

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Genové vakcíny proti novému typu koronaviru

Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Gene vaccines against a new type of coronavirus

Bachelor Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Lejsková**
Osobní číslo: **C18251**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Genové vakcíny proti novému typu koronaviru**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte teoretickou rešerši zabývající se genovými vakcínami. V úvodní části zmiňte jednotlivé typy těchto vakcín, mechanismus jejich účinku, způsoby podávání do organismu, včetně diskuse o výhodách a nevýhodách jejich použití.
2. Dále popište základní strukturu nového typu koronaviru a uveďte, na jaké jeho cílové molekuly jsou genové vakcíny konkrétně cíleny.
3. Nakonec vypracujte přehled vyvíjených genových vakcín proti novému typu koronaviru, se zaměřením na vakcíny, které byly úspěšně registrovány a zavedeny do praxe ve světě i u nás. Diskutujte aktuální dostupné výsledky v souvislosti s použitím těchto vakcín.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvodte závěry o současném stavu studované problematiky.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Genové vakcíny proti novému typu koronaviru jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 7. 2021

Martina Lejsková v.r.

PODĚKOVÁNÍ:

Zde bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Jankovičové, Ph. D. za odborné vedení, dohled a cenné rady při psaní bakalářské práce.

ANOTACE

Práce je zaměřena na genetické vakcíny proti novému typu koronaviru. Genové vakcíny se dělí na mRNA a DNA. V práci je popsán jejich mechanismus účinku, formy a způsob podání. Dále je zmíněn SARS-CoV-2, jeho struktura, vstup do buňky a reakce organismu na jeho přítomnost. V poslední části práce je uveden přehled vybraných genových vakcín proti SARS-CoV-2 používaných v České republice.

KLÍČOVÁ SLOVA

SARS-CoV-2, COVID-19, genové vakcíny, koronavirus

TITLE

Gene vaccines against new type of coronavirus

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with gene vaccines against new type of coronavirus. Gene vaccines are divided into two types – mRNA and DNA. The thesis describes their mechanism of action, forms and method of application. Subsequently, SARS-CoV-2 with its structure, cell entry and reaction of the organism on its presence is also mentioned. Finally, the thesis includes selected types of gene vaccines against SARS-CoV-2 that are used in Czech republic.

KEYWORDS

SARS-CoV-2, COVID-19, gene vaccines, coronavirus

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	16
1 Genetické vakcíny.....	17
1.1 Genetické DNA vakcíny	18
1.1.1 Plazmidy	20
1.1.2 Způsob podání DNA vakcín	22
1.1.2.1 Elektroporace.....	23
1.1.2.2 Biojektory	23
1.1.2.3 Gene gun.....	23
1.1.2.4 Mikrojeklové pole	23
1.1.3 Forma podání DNA vakcín.....	23
1.1.3.1 Liposomy	24
1.1.3.2 Virosoomy	25
1.1.3.3 Nanočástice.....	25
1.1.3.4 Peptidy pronikající buňkami.....	25
1.2 Genetické RNA vakcíny	26
1.2.1 Rozdělení RNA vakcín	27
1.2.2 Úpravy RNA	28
1.2.3 Podání mRNA.....	29
1.2.4 Vytvoření imunitní odpovědi.....	31
2 Nový typ koronaviru SARS-CoV-2.....	33
2.1 Přehled významných zástupců koronavirů.....	33
2.1.1 SARS-CoV.....	33
2.1.2 MERS-CoV.....	33
2.1.3 SARS-CoV-2	34

2.2	Příznaky COVID-19.....	34
2.3	Přenos COVID-19	35
2.4	Struktura koronaviru	35
2.4.1	Nestrukturální proteiny	36
2.4.2	Hroťový protein (S).....	37
2.4.3	Heptadové repetice	39
2.4.4	Doména vázající receptory	39
2.4.5	RNA-polymeráza-závislá na RNA	40
2.4.6	Hlavní proteáza	41
2.5	Vstup do buňky	41
2.6	Imunitní odpověď.....	42
2.6.1	Vrozená imunitní odpověď.....	42
2.6.2	Adaptivní humorální a buněčná imunitní odpověď	43
2.7	Léčba COVID-19	44
2.7.1	Antivirotika	44
2.7.2	Specifické monoklonální protilátky.....	44
2.7.3	Plazmová transfúze	44
3	Vakcíny proti koronaviru SARS-CoV-2.....	46
3.1	Vývoj vakcín	46
3.2	Genetické vakcíny proti SARS-CoV-2	47
3.2.1	DNA vakcíny	47
3.2.2	mRNA vakcíny	48
3.2.2.1	mRNA-1273 (Moderna)	49
3.2.2.2	BNT162 (BioNTech a Pfizer)	49
3.2.3	Vektorové vakcíny	49
3.2.3.1	AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19, AstraZeneca).....	50
3.2.3.2	Ad26.CoV2.S (Janssen/Johnson & Johnson)	50

3.2.3.3	Sputnik V (Gam-COVID-Vac).....	51
3.3	Ostatní typy vakcín proti SARS-CoV-2.....	51
3.3.1	Inaktivované vakcíny	51
3.3.2	Proteinové vakcíny	52
3.4	Očkování v České republice.....	52
3.5	Účinnost vakcín proti mutacím	54
ZÁVĚR		55
LITERÁRNÍ ZDROJE		56

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Rozdíl mezi konvenčním očkováním a DNA vakcinací:	18
Obrázek 2 – Indukce buněčné a humorální imunity po aplikaci DNA vakcíny:.....	19
Obrázek 3 - Znázornění rozvoje imunitní odpovědi po prezentaci antigenu pomocí APC:.....	20
Obrázek 4 - Struktura plazmidu:	21
Obrázek 5 - Znázornění způsobu dodání a forem dodání DNA vakcín:	22
Obrázek 6 - Schéma exprese antigenu konvenčních a samo-amplifikačních mRNA vakcín:	27
Obrázek 7 - Postup přípravy mRNA z DNA templátu a následné HPLC čištění (vysokoučinná kapalinová chromatografie)	29
Obrázek 8 - LNP (lipidové nanočástice) používané pro dodávání RNA:	30
Obrázek 9 - Vstup mRNA do buňky a následná prezentace antigenů:	32
Obrázek 10 - Struktura SARS-CoV-2	36
Obrázek 11 - Primární struktura S proteinu:	37
Obrázek 12 - Vazebná místa SARS-CoV-2:	39
Obrázek 13 - Interakce mezi ACE2 a RBD u SARS-CoV-2:	40
Obrázek 14 - Znázornění buněčného cyklu koronaviru SARS-CoV-2:	42
Obrázek 15 - Typy vakcín proti koronaviru SARS-CoV-2.	46
Tabulka 1 – Srovnání účinnosti a imunogenicity různých způsobů dodání DNA vakcín:.....	25
Tabulka 2 – Seznam DNA vakcín vyvíjených proti SARS-CoV-2:	47
Tabulka 3 - Aplikované vakcíny proti SARS-CoV-2 v ČR:	53
Tabulka 4 - Proočkovanost v ČR podle věku:.....	53

