i sur., 2019).

Ciljevi su nizvodnog postupka, o kojoj god proizvodnoj tehnologiji je riječ, uklanjanje staničnih nečistoća (proteina, DNA, RNA, lipida) te procesnih ostataka, očuvanje antigene strukture i stvaranje formulacije koja će omogućiti stabilnu okolinu u kojoj će se cjepivo čuvati minimalno dvije godine (Pujar i sur., 2016). Krajnji proizvod, osim što mora biti zdravstveno siguran što je klinički ispitano, mora biti i prilagođen krajnjem potrošaču, odnosno pojedincu koji će primiti cjepivo, a cijeli proces proizvodnje rigorozno je kontroliran. Sigurnost cjepiva provjerava se u svim stupnjevima njegova razvoja i proizvodnje, pa i nakon što cjepivo odobre regulatorne institucije te se uvede u primjenu (Salmon i Halsey, 2016).

Spomenuti proizvodni procesi ubrajaju se među najraširenije industrijske procese, no zbog konstante potrebe za razvojem novih i unaprjeđenjem postojećih cjepiva postoje i mnogi drugi tehnološki pristupi koji su još u fazi istraživanja. Neki su od suvremenih biotehnoloških dosega u proizvodnji cjepiva tako transgene životinje te uporaba gljiva, algi i biljki kao ekspresijskih sustava (Rabindran i Yusibov, 2016). Biljke, alge i gljive kao ekspresijski sustavi u proizvodnji cjepiva posebno su pogodne jer se pomoću njih mogu razviti jestiva cjepiva. Jestiva cjepiva spadaju u nove načine unosa cjepiva pa se istražuje mogućnost njihove primjene, a osim spomenutih, potencijal u razvoju jestivih cjepiva imaju i bakterije mliječne kiseline. Uporabom navedenih ekspresijskih sustava minimaliziramo nizvodna procesiranja, osiguravamo dobru raspoloživost antigena, lakše čuvanje i logistiku samog cjepiva, a osim u svježim oblicima, moguće je i korištenje liofiliziranih oblika takvih proizvoda (Criscuolo i sur., 2019). U budućnosti, za razvoj učinkovitijih cjepiva poželjne su i nove vrste adjuvansa, a Wei i suradnici (2020) spominju neke koji su u fazi kliničkog ispitivanja. Riječ je o adjuvansima na bazi saponina, polisaharidima i glikolipidima.

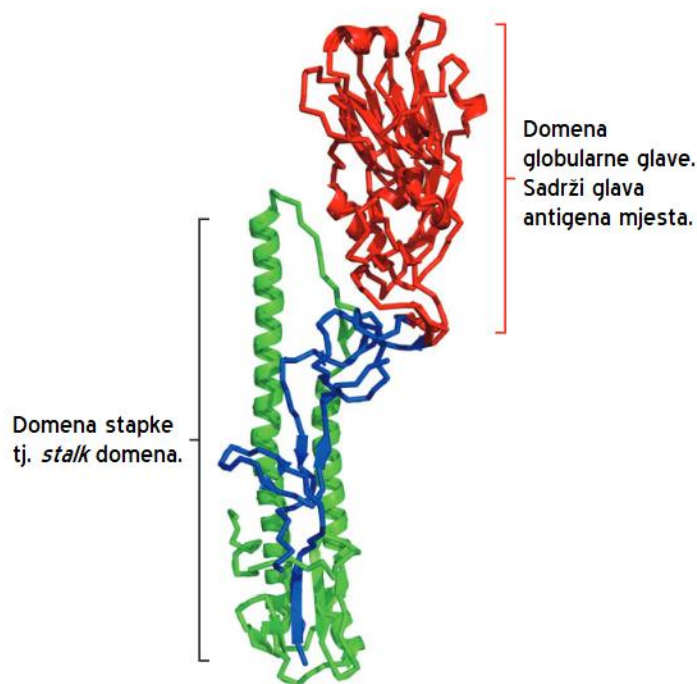
5. Proizvodnja cjepiva protiv gripe

Cjepiva protiv gripe upotrebljavaju se već više od 70 godina. Nakon što je 40-ih godina prošloga stoljeća razvijeno prvo cjepivo protiv gripe, i to kao bivalentno cjepivo koje je sadržavalo virus tipa A i B, 1952. godine stvorena je prva organizacija koja je sve do danas odgovorna za nadzor širenja gripe i uzorčnih sojeva virusa (Barberis i sur., 2016). *Global Influenza Surveillance and Response System* (GISRS) djeluje u sklopu WHO i zaduženo je da u suradnji s medicinsko-dijagnostičkim laboratorijima diljem svijeta kontrolira i prati pojavu gripe i njezino kretanje. Upravo je uloga GISRS-a da dva puta godišnje na temelju uvida u laboratorijske rezultate daje preporuke proizvođačima o virusnim sojevima koji bi se trebali naći u sastavu cjepiva za nadolazeću sezonu.

Zbog događaja opisanih u poglavlju 3.1. koji se zbivaju na razini genoma virusa gripe, virusi gripe konstantno mijenjaju antigena svojstva. Tako je najveći izazov u proizvodnji cjepiva protiv gripe na vrijeme proizvesti cjepivo koje će sadržavati one antigene koji će u nadolazećoj sezoni gripe, ili u slučaju pojave pandemije, pružiti maksimalnu zaštitu.

Zaštita protiv infekcije virusom gripe postignuta je kroz imunološki odgovor organizma u obliku neutralizirajućih protutijela koja reagiraju na glikoprotein HA i sprječavaju infekciju. Stoga je HA glavni antigen na kojem se temelji većina cjepiva protiv gripe. Neutralizirajuća protutijela specifična su za pojedini soj virusa gripe. Dakle, dogodi li se antigeno skretanje, tj. promjena na antigenim mjestima, specifično na globularnoj glavi koja pripada podjedinici HA1 (Wong i Webby, 2013), prethodno stečeni imunitet, odnosno neutralizirajuća protutijela zaostala u tijelu nakon infekcije ili cijepljenja neće biti učinkovita u zaštiti organizma od infekcije izmjenjenim sojem virusa. Protutijela protiv HA dijele se na ona koja reagiraju s domenom globularne glave i ona koja reagiraju na domenu stapke (eng. *stalk*) (Soema i sur., 2015). Značajno je da je stapka stabilnija od globularne glave koja je jako varijabilna. Domena stapke pripada podjedinici HA2. Pojednostavljeni prikaz HA vidljiv je na slici 5.

