

TEHNOLOŠKE ZABILJEŠKE

Uređuje: Marin Kovačić



M. Kovačić*

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku
kemijsku tehnologiju procesa, Savska cesta 16, 10 000 Zagreb

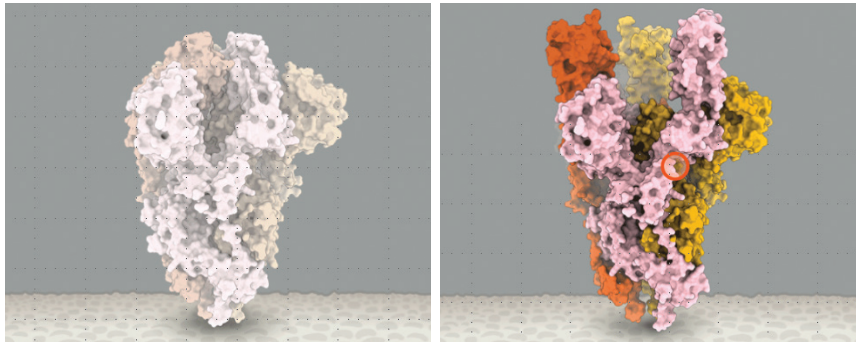
Biotehnologijom protiv pandemije SARS-CoV-2

Slobodno možemo pretpostaviti da se mnogi, ako ne i većina, u društvu s vremena na vrijeme zapitaju hoće li se ikad okončati aktualna pandemija COVID-19 uzrokovana SARS-CoV-2 virusom, te kad i hoćemo li se vratiti načinu života kakav smo poznavali prije početka pandemije. Zdravstvena zajednica te političari svojodobno su velike nade polagali u tzv. imunitet krda, odnosno da će do jenjavanja pandemije doći stjecanjem imuniteta protiv virusa COVID-19 u barem 60 – 70 % populacije prebolijevanjem bolesti, cijepljenjem ili eventualnim iščekavanjem virusa SARS-CoV-2.¹⁻³ U tom slučaju, bez obzira na infekciju pojedinca, prijenos virusa bio bi iznimno otežan. Nažalost, čini se da takav scenarij nije izgledan zbog više čimbenika. Tijekom prvih 11 mjeseci aktualne pandemije SARS-CoV-2 smatralo se da virus nije sklon mutiranju, što je poželjna karakteristika s aspekta borbe protiv njega cijepljenjem.⁴ Rezultati sekvenciranja više stotina tisuća do tad prikupljenih genoma virusa ukazivali su na to da većina mutacija ne dovodi do znatnije promjene u patogenim svojstvima virusa te da su mutacije relativno rijetke. Štoviše, ustanovljeno je da je viralni prekursor SARS-CoV-2, kojem je prvobitni vektor bio najvjerojatnije šišmiš potkovnjak (*Rhinolophus*), genetički vrlo sličan varijanti koja inficira ljude.⁵ Međutim, nakon prividnog zatišja u evoluciji virusa SARS-CoV-2, počele su se pojavljivati brojne varijante, odnosno sojevi poput tzv. "brazilskog" ("gama") i "delta" soja, čija virološka svojstva zabrinjavaju zdravstvenu zajednicu. Nadalje, drugi problem ka ostvarenju tog cilja je skeptičnost velikog dijela javnosti prema sigurnosti i/ili učinkovitosti cijepljenja, stoga nije izgledno da će zbog sinergije tih dvaju faktora imunitet krda ikad biti dostignut. Usporedbe radi, opsežni globalni naponi cijepljenja protiv *Variola* virusa, odnosno uzročnika velikih i malih boginja, u razdoblju od 1966. do 1977. pod paskom Svjetske zdravstvene organizacije rezultirali su iskorjenjivanjem boginja nakon što su tisućljećima morile čovječanstvo. Zanimljivo je napomenuti da su kroz povijest narodi Dalekog i Bliskog istoka poznavali prekursor metode "cijepljenja", odnosno inokulaciju, kojom su tekućinom iz pustula zaraženih malim boginjama inokulirali nezaražene. Godine 1801. Edward Jenner formalizirao je postupak cijepljenja ljudi virusom kravljih boginja, za koji je ustvrdio da pruža imunitet protiv strašne bolesti.⁶⁻⁸ Međutim, *Variola* virus bio je iznimno podložan djelovanju cjepiva jer je čovjek jedini vektor, odnosno jedini izvor zaraze boginjama, nije latentan virus te ima dobro poznato razdoblje inkubacije. U slučaju virusa SARS-CoV-2, situacija se dodatno komplicira jer je ustanovljeno da virus može inficirati čitav niz drugih sisavaca, poput hrčaka, mačaka, majmuna, pasa pa i tvorova.^{9,10} Samim time, čak i da se adekvatan broj ljudi cijepi ili preboli bolest, za postizanje imuniteta krda, nije isključena mogućnost zoonotskog prijenosa virusa natrag na čovjeka te njegove mutacije prilikom toga. Međutim, zbog navedenoga cjepivo ne treba smatrati posve neučinkovitim, posebice ne nepotrebnim. Naprotiv, postoji znanstveni konsenzus u svezi s dobiti cijepljenja po pitanju smanjenja učestalosti ishoda bolesti COVID-19, odnosno