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACE-2	angiotensin konvertující enzym 2
APC	antigen prezentující buňka
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
BALF	bronchoalveolární lavážní tekutina
Cap	čepička
CCL2	chemokinový ligand 2
CD	doména spojení
CD4+	T lymfocyty CD4 pozitivní
CD8+	T lymfocyty CD8 pozitivní
CLT	cytotoxické T lymfocyty
CNS	centrální nervová soustava
CPP	peptidy pronikající buňkami
CRP	C reaktivní protein
CT	cytoplazmatický očásek
DC	dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová DNA
EP	elektroporace
FP	fúzní peptid
GIT	gastrointestinální trakt
GOI	gen zájmu
HIV	virus lidské imunodeficiency

HR1	heptadová repetice 1
HR2	heptadová repetice 2
HSV	virus Herpes simplex
CH	centrální helix
IFN I	interferon I
IFN α	interferon alfa
IFN γ	interferon gama
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
JIP	jednotka intenzivní péče
kb	kilobáze
LPN	lipidové nanočástice
MGE	mobilní genetické prvky
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
Mpro	hlavní proteáza
mRNA	mediátorová RNA
NP	nanočástice
nsPs	virové nestrukturální proteiny
NTD	N-terminální doména
ORF	otevřený čtecí rámeček
PAMP	molekulární vzory asociované s patogenem

pDNA	plazmidová deoxyribonukleová kyselina
PRR	receptory rozeznávající molekulové vzory
RBD	doména vázající receptor
RC	replikační komplex
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
SAM	samovolně se amplifikující vakcíny
SD1	subdoména 1
SD2	subdoména 2
siRNA	malé interferující RNA
SS	jednoduchá sekvence
TBK1	TANK vazebná kináza 1
TC	transkripce
TcR	receptor na T lymfocytu
Th1	pomocný lymfocyt 1
Th2	pomocný lymfocyt 2
TL	translace
TLR	Toll-like receptor
TM	transmembránová doména
TM2	transmembránová doména 2
TMPRSS2	transmembránová serinová proteáza 2
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
UTR	ohraničený nepřeložený region
VLP	virus-like particles

WHO

Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

V této bakalářské práci jsou shrnuty informace o genetických vakcínách, jak obecné, tak specializující se na nový typ koronaviru. Vakcinací proti různým druhům patogenů dochází k vytvoření imunitní obrany, která při napadení reaguje rychleji, než kdyby se organismus setkal s patogenem poprvé. Genetické vakcíny můžeme dělit na DNA a RNA. U DNA vakcín se nukleová kyselina musí začlenit do jádra, aby došlo k vytvoření proteinů, které budou stimulovat imunitní systém [Ghaffarifar F, 2018]. Zatím není žádná oficiální DNA vakcína, která by se podávala lidem [Jorritsma SHT, 2016]. U RNA vakcín se využívá mRNA, která vstoupí do buňky a na ribozomech dojde k vytvoření peptidů, které se budou prezentovat na povrchu buňky a aktivovat imunitní systém. U mRNA vakcín tedy nemusí dojít k začlenění nukleové kyseliny do jádra [Reichmuth AM, 2016].

Nový typ koronaviru SARS-CoV-2 napadá respirační trakt a způsobuje onemocnění COVID-19. Objevil se v roce 2019 a rozšířil se do celého světa [Hu B, 2021]. Koronavirus vstupuje do buňky pomocí S proteinu, který se navazuje na receptory hostitele. V buňkách hostitele dochází k replikaci genomu, následně vznikají kopie viru, které se dále šíří organismem [V'kovski P, 2021]. Nemoc se projevuje především horečkou, únavou, suchým kašlem, bolestí hlavy a dušností [Canedo-Marroquín G, 2020].

V současné době probíhá plošná vakcinace proti nemoci COVID-19 s cílem dosáhnout tzv. kolektivní imunity považované za nejefektivnější způsob, jak dlouhodobě zastavit šíření pandemie tohoto onemocnění u nás i ve světě. Vakcíny proti SARS-CoV-2, které se používají v České republice, jsou od firmy Moderna, BioNTech/Pfizer AstraZeneca a Johnson a Johnson. Diskutovány jsou dále vakcíny Novavax či CureVac [Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra České republiky, 2020]. Jednotlivé typy vakcín jsou v práci blíže popsány.