S druge strane, protutijela koja reagiraju na NA, drugi najvažniji protein virusa gripe, ne preveniraju virusnu infekciju, ali će smanjiti oslobađanje i širenje virusa (Kawaoka i Neumann, 2014). Stoga količina HA u licenciranim cjepivima mora biti točno određena i standardizirana, dok količina NA može ovisiti o sastavu cjepiva i tehnološkom procesu (Wei i sur., 2020). Proteini M2 i NP također imaju antigena svojstva i važni su za replikaciju virusa, no imunološka reakcija u obliku protutijela na navedene proteine ne može neutralizirati virus (Wong i Webby, 2013).



Slika 5. Strukturni prikaz hemaglutinina (prilagođeno prema Pica i Palese, 2013).

Rajaram i suradnici (2020) ističu tri razloga zbog kojih trenutačno proizvedena cjepiva ne pružaju potpunu zaštitu. To su nepodudaranje virusnih sojeva u cjepivu i u populaciji, karakteristike ljudskog imuniteta i adaptacija virusa na jaja. Adaptacija virusa na jaja podrazumijeva antigene promjene koje su se dogodile tijekom kultivacije virusa u kokošjim jajima. Stanice sisavaca i stanice ptica imaju različite površinske receptore, a s obzirom da tijekom proizvodnje virusnih čestica stanice ptica inficiramo virusom prilagođenim na infekciju stanica sisavaca, on se mora adaptirati na nove receptore. Prilikom adaptacije mogu se dogoditi promjene antigenih karakteristika virusa zbog kojih će takvo cjepivo biti manje učinkovito.

Cjepiva protiv gripe dostupna su u obliku inaktiviranog i živog oslabljenog cjepiva. Inaktivirana cjepiva mogu biti u obliku cijelog virusa, podjedinčna i fragmentirana cjepiva. Trenutačno su dostupna trovalentna i četverovalentna cjepiva. Inaktivirana cjepiva proizvode se kao trovalentna i četverovalentna, dok su živa oslabljena isključivo četverovalentna (Rajaram i sur., 2020). Trovalentna cjepiva sadrže selekcionirane sojeve podtipova A(H1N1) i A(H3N2) te po jedan soj virusa tipa B. Četverovalentna u svom sastavu sadrže obje linije virusa tipa B (Maletic Neuzil i Ortiz, 2016).

Sama proizvodnja je zahtjevna jer nakon što WHO objavi preporuke za sastav cjepiva na jednoj zemljinoj polutci, proizvođači imaju 6 mjeseci da proizvedu 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). Stoga je vremenska ograničenost jedan od najvećih izazova u proizvodnji cjepiva protiv gripe. Povećana potražnja za cjepivima protiv gripe i mogućnost pojave pandemije tako stvaraju pritisak na biotehnološku industriju za razvoj novih, bržih i učinkovitijih proizvodnih tehnologija.

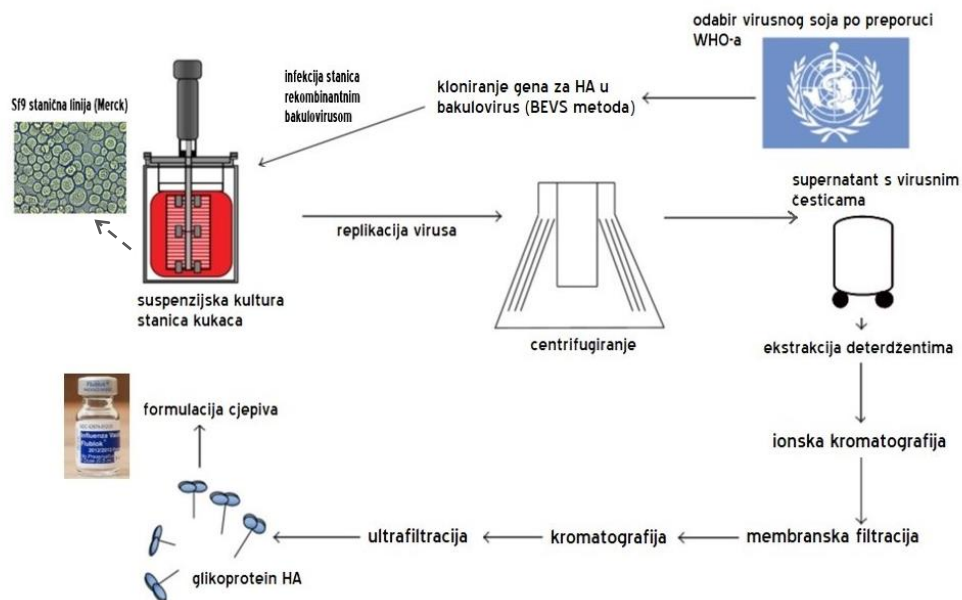
Nakon objave preporuka WHO, početan korak proizvodnje jest prikupiti ili konstruirati ishodišne virusne sojeve koji će se distribuirati proizvođačima diljem svijeta kako bi antigeni sastav cjepiva bio ujednačen (Milián i Kamen, 2015). Preporučeni, tj. potencijalni virusni sojevi izoliraju se iz kliničkih uzoraka te se provjerava njihov rast u jajima, a u slučaju slabog rasta, virus prolazi kroz tzv. antigenu izmjenu. Radi se o mehanizmu preraspodjele RNA segmenata opisanom u poglavlju 3.1. Potencijalnim virusom zarazi se jaje zajedno s „donorskim” sojem virusa koji ima svojstvo dobrog rasta u jajima. Međusobnom preraspodjelom virusnih segmenata između dva virusa nastat će novi virusi među kojima se izolira onaj koji ima svojstvo dobrog rasta u jajima i posjeduje antigene karakteristike koje odgovaraju preporukama WHO za sastav cjepiva (Rajaram i sur., 2020). Drugi pristup pri konstruiranju sojeva pogodnih za proizvodnju jest reverzna genetika koja upotrebljava plazmidnu DNA, samostalno ili koristeći se tzv. *helper* virusima, kako bi konstruirala željeni soj (Milián i Kamen, 2015). Reverzna genetika pristup je pogodniji za proizvodnju virusa u staničnim kulturama za razliku od pristupa ko-infekcije u jajima koji može rezultirati virusima koji će davati visoke prinose u jajima, ali ne i u staničnim linijama sisavaca (zbog prilagodbe na receptore stanica ptica).