učestalosti hospitalizacija, pa tako i onih najtežih, smrtnih ishoda.^{11,12} Premda imunitet krda možda nećemo dosegnuti, učinkovitost postojećih cjepiva može biti ozbiljno ugrožena ako bi sinergizmom otpora necijepljenog dijela stanovništva zajedno s relaksacijom dosadašnjih protuepidemijskih mjera došlo do nekontroliranog i stihijskog prijenosa virusa, čime bi se potaknuli pozitivni selekcijski pritisci na virus. U konačnici takav evolucijski pritisak mogao bi rezultirati sojem prema kojem postojeća cjepiva nisu djelotvorna.¹³ Što se tiče cjepiva, naizgled velik otpor pruža se prema Pfizerovom/BioNTechovo i Astra Zenecinom cjepivu. Riječ je o cjepivima nove, treće generacije, temeljenim na mRNA tehnologiji, dostupnoj tek nešto manje od desetljeća.^{14,15} Cjepiva prve generacije, kakva je i dr. Renée Weiss-Malaček u Imunološkog zavoda nekoć pripremila za suzbijanje boginja u Jugoslaviji, temeljila su se na umrtvljenim ili neaktivnim virusima.¹⁶ Međutim, u slučaju cjepiva prve generacije moglo je u nekim slučajevima doći do "oživljavanja" patogena te pojave bolesti. Cjepiva druge generacije su tzv. rekombinantna DNK cjepiva, pri čemu se djelić DNK virusa koji odgovara sekvenciji za proizvodnju proteina šiljka (engl. *spike protein*) injektira najčešće u stanice kvasaca, koji potom kao stanične tvornice proizvode velike količine virusnog proteina. Virusi se putem šiljaka vezuju na stanične receptore, čime započinju infekciju, a imunostni sustav upravo te šiljke može prepoznati u organizmu. Sintetizirani proteini šiljka izdvajaju se, pročišćavaju i doziraju, pri čemu se ponašaju kao antigeni za koje imunostni sustav proizvodi antitijela analogno za "živi" virus. Treća generacija cjepiva ne zahtijeva međukorak proizvodnje antigena u industrijskom mjerilu, već naše vlastite stanice proizvode potreban antigen za imunostni odgovor. Konkretno, na mjestu injekcije ribosomi mišićnih stanica temeljem instrukcija danih ubrizganom mRNA počinju proizvoditi protein šiljka. Po dovršetku sinteze, proteini se oslobađaju u okruženje stanice, a mRNA se razgrađuje. Imunostni sustav potom prepoznaje nepoznate proteine i priprema imunostni odgovor u vidu antitijela te B limfocita, stanica s imunostnom memorijom. Zahvaljujući tome, pojedinac je u velikoj većini slučajeva zaštićen od buduće infekcije, odnosno sve dok je imunostni sustav kadar prepoznati slične proteine šiljka. Međutim, što ako u genetičkom kodu virusa dođe do mutacije šifre za sintezu proteina šiljka? Mutacije mogu dovesti do značajne promjene strukture i morfologije proteina šiljka, na koje imunostni sustav neće imati odgovor. Tim više zabrinjava što je SARS-CoV-2 vrlo podložan mutaciji, osobito u domeni DNK odgovornog za kodiranje proteina šiljka.¹⁷