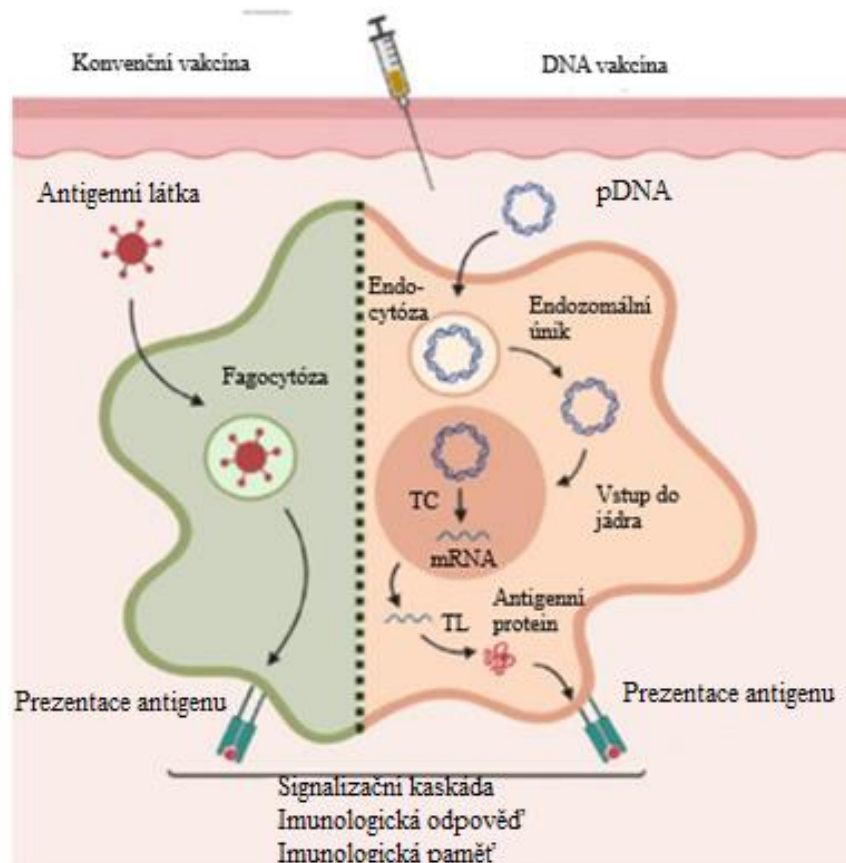
1 Genetické vakcíny

Vakcinace (očkování) je aplikace vakcíny (očkovací látky), po které dochází v organismu k tzv. imunizaci, vedoucí k vytvoření imunity proti danému mikroorganismu. V těle dochází k rozpoznání cizích buněk pomocí antigenů, následuje imunitní odpověď a vytvoření paměťových lymfocytů a specifických protilátek. Pomocí očkování jsou udržovány četné bakteriální a virové nemoci pod kontrolou. Používáním vakcín byl například zcela odstraněn virus planých neštovic a snížen výskyt obrny, spalniček a dalších nemocí [Pardi N, 2018]. Se zvyšující se odolností patogenů vyžadují způsoby očkování stále náročnější technologické postupy. Některé vakcíny nejsou schopné vyvolat potřebnou imunitní odpověď vůbec, například vakcína proti malárii, viru lidské imunodeficiencie (HIV) nebo viru Herpes simplex (HSV) [Fruk L, 2020].

Tradiční očkování pomocí oslabeného, neaktivního nebo usmrceného mikroorganismu/patogenu, polysacharidů, proteinů nebo syntetických peptidů pomáhá proti mnoha bakteriálním a virovým nemocem. U vakcín s oslabeným patogenem existuje riziko vzniku virulentního viru [Pachuk CJ, 2000; Shedlock DJ, 2000; Reichmuth AM, 2016]. U jedinců s nedostatečnou nebo oslabenou imunitou se doporučuje nepodávat oslabené vakcíny, ale pouze podjednotkové vakcíny, které ale nejsou tak účinné [Reichmuth AM, 2016].

Genetické vakcíny jsou novou kategorií vakcín a podává se u nich jeden nebo několik funkčních aktivních genů kódujících antigeny patogenů, které navozují tvorbu buněčné i humorální imunity proti příslušnému mikroorganismu [Tutykhina IL, 2011].

V roce 1998 se uskutečnil první pokus o genetickou vakcínu pro lidi, která byla proti HIV. Aktuálně probíhá mnoho klinických testů na vyvinutí genetické vakcíny proti různým druhům rakoviny, autoimunitním chorobám, infekčním nákazám, HPV viru, HIV viru, žlutence typu B a koronaviru [Fruk L, 2020]. V porovnání s proteinovými vakcínami jsou DNA vakcíny stabilnější, vyrábějí se snadněji i jejich výrobní náklady jsou menší a při jejich použití jsou bezpečnější na manipulaci [Hobernik D, 2018] [Lee J, 2018]. Nevýhoda v porovnání s konvenčními vakcínami může být, že DNA vakcíny mají nízkou imunogenicitu, což by znamenalo aplikaci více dávek [Lee J, 2018]. Základní rozdíl při podání tradičních a genetických vakcín je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1- Rozdíl mezi konvenčním očkováním a DNA vakcinací:

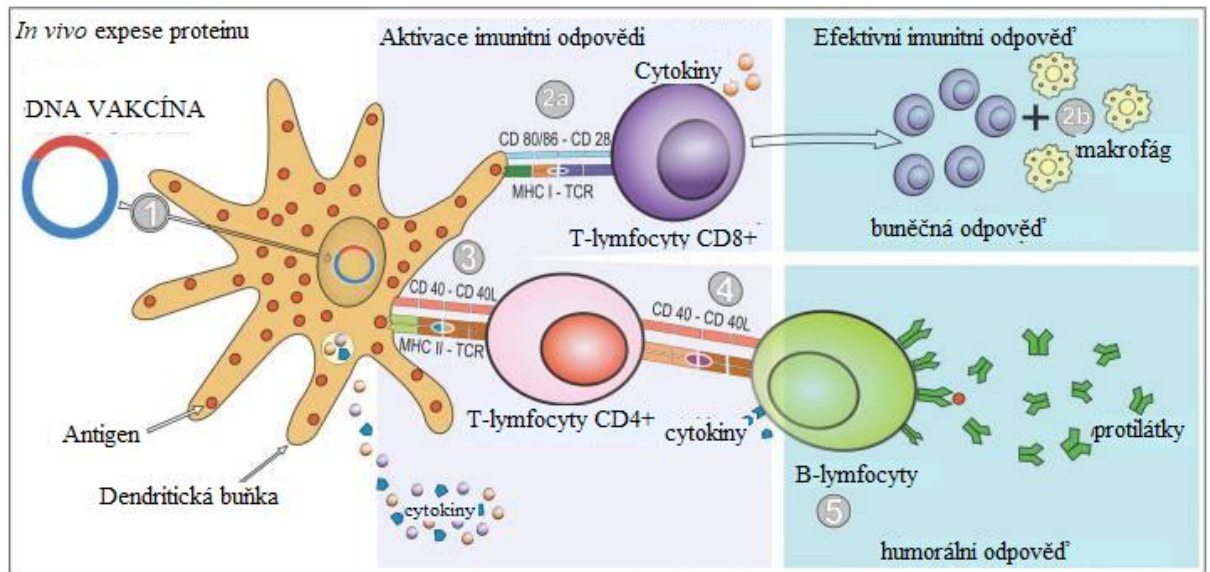
Konvenční očkování vlevo, po zavedení agens do buňky, je rozpoznán patogen imunitním systémem konkrétně antigen prezentujícími buňkami (APC); genová vakcinace vpravo, podaná plazmidová DNA (pDNA) je endocytózou vpravena do buňky, uvolněna v cytosolu a absorbována jádrem, následuje transkripce (TC) a translace (TL), kdy vzniká antigenní protein, který je základem pro prezentaci antigenu na povrchu, u obou cest vakcinace je antigen prezentován na povrchu buňky, to vede k následné kaskádové reakci imunitního systému a vytvoření imunologické paměti (převzato, upraveno podle [Fruk L, 2020]).

Genetické vakcíny můžeme rozdělit na DNA vakcíny a RNA vakcíny, které budou blíže popsány v následujících kapitolách.