Tehnologije koje su odobrene za proizvodnju cjepiva protiv gripe u industrijskom su mjerilu proizvodnja s pomoću SPF jaja, staničnih linija i tehnologija rekombinantne DNA. Ipak, većina cjepiva i dalje se proizvodi s pomoću SPF kokošjih jaja. Unatoč spomenutim nedostacima takve proizvodnje, u ovom je trenutku ona jedina dostatna da ispuni trenutne godišnje potrebe za cjepivima (Wei i sur., 2020). Međutim, smatra se kako proizvodnja s pomoću staničnih kultura i tehnologija rDNA mogu rezultirati cjepivima veće učinkovitosti (Mirasol, 2019). Tako su cjepiva proizvedena na staničnim kulturama, prema istraživanju u SAD-u, pokazala 10 – 11% veću učinkovitost, posebno u pacijenata starijih od 65 (Mirasol, 2019 prema Izurieta, 2018).

Proizvodnja cjepiva protiv gripe u SPF jajima je najzastupljenija još od 40-ih godina prošloga stoljeća. Sam princip inkubacije i propagacije virusa nije se promijenio. Proizvodnja se odvija po principu opisanom u poglavlju 4.3. Virusom gripe koji želimo umnožiti inokuliramo SPF embrionirana kokošja jaja, točnije alantoin jajeta. Nakon inkubacije, iz alantoina ekstrahiramo inficirane stanice, razbijamo ih i skupljamo virusne čestice. Skupljene frakcije podvrgavamo pročišćavanju u svrhu izolacije antigena, inaktivacije te formulacije cjepiva.

Sezone 2017./2018. WHO je prvi puta dao preporuke za virusne sojeve i za proizvodnju u staničnim kulturama. Trenutačno su tri stanične linije preporučene za upotrebu u proizvodnji cjepiva protiv gripe. To su *Madin Darby canine kidney* (MDCK) stanice, Vero stanice i PER.C6 stanice koje su jedine humanog podrijetla (Mirasol, 2019). Tehnologija proizvodnje bit će opisana u zasebnom poglavlju.

Uz živa oslabljena i ona najčešća, inaktivirana virusna cjepiva protiv gripe, u primjeni su i rekombinantna cjepiva u obliku virusima sličnih čestica (VLP). Najpoznatije rekombinantno cjepivo jest trovalentno cjepivo *FluBlok*, a proizvedeno je u kulturi stanica insekata koristeći se bakulovirusnim ekspresijskim sustavom tj. BEVS (eng. *baculovirus expression vector system*). Prednost tehnologije rekombinantne DNA u proizvodnji cjepiva protiv gripe jest ta što se virus gripe ne adaptira ni selekcioniра, pa se tako proizvedena cjepiva dobro podudaraju s cirkulirajućim sojevima. Usto, proizvodnja može trajati kraće od 2 mjeseca (Milián i Kamen, 2015). Princip bakulovirusnog ekspresijskog sustava temelji se na infekciji stanične kulture kukaca s rekombinantnim bakulovirusom koji služi kao vektor u koji su klonirani inserti, tj. geni za HA, NA i M1. Ekspresija HA, NA i M1 u stanicama insekata, tj. staničnoj kulturi Sf9 događa u kasnijim stadijima infekcije (McKenzie, 2019). Koekspresijom HA i M1, s ili bez NA, nastaju spontano formirane VLP čestice koje se pročišćavaju te formuliraju u cjepivo. Shematski prikaz proizvodnje HA BEVS metodom prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz proizvodnog procesa podjediničnog cjepiva protiv gripe u staničnoj kulturi kukaca (prilagođeno prema Milián i Kamen, 2015).

5.1. Proizvodnja cjepiva pomoću kulture životinjskih stanica

Postupak proizvodnje cjepiva protiv gripe korištenjem kulture stanica bit će opisan na primjeru američke tvrtke EMD Milipore, podružnice Mercka (njemačka farmaceutska tvrtka).

Bioprocес započinje pripremom medija i inokuluma stanica. Uzgoj stanica započinje u tikvici iz koje se zatim nacjepljuju propagatori uz mikronosače ako je riječ o adherentnoj kulturi. MDCK stanice navedene su kao konkretan primjer i zahtijevaju primjenu mikronosača te se uzgajaju u dva propagatora volumena 3 L i 50 L.