Stoga je izgledno da će u skorašnjoj budućnosti biti potrebno modificirati cjepiva, s obzirom na brzu stopu mutacije SARS-CoV-2, što u slučaju mRNA cjepiva nije toliko problematično jer je njihov razvoj brz u odnosu na rekombinantna DNK cjepiva. No to za sobom povlači čitav niz logističkih poteškoća te ne nudi trajno rješenje. Da nije sve tako crno, pobrinut će se vjerojatno tehnologija CRISPR-Cas, o kojoj je bilo govora u Tehnološkim zabilješkama u dvobroju 3-4 vol. 69. izdanja KUI-ja. Taj izvanredan imunostni alat bakterija, konkretno protein Cas13, može prepoznati virusne genetičke sekvencije i efektivno ih razrezati u komadiće, čime kodiranje novih replikanata virusa postaje ne-

* Doc. dr. sc. Marin Kovačić
e-pošta: mkovacic@fkit.hr



Slika 1 – Šiljak virusa SARS-CoV-2 sastavljen je od trimera proteina, a mutacija u jednom od tri proteina šiljka (naznačeno kružićem) rezultira otvorenom konformacijom veće infektivnosti (desno)¹⁶

moгуće. *Fareh i sur.*¹⁸ upravo su u tu svrhu pripremili protein Cas13b te su ispitali njegovu učinkovitost u suzbijanju infekcije SARS-CoV-2 u staničnim kulturama *in vitro*, u kojima je pokazao iznimno veliku učinkovitost (> 90 %). Ispitali su osjetljivost proteina Cas13b prema mutacijama u genetičkoj šifri virusa, pri čemu su ustanovili da Cas13b prepoznaje i mutirane sekvencije, čime učinkovito uništava novi soj prije nego je on dobio priliku za prijenos. Nadalje, znanstvenici smatraju da je potreban velik broj simultanih mutacija u genomu virusa u tolikoj mjeri da izbjegavanje imunosti od Cas13b praktički nije moguće. S obzirom na to da su mutacije u šifri za proteine šiljka najučestalije, moguće je ciljati na sekvencije koje se odnose na izgradnju kapside virusa, čime bi se stabilnost tog alata još više povećala. Temeljem svega

šest jedinstvenih sekvencija koje bi Cas13b prepoznao, moguće je učinkovito spriječiti replikaciju 90 % poznatih koronavirusa.

Vjerojatno se čini optimistično predviđanje da će tehnologija CRISPR-Cas omogućiti iskorjenjivanje ne samo SARS-CoV-2 već i čitavog niza drugih virusnih oboljenja pa možda čak i karcinoma. Međutim, ako i dođe do takvih pomaka u istraživanjima, izgledno je da će se biotehnologija suočiti s još većim i žesćim otporima. Nadajmo se da će se za blagodati skorašnje CRISPR revolucije moći primijeniti parafrazirana anglosaksonska posloviца “vidjeti znači vjerovati” (engl. *seeing is believing*) te da ćemo moći objeručke prigrliti trajno rješenje ne samo za COVID-19 već i brojne druge bolesti.