1.1 Genetické DNA vakcíny

DNA vakcíny indukují adaptivní imunitní odpovědi, to je zobrazeno na obrázku 2. Jsou určeny k transkripci DNA v buňkách, aktivaci CD4⁺ T-lymfocytů, zvýšení indukce cytotoxických T-lymfocytů a produkci protilátek [Ghaffarifar F, 2018]. Po aplikaci vakcíny, se cíleně působí na myocyty, keratinocyty a antigen prezentující buňky (APC). U DNA vakcín se DNA musí začlenit do jádra, kde následuje transkripce a pak v cytoplazmě navazuje

translace. Kódovaný protein je exprimován na buňkách jako antigen a poté může být prezentován prostřednictvím hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), ve spojení s molekulami MHC I. třídy nebo MHC II. třídy [Silveira MM, 2021].



Obrázek 2 – Indukce buněčné a humorální imunity po aplikaci DNA vakcíny:

1. krok: imunizace buňky, vstup plazmidu do jádra a jeho následná transkripce a translace. 2a krok: aktivace T-lymfocytů CD8+ endogenně exprimovanými antigeny, prezentovanými na molekulách MHC I. třídy. 2b krok: CD8+ stimuluje uvolňování cytokinů, dochází k inhibici replikace virů a zvyšuje se exprese molekul MHC I. třídy, makrofágy jsou aktivovány na podporu imunitní odpovědi.

3. krok: aktivace pomocných T lymfocytů CD4+, která se spouští pomocí MHC II. třídy na povrchu APC. 4. krok: vylučované vakcinační proteiny jsou rozpoznány B lymfocyty. 5. krok:

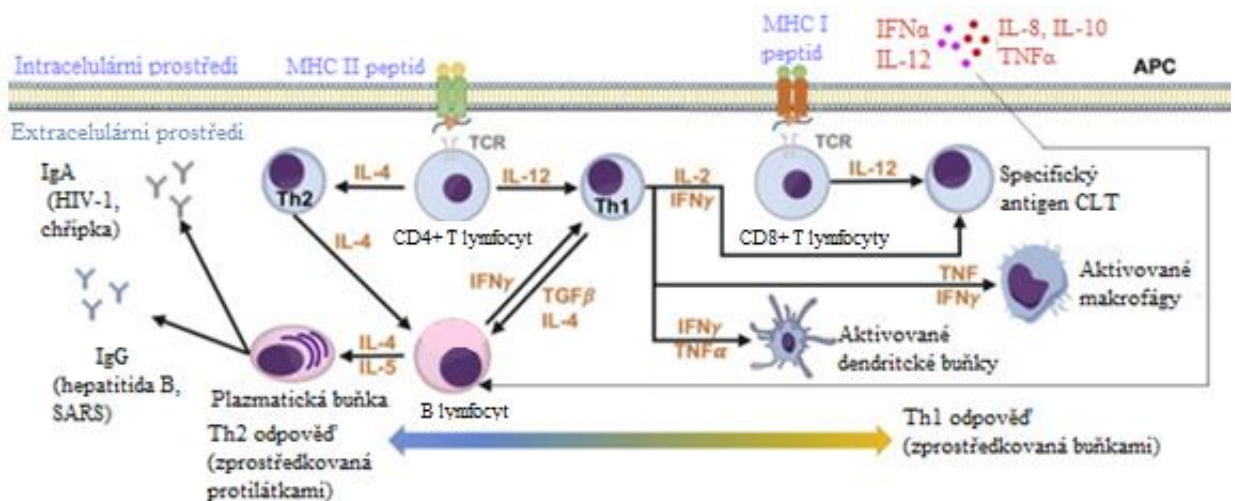
vznikají aktivované protilátky na ochranu před onemocněním

(převzato, upraveno podle [Silveira MM, 2021]).

Buňka, která má na povrchu antigen, migruje do lymfatické uzliny a zde dochází k předání informací pomocným T lymfocytům, které jsou na povrchu CD4+. Spojením receptoru a antigenu vzniká imunokomplex. CD4+ na T lymfocytech mají hlavní podíl na řízení imunitní odpovědi a podporují další účastníky imunitní reakce. Aktivují B lymfocyty a cytotoxické T lymfocyty [Fruk L, 2020].

Imunizace DNA vakcínou dále aktivuje prozánětlivé cytokiny a chemokiny. Dendritické buňky produkují interleukin-10 (IL-10), IL-12, a TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa), dochází k indukci buněčné odpovědi aktivací CD8+ T-lymfocytů a IL-4 se podílí na aktivaci CD4+ T-lymfocytů [Silveira MM, 2021]. Nezralé CD8+ a CD4+ T lymfocyty po aktivaci začnou proliferovat, v důsledku produkce IL-2, růstových a diferenciačních faktorů. CD8+ T lymfocyty klonálně expandují, aby se zvýšil počet cytotoxických T lymfocytů. CD4+

T lymfocyty se začnou diferencovat na pomocné T lymfocyty a ty produkují IL-2, IL-4 a IFN γ (interferon gama) [Fruk L, 2020]. Celé ovlivnění imunitní odpovědi je zobrazeno na obrázku číslo 3.



Obrázek 3 - Znáznornění rozvoje imunitní odpovědi po prezentaci antigenu pomocí APC:

MHC (hlavní histokompatibilní systém), IFN α (interferon alfa), IL (interleukin), TNF α (tumor nekrotický faktor alfa), TcR (receptor na T lymfocytu), Th1 (pomocný lymfocyt 1, imunitní odpověď je zprostředkovaná buňkami), Th2 (pomocný lymfocyt 2, imunitní odpověď zprostředkovaná protilátkami), CLT (cytotoxický T lymfocyt), IgA (imunoglobulin A), IgG (imunoglobulin G) (převzato, upraveno podle [Lee J, 2018]).