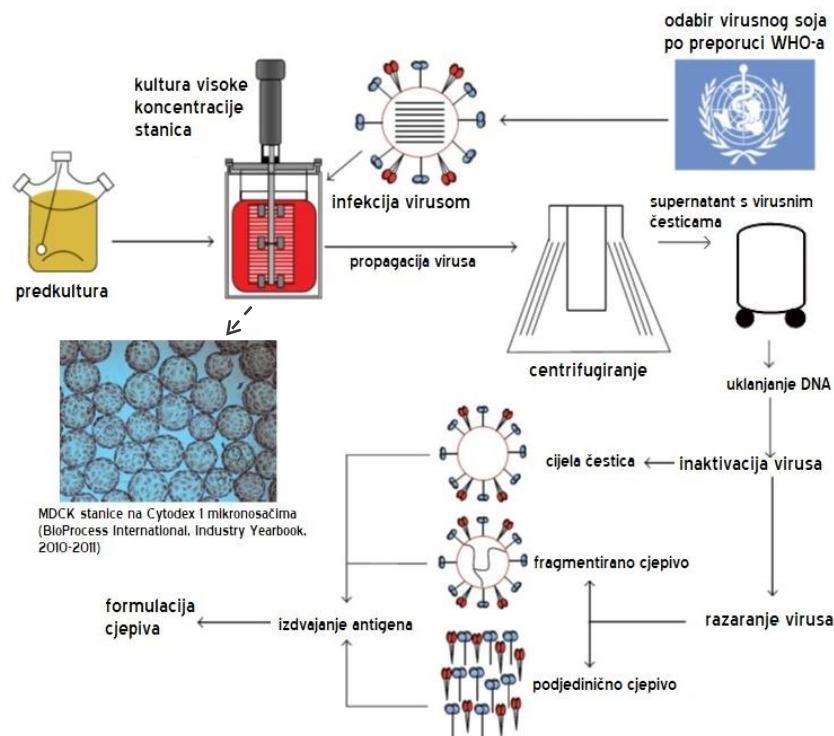
Sve komponente medija zajedno s prihranom (ako je proces saržni s prihranom ili kontinuirani) moraju biti sterilne. Proizvođači cjepiva preferiraju medije za uzgoj bez dodanog seruma (eng. *serum-free media*). Serum se u medij za uzgoj životinjskih staničnih kultura dodaje kao izvor nutrijenata, no sve se više izbjegava zbog negativnih utjecaja na nizvodni postupak, ograničenu dostupnost, visoku cijenu, sadržaja imunogenih proteina, kontaminanata, mogućnosti proteolitičke razgradnje produkata i dr. (Jayme, 2007). Umjesto seruma dodaju se sintetički nutrijenti. Nakon što koncentracija stanica u propagatoru dosegne koncentraciju 1×10^6 stanica/mL, kultura se inficira s određenim virusnim sojem, no tek nakon što je većina medija za rast uklonjena i zamijenjena medijem prilagođenim za fazu proizvodnje virusnih čestica. Temperatura iznosi 33 °C, pH 7,4. Za uspješnu virusnu infekciju u medij se dodaju i proteaze, poput tripsina, koje cijepaju hemaglutininski prekursor u aktivan oblik koji omogućava adsorpciju virusnih čestica na stanice. Takva MDCK stanična kultura u opisanom procesu može proizvesti do 1×10^9 pfu/mL virusa gripe u roku 3 – 5 dana. Koristeći se bioreaktorom volumena 1000 L uz mikronosače i MDCK stanice, proizveli bi jednaku količinu virusa koju bi proizveli i koristeći se 31 000 jaja.

Nizvodni postupci tj. postupci pročišćavanja koji slijede nakon umnožavanja virusa u staničnoj kulturi započinju odvajanjem stanica sa površine mikronosača s pomoću otopina soli. Odvojeni mikronosači zatim se uklone filtracijom, a filtrat se nadalje podvrgava uklanjanju stanica i staničnog debrisa. U tu svrhu EMD Milipore predlaže različite kombinacije tih tehnoloških operacija: centrifugiranje, prefiltracija, dubinska filtracija, tangencijalna filtracija (veličina pora 0,45 μm ili 0,65 μm) te finalna filtracija (veličina pora 0,45 μm ili 0,22 μm). Izdvojena pročišćena frakcija virusa zatim se tretira formaldehidom ili drugim sredstvima inaktivacije, poput UV zraka. Inaktivirane virusne čestice koncentriraju se procesima ultrafiltracije i diafiltracije uz uklanjanje niskomolekularskih nečistoća, a permeat se dalje pročišćava uz zonalno centrifugiranje u gradijentu gustoće ili kromatografskim metodama. Kromatografske metode poput ionske izmjene učinkovite su za uklanjanje ostataka DNA. Stupanj pročišćavanja nukleinskih kiselina s pomoću ionske izmjene iznosi oko 60 – 70, no zbog

zahtjeva FDA i WHO idući je korak je dodavanje endonukleaze koja cijepa sve oblike DNA i RNA. Ako je cjepivo koje se proizvodi fragmentirano cjepivo, sljedeći korak jest tretman deterdžentima koji razbijaju virusnu ovojnicu i oslobađaju unutarnje proteine. Sekundarna inaktivacija primjenjuje se kako bi bili sigurni u kompletnu sigurnost i inaktivaciju svih virusnih komponenti. Zadnji korak prije formulacije cjepiva jest sterilna filtracija. Formulacija konačnog proizvoda podrazumijeva dodavanje adjuvansa (poput MF59), pufera i stabilizatora, a da bi bili sigurni u njegovu biološku, kemijsku i fiziološku stabilnost, proizvod se podvrgava kontroli kvalitete i krajnjim analizama. Neke su od analiza mjerenje ukupnog sadržaja proteina metodom prema Bradfordu, određivanje rezidualne DNA PCR metodom te rezidua formaldehida i endonukleaze, provjera čistoće cjepiva uz SDS-PAGE ili Western blot i dr.

Regulatorne institucije smatraju Vero stanice najprihvatljivijom staničnom linijom za proizvodnju viralnih humanih cjepiva (Shen i sur., 2019), a MDCK stanice najpogodnije su za proizvodnju cjepiva protiv gripe u velikom mjerilu (Pérez Rubio i Eiros, 2018). Suspenzijsku kultura MDCK stanica upotrebljava tvrtka Seqirus za proizvodnju trovalentnog podjediničnog cjepiva protiv gripe *Optaflu* te četverovalentnog cjepiva *Flucelvax*. Cjepivo *Celtura* od Novartisa, protiv pandemijske A(H1N1) gripe, proizvedeno je također s pomoću MDCK stanične linije. U Vero stanicama proizvode se *Preflucl* i *Celvapan*. Od ukupno 14 odobrenih cjepiva protiv gripe za uporabu u sezoni 2019./2020. u Europi, jedino je Seqirusov *Flucelvax Tetra* bio proizveden s pomoću staničnih kultura (Seqirus, 2019).