Literatura

- URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00728-2> (18. kolovoza 2021.).
- URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-02948-4> (18. kolovoza 2021.).
- URL: <https://theconversation.com/covid-19-herd-immunity-its-not-going-to-happen-so-what-next-165471> (18. kolovoza 2021.).
- W. T. Harvey, A. M. Carabelli, B. Jackson, R. K. Gupta, E. C. Thomson, E. M. Harrison, C. Ludden, R. Reeve, A. Rambaut, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, S. J. Peacock, D. L. Robertson, SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape, *Nat. Rev. Microbiol.* **19** (2021) 409–424, doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>.
- O. A. MacLean, S. Lytras, S. Weaver, J. B. Singer, M. F. Boni, P. Lemey, S. L. Kosavosky Pond, D. L. Robertson, Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen, *PLoS Biol.* **19** (2021) e3001115, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001115>.
- URL: <https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html> (18. kolovoza 2021.).
- URL: <https://www.britannica.com/science/variolation> (18. kolovoza 2021.).
- H. Meyer, R. Ehmann, G. L. Smith, Smallpox in the post-eradication era, *Viruses* **12** (2020) 138, doi: <https://doi.org/10.3390/v12020138>.
- Y. Wei, P. Aris, H. Farookhi, X. Xia, Predicting mammalian species at risk of being infected by SARS-CoV-2 from an ACE2 perspective, *Sci. Rep.* **11** (2021) 1702, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80573-x>.
- G. A. Calvet, S. A. Pereira, M. Ogrzewalska, A. Pauvolid-Corrêa, P. C. Resende, W. d. S. Tassinari, A. d. P. Costa, L. O. Keidel, A. S. B. da Rocha, M. F. B. da Silva, S. A. dos Santos, A. B. M. Lima, I. C. V. de Moraes, A. A. V. Mendes Jr., T. d. C. Souza, E. B. Martins, R. O. Ornellas, M. L. Corrêa, I. M. d. S. Antonio, L. Guaraldo, F. d. C. Motta, P. Brasil, M. M. Siqueira, I. D. F. Gremião, R. C. Menezes, Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil, *PLoS ONE* **16** (2021) e0250853, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250853>.
- E. Pritchard, P. C. Matthews, N. Stoesser, D. W. Eyre, O. Gethings, K.-D. Vihta, J. Jones, T. House, H. VanSteenHouse, J. Bell, J. I. Bell, J. N. Newton, J. Farrar, I. Diamond, E. Rourke, D. Studley, D. Crook, T. E. A. Peto, A. S. Walker, K. B. Pouwels, Impact of vaccination on new SARS-CoV-2 infections in the United Kingdom, *Nat. Med.* (in press).
- URL: <https://www.kff.org/policy-watch/covid-19-vaccine-breakthrough-cases-data-from-the-states/> (18. kolovoza 2021.).
- S. A. Rella, Y. A. Kulikova, E. T. Dermitzakis, F. Y. Kondrashov, Rates of SARS-CoV-2 transmission and vaccination impact the fate of vaccine-resistant strains, *Sci. Rep.* **11** (2021) 15729, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95025-3>.
- URL: <https://www.statnews.com/2020/11/10/the-story-of-mrna-how-a-once-dismissed-idea-became-a-leading-technology-in-the-covid-vaccine-race/> (18. kolovoza 2021.).
- N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, mRNA vaccines – A new era in vaccinology, *Nat. Rev. Drug Discov.* **17** (2018) 261–279, doi: <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.
- URL: <https://www.zzzjzpgz.hr/nzl/19/cjepljenja.htm> (18. kolovoza 2021.).
- URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-02544-6> (18. kolovoza 2021.).
- M. Fareh, W. Zhao, W. Hu, J. M. L. Casan, A. Kumar, J. Symons, J. M. Zerbato, D. Fong, I. Voskoboinik, P. G. Ekert, R. Rudraraju, D. F. J. Purcell, S. R. Lewin, J. A. Trapani, Reprogrammed CRISPR-Cas13b suppresses SARS-CoV-2 replication and circumvents its mutational escape through mismatch tolerance, *Nat. Comm.* **12** (2021) 4270, doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24577-9>.