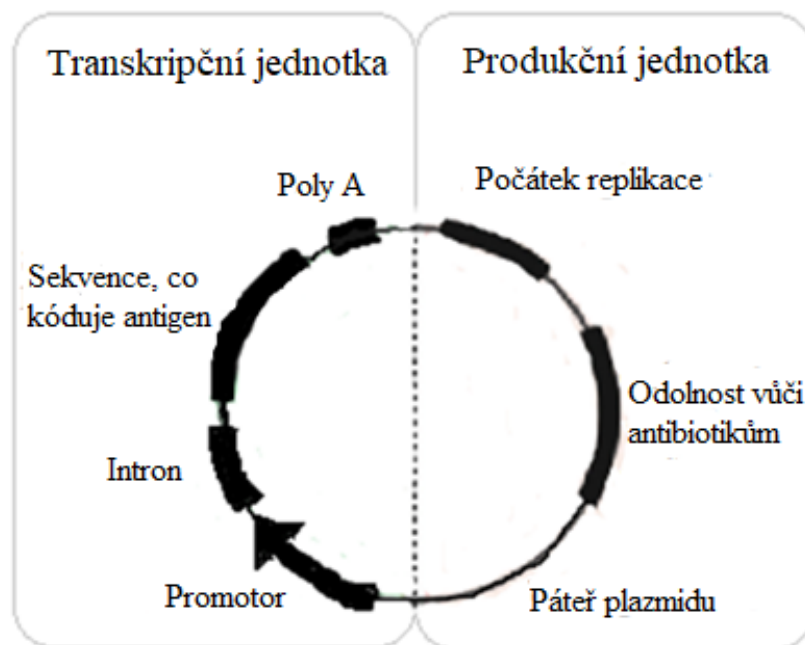
Dosud nebyla schválena žádná vakcína DNA pro použití u lidí. Hlavní překážkou pro použití DNA vakcín je nedostatečná genová exprese a nízká aktivace imunitního systému. Problém je, že nahá DNA je *in vivo* neúčinná a při injekčním podání zůstává v extracelulárním prostoru [Jorritsma SHT, 2016]. To může být ovlivněno aplikací DNA ve formě plazmidu či volbou jiného způsobu podání.

1.1.1 Plazmidy

Plazmidy jsou extrachromozomální genetické nosiče klasifikované jako mobilní genetické prvky (MGE) a slouží k horizontálnímu přenosu genů u bakterií. Jsou schopné samoreplikace. Plazmidy jsou variabilní, většinou kruhové molekuly nesoucí geny poskytující za určitých podmínek selektivní výhodu hostiteli. Ústřední vlastností MGE plazmidů je získání a šíření rezistence na antibiotika a také mohou mít roli při přenosu rysů virulence [Jesus TF, 2019]. Obecně plazmid obsahuje složky, které umožňují selekci a šíření vektoru

v *Escherichia coli* [Rauch S, 2018]. DNA vakcína je složena z plazmidu z bakterií, který kóduje požadovaný protein (antigen) [Silveira MM, 2021].

Do plazmidů je vložena požadovaná sekvence patogenního proteinu. Sekvence plazmidové DNA (pDNA) se skládá z expresní (transkripční) a produkční jednotky. Transkripční část obsahuje virově hybridní nebo eukaryotické promotorové oblasti, intron, sekvenční kódující antigen a poly-A konec. Promotorová oblast vytváří vazebné místo pro RNA polymerázu a řídí tak transkripci plazmidu na mRNA. Nejběžnější promotor je z lidského cytomegaloviru (CMV), protože ovlivňuje expresi antigenu v různých buňkách. Virové promotory jsou rychle deaktivovány pomocí umlčovacích genů a vykazují přechodnou genovou expresi. Intronová sekvence je v plazmidu mezi promotorem a oblastí antigenu. Introny jsou nekódující oblasti plazmidu, které zvyšují účinnost exprese antigenu. Za intronem následuje oblast, kde je kódovaný antigen, ze kterého vzniká požadovaný protein. Na konci je poly-A konec, který stabilizuje transkripty mRNA a usnadňuje jejich export z jádra. Produkční část je složena ze sekvence počátku replikace a genu rezistence na antibiotika [Fruk L, 2020]. Struktura plazmidu je ilustrativně znázorněna na obrázku č. 4.



Obrázek 4 - Struktura plazmidu:

Transkripční a produkční jednotka (převzato, upraveno podle [Fruk L, 2020]).

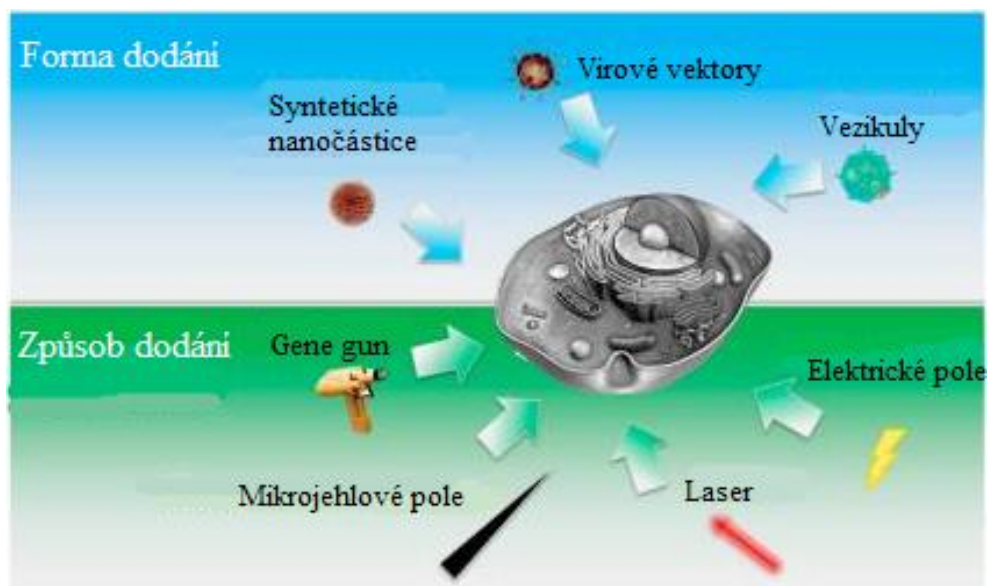
DNA plazmid kódující požadovaný protein se vstříkuje do svalu nebo do kůže. Dále vstupuje do hostitelských buněk a řídí syntézu jeho polypeptidového antigenu. Jakmile vznikne antigen a je prezentován buňkami, je vyvolána buněčná a humorální imunitní

odpověď. Aktivitu plazmidu lze částečně zvýšit pomocí opakovaných imunostimulačních motivů v páteři vektoru, které imunitní systém rozpozná jako cizí. Příkladem mohou být opakovaná imunostimulační nemetylovaná CpG místa iniciující vrozenou imunitní odpověď. Imunostimulačně působí dále například podání DNA plazmidu jehlou, kdy dojde k lokálnímu podráždění a stimuluje se imunitní odpověď [Shedlock DJ, 2000].

1.1.2 Způsob podání DNA vakcín

Vakcinace dělíme podle způsobu podání na intradermální, subkutánní, intravenózní a intramuskulární injekce s různou hloubkou penetrace kůže. Primárně se injekce zaměřují na myocyty, keratinocyty a buňky prezentující antigen (APC) [Hobernik D, 2018].