Shematski prikaz proizvodnog postupka koristeći životinjske stanice za proizvodnju cjepiva protiv gripe vidljiv je na slici 7., a primjer se odnosi na proizvodnju pomoću MDCK stanica. Osim MDCK i Vero staničnih linija, pogodna kultura za proizvodnju cjepiva protiv gripe jesu i stanice izvedene iz ljudske mrežnice, PER.C6 stanična linija, iako su dosadašnja istraživanja pokazala slabiju imunogenost i reakciju humoralnog imuniteta (Pérez Rubio i Eiros, 2018), pa su dodatna istraživanja u svrhu optimizacije takve proizvodnje potrebna. Među novije otkrivenim pogodnim staničnim linijama spominje se PBG.PK2.1, stanična kultura izvedena iz svinjskih stanica bubrega. Takva je kultura kontinuirana, suspenzijska i raste u kemijski definiranom mediju, dakle ne zahtijeva ni mikronosače ni serum, a dosadašnja istraživanja pokazala su dobre rezultate u virusnim prinosima, pa su stanice PBG.PK2.1 potencijalan kandidat za razvoj novih cjepiva protiv gripe (Gränicher i sur., 2019).



Slika 7. Shematski prikaz uzvodnog i nizvodnog postupka u proizvodnji inaktiviranog cjepiva protiv gripe pomoću kultura životinjskih stanica. Na slici je prikazan primjer proizvodnje u adherentnim MDCK stanicama (prilagođeno prema Milián i Kamen, 2015).

5.2. Univerzalno cjepivo protiv gripe

Razmatrajući sve izazove s kojima se proizvođači cjepiva protiv gripe moraju suočiti u samo nekoliko mjeseci, i tako svake godine, jasno je da industrija teži k nekim jednostavnijim i idealnijim rješenjima. U tom smislu idealno cjepivo protiv gripe bilo bi ono cjepivo koje bi štitilo protiv svih sojeva virusa gripe, bez obzira događa li se antigena izmjena ili skretanje, i neovisno o tome je li riječ o sezonskoj ili pandemijskoj gripi.

WHO svake sezone za sastav cjepiva daje samo preporuke temeljene na pretpostavkama o tome koji bi virusi mogli dominirati u nadolazećoj sezoni gripe. Stoga pogrešne pretpostavke nipošto nisu neisključive. Tako je u razdoblju od 2002. do 2015. godine zabilježeno čak pet slučajeva nepodudaranja sezonskih virusnih sojeva sa sojevima virusa gripe koji su korišteni u proizvodnji cjepiva po preporuci WHO (Rajaram i sur., 2020). Takvi se propusti nastoje svesti na najmanju moguću mjeru. Osim što je cilj proizvesti idealno – univerzalno cjepivo, ideja je da takvo cjepivo, osim efektivne, omogući i dugotrajnu zaštitu. Postoji nekoliko strategija s pomoću kojih znanstvenici pokušavaju razviti univerzalno cjepivo protiv gripe.

Glavna strategija temelji se na varijabilnosti globularne glave HA (koju čini većinski HA1 podjedinica) i konzerviranijem domene stapke (HA2 podjedinica). HA1 je imunodominantna jedinica za razliku od subdominantne HA2, odnosno domene stapke, pa je imunološka reakcija u organizmu uglavnom usmjerena na neutralizaciju domene HA1. Neutralizirajuća protutijela specifična za domenu stapke reagiraju i na druge virusne podtipove, što se naziva unakrsna reakcija (eng. *cross-reaction*) (Kumar i sur., 2018). Neki su od dosadašnjih pokušaja razvoja univerzalnog cjepiva protiv gripe temeljeni na toj strategiji prema Krammeru (2016):

- Uklanjanje globularne glave kako bi preostala samo stapka koja će stimulirati imunski sustav. Takozvana „bezglava“ HA cjepiva (eng. *headless HA*).
- Sekvencionalno cijepljenje imernim HA cjepivima (cHA). Cilj im je refokusirati imunski odgovor prema stapci tako da globularna glava bude egzotičnog podrijetla (npr. ptičjeg) zbog čega je irelevantna.
- Hiperglikolizacija HA1 domene zaštitila bi ju od imunološkog sustava i preusmjerila protutijela na HA2 domenu.
- Prezentacija epitopa stapke u obliku VLP cjepiva.
- Izabrani epitopi u obliku peptidnih cjepiva.

Koji god pristup bio, ideja je da se u organizmu potakne unakrsno-reaktivni imunitet. Jang i Seong (2019) navode određene probleme s cjepivima koja se temelje na subdominantnoj stapci. Primijećeno je da je zaštita nakon cijepljena s cjepivima baziranim na domeni stapke relativno slaba i uglavnom usmjerena na samo jednu filogenetsku grupu (18 podtipova HA podijeljeni su u dvije filogenetske grupe). Sigurnost samog cjepiva upitna je i još se istražuje. Također, iako je domena HA2 smatrana konzerviranijom i manje podložnoj antigenim promjenama, promjene se i dalje događaju, što čini takvu vrstu cjepiva upitnom za uporabu u svrhu stvaranja dugoročnog imuniteta.

Druge strategije temelje se na konzerviranim regijama unutar HA osim stapke, NA te M2 ionskom kanalu.

Kako bi otkrili druge konzervirane regije na HA, upotrebljavaju se humana monoklonska protutijela koja se vežu na specifične epitope. Primjer su CR9114 i CH65, monoklonska protutijela koja su pokazala svojstvo vezanja na više sojeva, ali na specifične konzervirane regije (Eistenstein, 2019; Jang i Seong, 2019). Otkriće konzerviranih regija na HA predstavlja jednu od mogućnosti za razvoj univerzalnog cjepiva protiv gripe.