Způsob podání obecně ovlivňuje účinnost vakcinace. Intradermální podání je považováno za účinnější než intramuskulární nebo subkutánní podání, kvůli husté síti dendritických buněk (DC) přítomné v dermis. Dendritické buňky jsou nejučinnější antigen prezentující buňky *in vivo*. Jsou klíčové pro imunizaci T buněk, zejména CD8+ [Jorritsma SHT, 2016]. Intravenózní aplikace se provádí s cílem dodat DNA plazmidy do antigen prezentujících buněk v sekundárních lymfatických orgánech [Fruk L, 2020]. DNA mohou být podávány dále přes slizniční bariéry, a to orální nebo nazální cestou, protože většina patogenů je na slizničních površích [Jorritsma SHT, 2016]. Dojde tak k vyvolání imunity na sliznicích i v celém těle. Imunizace na sliznicích je považována za účinnou proti virům, protože hostitelská infekce je primárně vyvolávána vstupem přes slizniční povrchy. Pro zvýšení účinnosti DNA vakcín jsou využívány různé způsoby aplikace např. elektroporace, gene gun, mikrojechlové pole, aj. [Ghaffarifar F, 2018]. Tyto postupy jsou znázorněny na obrázku číslo 5.



Obrázek 5 - Znázornění způsobu dodání a forem dodání DNA vakcín:

Na zeleném pozadí je znázorněno, jakým způsobem můžeme dodávat vektory do buňky. Na modrém pozadí máme zobrazeny některé formy dodání (převzato, upraveno podle [Shi, J, 2018]).

1.1.2.1 Elektroporace

Pomocí elektrického impulzu dojde na buněčné membráně k vytvoření přechodných pórů a dochází ke zvyšování kinetiky absorpce pDNA do buněk *in situ* v elektrickém poli [Lee J, 2018]. Míra sorpce DNA záleží na napětí, délce a počtu pulzů a kombinaci pulzů [Jorritsma SHT, 2016].

Na buněčné membráně je rozdíl elektrických potenciálů za fyziologických okolností okolo hodnoty 0,07 V, když dojde ke zvýšení toho rozdílu a transmembránový potenciál přes lipidovou dvouvrstvu bude mít prahové hodnoty (okolo 1 V), začnou se lipidové molekuly uvnitř membrány přemisťovat a vytvářet malé hydrofobní otvory. Podle typů článku, délky, elektrického impulzu a intenzity může být elektroporace (EP) reverzibilní nebo ireverzibilní [Shi, J, 2018].

1.1.2.2 Biojektory

Biojektory se používají pro dodání léků přes kůži. Za vysokého tlaku CO₂ a přes malý otvor v Biojektoru je vpravena požadovaná látka do těla. Průnikem přes kůži může docházet k vytvoření většího množství protilátek a buněčné imunity [Jorritsma SHT, 2016].

1.1.2.3 Gene gun

DNA částice jsou v tomto případě potažené zlatem a obvykle se podávají intradermálně, přes sliznice nebo přímo do orgánů s použitím plynové tlakové pistole. Tento nástroj obsahuje jehlu. Umožňuje to účinnější podání vakcíny do intracelulárního prostředí [Lee J, 2018]. Zlaté částice prostoupí buněčnou membránou lépe než nahé plazmidové DNA [Jorritsma SHT, 2016].

1.1.2.4 Mikro Jehlové pole

Mikro Jehlové pole jsou náplasti s mikroskopickými jehlami k propíchnutí pokožky s menší fyzickou bolestí [Jorritsma SHT, 2016].

1.1.3 Forma podání DNA vakcín

Podání nahé DNA postrádá hlavní rysy žádoucí pro masivní imunizaci, jako je stabilita *in vivo*, specifické cílení, vysoká absorpce buněk a modulace imunitního systému

[Fruk L, 2020]. Ve skutečnosti se očekává, že DNA zůstane v interfibrilárním prostoru a bude rychle degradována endogenními endonukleázami [Jorritsma SHT, 2016]. Pro zlepšení podání nebo zvýšení imunogenicity DNA vakcín se používají biologické vektory (víry, bakterie), které v sobě mohou mít zabudovanou sekvenci patogenního proteinu. Mohou také kódovat vhodné adjuvans [Jorritsma SHT, 2016]. Adjuvans jsou organické nebo anorganické vakcínové přísady např. hliníkové soli ve vakcínách proti hepatitidě. U DNA vakcín byl například jako adjuvans použit NP chitosan polymer na bázi methakrylátu. To vedlo ke stabilizaci a také k vyšším hladinám protilátek. Sekvence CpG je také považována za adjuvans. Je složena z krátké syntetické jednovláknové sekvence DNA, kde je nejvíce zastoupen cytosin a guanin. CpG se vyskytuje v bakteriálním genomu, když je tato sekvence vložena do obratlovců je rozpoznána jako cizí a vzniká na ní silná imunitní odpověď [Fruk L, 2020].

Účinnost DNA vakcín lze zvýšit i pomocí kombinace DNA s vhodnými nosiči, které zvyšují stabilitu plazmidu, genovou expresi a imunitní reakci [Fruk L, 2020]. Nosiče DNA zajišťují integritu pDNA, jsou vybaveny funkčními skupinami, které slouží ke stabilitě. Nosiče, které se používají, jsou liposomy, polymery, virozomy, peptidy pronikající buňkami (CPP) a živé bakterie. V poslední době se ukázaly jako vhodné nosné materiály biopolymery, které významně zvýšily potenciál formulací DNA vakcín [Fruk L, 2020].

Překážkou při doručení pDNA vázané na nosič jsou biologické bariéry. Biologické bariéry na extracelulární úrovni jsou rychlá clearance pro cizí materiál z krevního řečiště, deaktivace sérovými proteiny nebo degradace DNA DNAasou. DNA se fagocytózou, pinocytózou nebo endocytózou dostane přes buněčnou membránu a následně přechází z cytoplazmy fagocytózou nebo endozomálními váčky do jádra. V jádře je potřeba disociace od nosiče, aby mohlo dojít k expresi doručenoého antigenu [Fruk L, 2020].

1.1.3.1 Liposomy

Liposomy jsou malé lipidové váčky, které jsou vytvořeny interakcemi mezi hydrofobními lipidovými konci a hydrofilními lipidovými hlavičkami. Tyto části mohou obalit DNA a vytvořit kapsuly. Liposomy odolávají extracelulární degradaci a interakcí s buněčnou membránou je možné zvýšit transfekci DNA do dendritických buněk [Jorritsma SHT, 2016].