NA, kao drugi najvažniji površinski glikoprotein virusa gripe, zaslužan je za širenje infekcije, odnosno oslobađanje virusnih čestica u organizmu. Zbog svoje uloge u virusnoj infekciji često

je ignoriran s obzirom na to da se smatra kako neutralizirajuća protutijela usmjerena na NA ne mogu spriječiti virusnu infekciju (Jang i Seong, 2019). Prednost NA jest ta što je potpuno neovisna o antigenim promjenama koje se događaju na HA. Ipak, cjepiva na bazi NA još su slabo istražena te bi za bolje razumijevanje imuniteta baziranom na NA naglasak trebao biti na izolaciju i karakterizaciju NA protutijela (Jang i Seong, 2019).

Transmembranski ionski kanal M2 posjeduje vrlo konzerviranu regiju pronađenu među podtipovima virusa gripe tipa A, regija M2e (Pica i Palese, 2013). Nedostatak je što se regija M2e strukturno razlikuje od regije M2e u virusima tipa B, stoga je potencijal takvog cjepiva univerzalnost samo za viruse tipa A. Dosadašnja cjepiva razvijena na temelju M2e pokazala su se sigurna, no njihova je učinkovitost upitna – zahtijevala su nosače, vektore i adjuvanse za poticanje imunskog odgovora (Jang i Seong, 2019). Jedan od pristupa u razvoju su virusu nalik čestice tj. VLP koje na svojoj površini sadrže M2e, a poboljšanja takvog cjepiva ostvarena su kombinacijom M2e i drugih virusnih antigena, primjerice jedinice VLP-a koje na površini prezentira M2e i stapku HA.

U proučavanju trenutnih pristupa za razvoj univerzalnog cjepiva protiv gripe za njihovu proizvodnju ističe se rekombinantna tehnologija te suvremeniji sustavi za proizvodnju poput uzgoj u kulturama stanica. Kumar i sur. (2018) za njihov razvoj predlažu vektorska cjepiva DNA i RNA zbog sigurnosti i relativno kratkog vremena proizvodnje. Niti jedno univerzalno cjepivo još nije prošlo kliničku fazu ispitivanja, pa stoga niti izašlo na tržište. U ovome je trenutku čak osam kandidata za univerzalno cjepivo protiv gripe u drugoj ili trećoj fazi kliničkog ispitivanja. Većina ih je univerzalna samo za viruse tipa A, dok su tri kandidata univerzalna i za tipove A i B. Iako je trenutna situacija glede kliničkih ispitivanja optimistična, istraživači i dalje ne znaju hoće li razvijena cjepiva ostaviti trajnu zaštitu kao ni koliko bi takva zaštita mogla trajati (Corona, 2020).

Još mnogi imunološki odgovori koji nastaju u organizmu pri doticaju s virusom gripe nisu u potpunosti razjašnjeni. U budućnosti treba staviti naglasak, osim na razumijevanje virusnih i imunoloških mehanizama, i na razvoj novih pristupa i tehnologija koje bi, u slučaju njegova otkrića, omogućile brz razvoj univerzalnog cjepiva protiv gripe.

6. Zaključak

Gripa je zarazna virusna bolest koja se uglavnom pojavljuje sezonski u lokaliziranim žarištima te je neprekidno prisutna u svjetskoj populaciji. Nepredvidivost promjena svojstava virusa gripe kao i rastuće migracije stanovništva povećavaju vjerojatnost pandemijske raširenosti ove bolesti koja bi mogla imati nesagledive posljedice za društvo. Zbog toga zdravstvene organizacije koje prate širenje gripe, na lokalnoj i globalnoj razini, ukazuju na potrebu za razvojem tehnologija koje će u što kraćem vremenu osigurati potrebnu količinu učinkovitog cjepiva. Prošlo je 75 godina od proizvodnje prvih doza cjepiva protiv gripe, pri čemu je u većini slučajeva proizvodni postupak ostao gotovo nepromijenjen do danas.

Primjena staničnih kultura u proizvodnji cjepiva protiv gripe kao alternativa konvencionalnoj proizvodnji SPF jajima, jedan je od načina kako povećati i ubrzati proizvodne kapacitete. Suvremeni biotehnološki pristupi, optimizacija bioprocenih parametara u kultivaciji staničnih linija, metode genetičkog inženjerstva i unaprjeđenje formulacije omogućile su razvoj novih, poboljšanih vrsta cjepiva koja se mogu proizvesti u velikom broju doza.

Univerzalno cjepivo protiv gripe znatno bi skratilo put cjepiva od proizvođača do krajnjih korisnika, prevenirajući tako brzo širenje bolesti, a u najboljem bi je slučaju potpuno iskorijenilo. Izgledi da prvo takvo cjepivo bude stavljeno na tržište u nadolazećem desetljeću prilično su veliki s obzirom na uložena sredstva u područje istraživanja. Međutim, pred znanstvenicima u odjelima istraživanja i razvoja te procesnim biotehnozima su i dalje mnogi izazovi, kako biomedicinski tako i tehnološki: od praćenja promjena strukture virusa do načina izlaganja antigena i razumijevanja imunskih događaja u organizmu; te od izgradnje učinkovitih tehnoloških sustava visokih prinosa proizvoda (tj. antigena) pa do razvoja strategije globalne distribucije i aplikacije cjepiva.

Popis literature

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. (2016) History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. *J Prev Med Hyg* **57(3)**: E115-E120.

Bloom B.R. i Lambert P.H. (2016) Preface. U: *The Vaccine Book*, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier

Bottomley M.J., Rappuoli R., Finco O. (2016) Vaccine Design in the 21st Century. U: *The Vaccine Book*, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier, str. 45-60.

Bouvier N. M. i Palese P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**: 49-53.

Callaway E. (2020) The race for coronavirus vaccines: A graphical guide. *Nature* **580**:576-577.

Centres for Disease Control and Prevention (2009) Understanding Influenza (Flu) Infection: An Influenza Virus Binds to a Respiratory Tract Cell. <https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/images.htm>. Pristupljeno 1. kolovoza 2020.

Centres for Disease Control and Prevention. (2019a). Influenza (Flu): About Flu. <https://www.cdc.gov/flu/about/index.html>. Pristupljeno 1. kolovoza 2020.

Centres for Disease Control and Prevention. (2019b) Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases: Influenza. <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/flu.html>. Pristupljeno 1. kolovoza 2020.

Centres for Disease Prevention and Control (2020) Influenza (Flu): Quadrivalent Influenza Vaccine. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/quadrivalent.htm>. Pristupljeno 25. kolovoza 2020.

Chartrain M. (2015) The Production of Plasmid DNA Vaccine in *Escherichia coli*: A Novel Bacterial-Based Vaccine Production Platform. U: *Vaccine development and manufacturing*. E. P. Wen, R. Ellis i N. S. Pujar, ur., John Wiley & Sons, str. 25-50.

Corona A. (2020) A Universal Influenza Vaccine: How Close Are We? *American Society for Microbiology*. <https://asm.org/Articles/2019/August/A-Universal-Influenza-Vaccine-How-Close-Are-We>. Pristupljeno 1. rujna 2020.

Dimmock N.J., Easton A.J. i Leppard K.N. (2016) Introduction to Modern Virology, 7. izd., John Wiley & Sons, str. 309-326.

Dubé E. i MacDonald N.E. (2016) Vaccine Acceptance. U: The Vaccine Book, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier, str. 507.

Eisenstein M. (2019) Towards a universal flu vaccine. Nature. <https://www.nature.com/articles/d41586-019-02751-w>. Pristupljeno 2. rujna 2020.

Ellebedy A.H. i Ahmed R. (2016) Antiviral Vaccines: Challenges and Advances. U: The Vaccine Book, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier, str. 283-304.

EMD Millipore (2014) Generic process of cell culture based influenza vaccine. https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201306.15694. Pristupljeno 31. kolovoza 2020.

Gallo-Ramírez L., Nikolay A., Genzel Y. i Reichl, U. (2015) Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production. *Expert Rev. Vaccines* 1-15.

Gränicher G., Coronel J., Pralow A., Marichal-Gallardo P., Wolff M., Rapp E., ... i Reichl U. (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.

Griffiths B. (2007) The development of animal cell products: History and Overview. U: Medicines from Animal Cell Culture. Stacey G. i Davis J., ur., John Wiley & Sons, str. 1-14.

History of Vaccines (2018) Early Tissue and Cell Culture in Vaccine Development. The College of Physicians of Philadelphia. <https://www.historyofvaccines.org/content/articles/early-tissue-and-cell-culture-vaccine-development>. Pristupljeno 29. kolovoza 2020.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2019) Kalendar kontinuiranog cijepljenja u Republici Hrvatskoj u 2019. godini. <https://javno-zdravlje.hr/kalendar-kontinuiranog-cijepljenja-u-republici-hrvatskoj-u-2019-godini/>. Pristupljeno 31. rujna 2020.

Iuliano A. D., Roguski K. M., Chang H. H., Muscatello D. J., Palekar R., Tempia S., Wu P. i sur. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet* **391(10127)**: 1285-1300.

Ivković-Jureković I. N. M. (2019) Alergijske reakcije na cjepiva. *Paediatr Croat.* 155-159.

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: Medicines from Animal Cell Culture. Stacey G. i Davis J., ur., John Wiley & Sons, str. 29-40.

Jefferies S.A. (2007) Production of Recombinant Viral Vaccine Antigens. U: Medicines from Animal Cell Culture. Stacey G. i Davis J., ur., John Wiley & Sons, str. 79-100.

Jiskoot W., Kersten G. F., Mastrobattista E. i Slütter B. (2019) Vaccines. U: Crommelin D.J.A., Sindelar R.D., Meibohm B., ur. Pharmaceutical Biotechnology. Springer, str. 281- 304.

Kalbfuss-Zimmermann B. i Reichl U. (2015) Viral Vaccines Purification. U: Vaccine development and manufacturing. E. P. Wen, R. Ellis i N. S. Pujar, ur., John Wiley & Sons, str. 97-107.

Kong W. H., Li Y., Peng M. W., Kong D. G., Yang X. B., Wang L., i Liu M. Q. (2020) SARS-CoV-2 detection in patients with influenza-like illness. *Nature microbiology* **5(5)**: 675-678.

Kramberger P., Urbas L. i Štrancar A. (2015) Downstream processing and chromatography based analytical methods for production of vaccines, gene therapy vectors, and bacteriophages. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **11(4)**:1010-1021.

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.

Laere E., Ling A.P.K., Wong Y.P., Koh R.Y, Lila M.A.M. i Hussein S. (2016) Plant-Based Vaccines: Production and Challenges. *Journal of Botany* **2016**: 1-11.

Madhav N., Oppenheim B., Gallivan M., Mulembakani P., Rubin E., Wolfe N. (2017) Pandemics: Risks, Impacts, and Mitigation. U: Improving Health and Reducing Poverty, 3. izd., Jamison D.T, Gelband H, Horton S, i sur., ur., The International Bank for Reconstruction and Development, The World Bank.

McKenzie S. (2019) The Baculovirus Expression Vector System (BEVS). [https://www.news-medical.net/life-sciences/The-Baculovirus-Expression-Vector-System-\(BEVS\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/The-Baculovirus-Expression-Vector-System-(BEVS).aspx).

Pristupljeno 4. rujna 2020.

Milián E. i Kamen A. A. (2015) Current and Emerging Cell Culture Manufacturing Technologies for Influenza Vaccines. *BioMed Research International* **2015**: 504831

Mirasol F. (2019) Modernizing Flu Vaccine Manufacturing. *BioPharm International* **32(11)**: 27-30.

Monto A. S., i Fukuda K. (2020) Lessons from influenza pandemics of the last 100 years. *Clinical Infectious Diseases* **70(5)**:951-957.