1.1.3.2 Virosoomy

Jsou vezikuly podobné liposomům, ale místo lipidů obsahují proteiny virového obalu. Obal opět obaluje DNA molekulu, která je pomocí virosomu přepravena do cílové buňky. Díky tomu, že jsou podobné virům, dokáží se ochránit před degradací a fúzí. Jsou imunogenní více jak liposomy právě proto, že obsahují několik virových proteinů [Jorritsma SHT, 2016].

1.1.3.3 Nanočástice

Ke zhuštění DNA do nanočástic se používají biologicky odbouratelné polymery. Nanočástice mohou být použity k efektivnímu a bezpečnému dodání DNA do buněk, to vede ke stabilní expresi kódovaného antigenu [Jorritsma SHT, 2016].

Nanotechnologie umožnila začlenit do nanočástic imunostimulační proteiny a proteiny pronikající buňkami. Existují ještě nanočástice superparamagnetické, které se využívají u DNA vakcín [Jorritsma SHT, 2016]. Superparamagnetické částice jsou oproti jiným způsobům dodávání odolnější proti trávení, mají vyšší nosnou kapacitu DNA, nízké náklady na pořízení, řídí stabilní a efektivní expresi cílových genů při vystavení vnějšímu magnetickému poli. Magnetofekce je metoda, při které dochází k absorpci genových vektorů spojených s magnetickými nanočásticemi do cílových buněk za pomoci magnetického pole. Superparamagnetické nanočástice jsou nejčastěji z Fe_3O_4 , které jsou potažené polyethyleniminem [Wang Y, 2014].

1.1.3.4 Peptidy pronikající buňkami

Peptidy pronikající buňkami (CPP) jsou malé peptidy, které vážou DNA a pronikají (penetrují) do buňky a intracelulárně dodávají DNA [Jorritsma SHT, 2016].

Imunogenicita způsobů a forem dodání DNA vakcín je shrnuta v tabulce 1.

Tabulka 1 – Srovnání účinnosti a imunogenicity různých způsobů dodání DNA vakcín:

Jedno + označuje, že účinnost nebo imunogenicita se rovná konvenčnímu podáváníí. ++ nebo +++ je relativním indikátorem zvýšení účinnosti nebo imunogenicity ve srovnání s konvenční aplikací. N/A znamená, že nebyla k dispozici žádná data (převzato, upraveno podle [Jorritsma SHT, 2016]).

Způsob dodání	Účinnost dodání <i>in vitro</i>	Účinnost dodání <i>in vivo</i>	Buněčná imunita	Humorální imunita
Konvenční	+	+	+	+

Biojektor	N/A	+++	+++	+++
Gene gun	+++	+++	++	+++
Mikro Jehlová pole	N/A	+	+	+
Elektroporace	+++	+++	+++	++
Liposomy	+++	++	++	+++
Virosomy	+++	+++	+++	+++
Polymerní nanočástice	+++	+++	+++	+
Superparamagnetické nanočástice	+++	N/A	N/A	N/A
Buněčné penetrační peptidy	+++	+++	+++	+++

1.2 Genetické RNA vakcíny

RNA vakcíny vykazují stejné vlastnosti jako konvenční vakcíny. Indukují také humorální a buněčnou imunitu. Vakcíny mRNA se dodávají do cytosolu, kde kódují antigen a to vede k syntéze epitopů transferovaných buněk. Dochází k prezentaci exogenních a endogenních antigenů a aktivují se T lymfocyty [Reichmuth AM, 2016].

DNA a mRNA vakcíny mají hodně podobného, ale hlavním rozdílem je cílové umístění pro dodávání oligonukleotidů. DNA se musí dostat do jádra, zatímco mRNA se musí dostat do cytosolu. Proto jsou mRNA bezpečnější a lépe se dodávají, protože nemusí projít přes jadernou membránu. Dostane-li se mRNA do jádra, neintegruje se a nemění genom. mRNA představuje minimální genetickou informaci, je pouze přechodně exprimována, dokud není degradována. V mRNA může být zapsáno více proteinů, které mají odlišné fyzikální i chemické vlastnosti, fytochemické vlastnosti jsou nejspíše stejné. mRNA tvoří základ pro antigeny, modulátory a buněčné signální faktory v jedné molekule, dále se mRNA váže na receptory rozpoznávající vzor. Ve srovnání s jinými vakcínami, jsou mRNA vakcíny levné, rychlé a snadné na přípravu [Reichmuth AM, 2016].

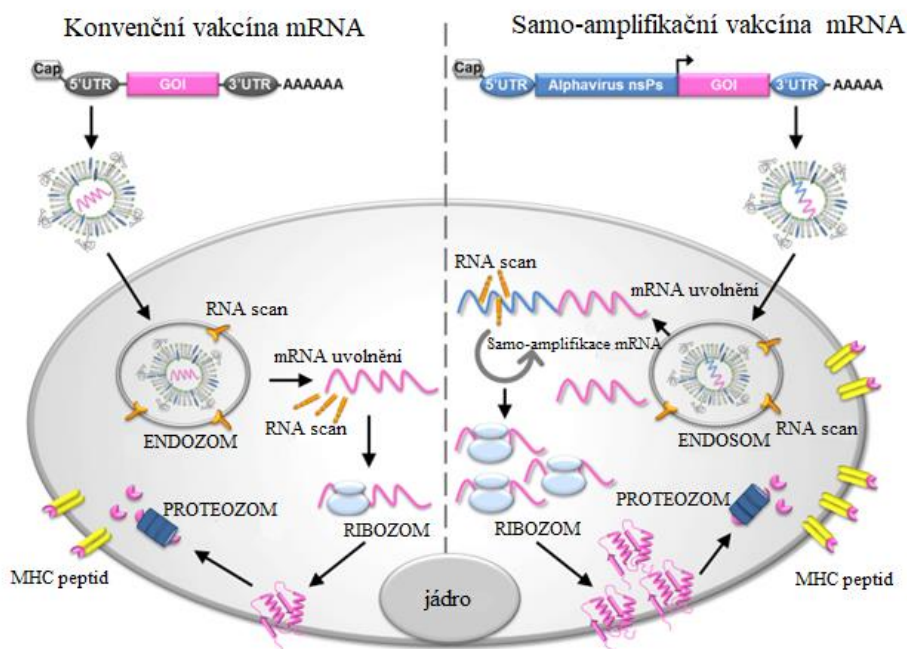
Další rozdíl mezi mRNA a DNA vakcínami je indukce syntézy antigenů v transferovaných buňkách, aktivace imunitní odpovědi, protilátek, Th1 pomocných CD4+ T lymfocytů a cytotoxických CD8+ T lymfocytů [Reichmuth AM, 2016].