Neuzil K.M i Oritz J.R. (2016) Influenza Vaccines and Vaccination Strategies. U: The Vaccine Book, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier, str. 420-440

Oldstone M. (2014) History of Virology. *Encyclopedia of Microbiology* **2014**: 608–612.

Oxford Vaccine Group (2019) Types of Vaccine. Centre for Clinical Vaccinology and Tropical Medicine, University of Oxford. <https://vk.ovg.ox.ac.uk/vk/types-of-vaccine>. Pristupljeno 28. kolovoza 2020.

Oxford Vaccine Group (2019b) Vaccine ingredients. Centre for Clinical Vaccinology and Tropical Medicine, University of Oxford. <https://vk.ovg.ox.ac.uk/vk/vaccine-ingredients>. Pristupljeno 28. kolovoza 2020.

Paget J., Spreeuwenberg P., Charu V., Taylor R. J., Iuliano A. D., Bresee J., Simonsen L., Viboud C., Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network i GLaMOR (2019) Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *Journal of global health* **9(2)**: 020421.

Pardi N., Hogan M. J., Porter F. W., i Weissman D. (2018) mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature reviews Drug discovery* **17(4)**: 261

Parker N., Schneegurt M., Thi Tu A.-H., Forster B. M. i Lister P. (2016) Microbiology. OpenStax, Rice University. <https://openstax.org/details/books/microbiology>. Pristupljeno 14. rujna 2020.

Pelliccia M., Andreozzi P., Paulose J., D'Alicarnasso M., Cagno V., Donalisio M., ... i Carney R. P. (2016) Additives for vaccine storage to improve thermal stability of adenoviruses from hours to months. *Nature communications* **7(1)**: 1-7.

Pérez Rubio A. i Eiros J.M. (2018) Cell culture-derived flu vaccine: Present and future. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **14(5)**:1-25.

Pica N. i Palese P. (2013) Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Prospects and Challenges. *Annu. Rev. Med.* **64**:189-202.

Pinschewer D.D. (2017) Virally vectored vaccine delivery: medical needs, mechanisms, advantages and challenges. *Swiss Medical Weekly* **147**:14465.

Priddy T.S. i Middaugh C.R. (2015) Stabilization and Formulation of Vaccines. U: Vaccine development and manufacturing, E. P. Wen, R. Ellis i N. S. Pujar, ur., John Wiley & Sons, str. 237-260.

Pujar N. S., Sagar S. L. i Lee A. L. (2015) History of Vaccine Process Development. U: E. P. Wen, R. Ellis i N. S. Pujar, ur. Vaccine development and manufacturing, John Wiley & Sons, str. 15-38.

Rabindran S. i Yusibov V. (2015) Novel Expression Systems for Vaccine Production. U: Vaccine development and manufacturing. E. P. Wen, R. Ellis i N. S. Pujar, ur., John Wiley & Sons, str. 81-95.

Rajaram S., Boikos C., Gelone D.K. i 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: The Vaccine Book, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier, str. 78-96.

Rodrigues A. F., Soares H.R., Guerreiro M.R., Alves P.M. i Coroadinha A.S. (2015) Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology. *Biotechnol. J.* **10**:1329-1344.

Salmon D.A i Halsey N.A. (2016) How Vaccine Safety is Monitored. U: The Vaccine Book, 2. izd., Bloom B.R. i Lambert P.H., ur., Academic Press, Elsevier, str. 153-162.

Seqirus (2019) First cell-based quadrivalent influenza vaccine approved for use in Europe. <https://www.seqirus.com/news/first-cell-based-quadrivalent-influenza-vaccine-approved-in-europe>. Pristupljeno 3. rujna 2020.

Shahrour N. (2001) The Role of Neuraminidase Inhibitors in the Treatment and Prevention of Influenza. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* **1(2)**:89–90.

Shen C. F., Guilbault C., Li X., Elahi S. M., Ansorge S., Kamen A. i Gilbert R. (2019) Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine* **37(47)**: 6996-7002.

Soema P. C., Kompier R., Amorij J. P. i Kersten G. F. (2015) Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **94**: 251–263.

Taubenberger J. K., Hultin J. V. i Morens D. M. (2007) Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antiviral therapy* **12**: 581–591.

The History of Vaccines. (n.d.) All Timelines Overview. The College of Physicians of Philadelphia. https://www.historyofvaccines.org/timeline#EVT_100400. Pristupljeno: 6. kolovoza 2020.

Vemula S. V., Zhao J., Liu J., Wang X., Biswas S. i 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. i Nabel G. J. (2020) Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**:14.

Wen E.P., Ellis R. i Pujar N.S. (2015) Preface. U: Vaccine development and manufacturing. E. P. Wen, R. Ellis i N. S. Pujar, ur., John Wiley & Sons.

Wille M. i Holmes E. C. (2020) The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **10(7)**:1-19.

Wong S. S. i Webby R. J. (2013) Traditional and new influenza vaccines. *Clinical microbiology reviews* **26(3)**: 476–492.

Woolhouse M. E. i 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. <https://vaccine-safety-training.org/vaccine-components.html>. Pristupljeno 25. kolovoza 2020.

World Health Organisation. (2018) Influenza (Avian and other zoonotic). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic)). Pristupljeno 27. srpnja 2020.

World Health Organisation. (2018, studeni) Influenza (Seasonal). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) Pristupljeno 27. srpnja 2020.

World Health Organisation. (n.d.) Influenza: Data and statistics. Regional office for Europe. <https://www.who.int/influenza/gip-anniversary/en/>. Pristupljeno: 5. kolovoza 2020.

World Health Organisation. (n.d.) Influenza: Into the history of influenza control... WHO Global influenza Programme. <https://www.who.int/influenza/gip-anniversary/en/>. Pristupljeno: 5. kolovoza 2020.

Zhang C., Maruggi G., Shan H. i Li J. (2019) Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Frontiers in Immunology* **10**: 594.

Ziegler T., Mamahit A. i Cox N. J. (2018) 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network. *Influenza and other respiratory viruses*