Vývoj mRNA vakcíny začíná identifikací antigenu, který je na patogenu. Příslušný gen je sekvenován, syntetizován a klonován do templátového plazmidu DNA. mRNA je transkribována *in vitro* a připravena k vakcinaci. mRNA *in vivo* se přeloží do cílového antigenu, čímž napodobuje virovou infekci, dochází k humorální a buněčné imunitní odpovědi [Maruggi G, 2019].

1.2.1 Rozdělení RNA vakcín

RNA vakcíny dělíme na dva typy, konvenční vakcíny na bázi mRNA a samovolně se amplifikující vakcíny mRNA (SAM). Obě vakcíny používají translační aparát hostitelských buněk k produkci cílového antigenu a spuštění imunitní odpovědi [Iavarone C, 2017].

Konvenční vakcíny mRNA jsou koncepčně podobné molekulám mRNA hostitelských buněk a kódují pouze požadovaný antigen ohraničený 5' a 3' UTR [Iavarone C, 2017] [Maruggi G, 2019]. SAM vakcíny kódují genom upraveného RNA viru, odvozený od alfa-virové jednovláknové pozitivní molekuly RNA [Kowalski P, 2019] [Iavarone C, 2017], který kromě antigenu zahrnuje také virový replikační aparát pro amplifikaci RNA, potřebnou pro expresi antigenu (viz obrázek 6) [Maruggi G, 2019].



Obrázek 6 - Schéma exprese antigenu konvenčních a samo-amplifikačních mRNA vakcín:

Cap – čepicka, GOI – kódující sekvence sledovaného antigenu – gen zájmu, která je ohraničená 5' a 3' UTR – terminální 5' cap strukturou a 3' poly (A) koncem. Po vstupu do buňky je mRNA uvolněna

z endozomu a přeložena na ribozomu. Vytvořený protein je zpracován v proteosomu a po uvolnění z proteosomu je prezentována na povrch buňky (převzato, upraveno podle [Maruggi G, 2019]).

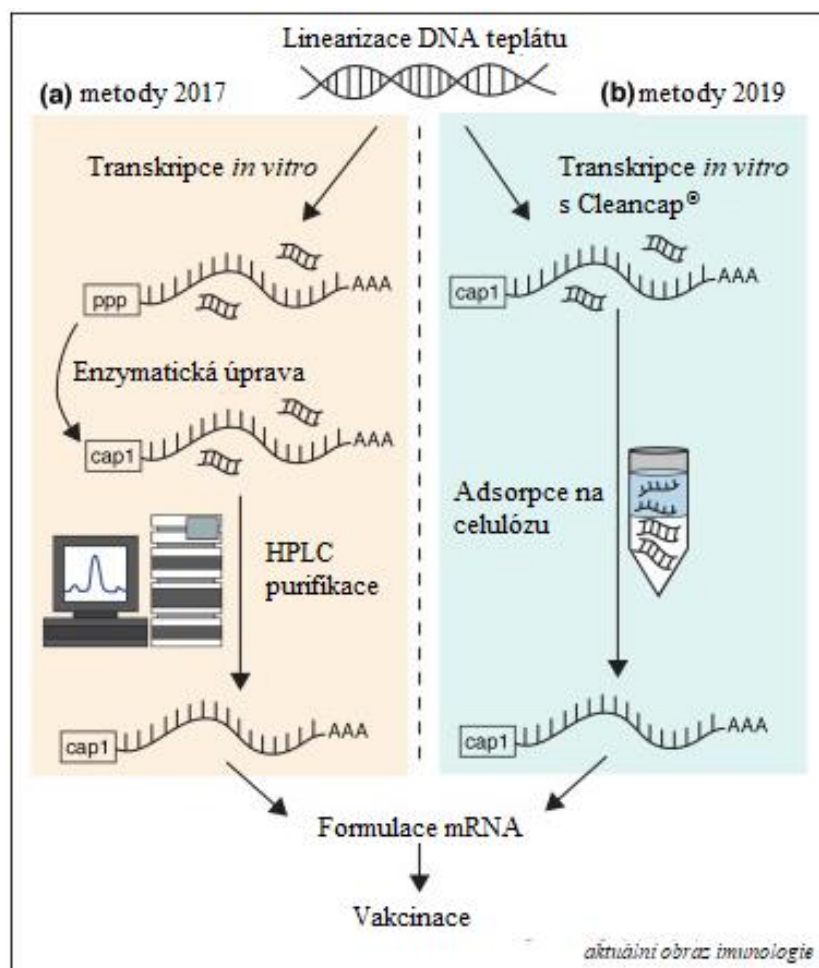
1.2.2 Úpravy RNA

Aby RNA přežila v cytoplazmě, musí obsahovat poly-A-konec, kódující a nekódující sekvence, které jsou složeny z nukleotidových bází [Iavarone C, 2017]. Do RNA se také vkládají modifikované nukleosidy (modifikace uridinu), což optimalizuje nukleotidy [Pardi N, 2020].

Templát pDNA musí obsahovat sekvenci, kde bude kódovaný promotor s vysokou vazebnou afinitou k DNA dependentní RNA polymeráze a také sekvenci kódující mRNA vakcínu. pDNA je *in vitro* linearizována restrikcí enzymem a jako templát je DNA-dependentní RNA polymerázou transkribována. Templátová DNA se následně degraduje inkubací s DNázou a na 5' konec mRNA je přidána enzymaticky čepička [Maruggi G, 2019].

Eukaryotické mRNA i virové RNA na 5' konci (5'UTR) mají čepičku z methylguanosu. Metylací vzniká 7-methylguanosa (m7G), který je přidán během transkripce před trifosfátový můstek, zabraňuje předčasné degradaci RNA a je nezbytný pro zránění, export a iniciaci translace mRNA. 2'-O metylace se přidává k 7-methylguanosu a zabraňuje indukci proti exogenní RNA [Iavarone C, 2017].

Dále se pro úpravu mRNA provádí čištění *in vitro*, a to vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), aby se odstranila dvouvláknová RNA (dsRNA). To všechno snižuje toxicitu a zlepšuje translaci mRNA. Dvouvláknová RNA adsorbuje na celulózu. Na obrázku 7 v modré části je zobrazeno čištění, které používá transkripční capping (název metody CleanCap®). Přidává se 5' cap1 k počáteční sekvenci. Výsledek metody je získání čisté mRNA. Předchozí metody čištění používaly enzymatické zakončení nebo přidávaly reakční složky, anebo kroky čištění, mRNA pak obsahovala kontaminující dsRNA, což vedlo k aktivaci vrozené imunity [Pardi N, 2020].



Obrázek 7 - Postup přípravy mRNA z DNA templátu a následné HPLC čištění (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
(převzato, upraveno podle [Pardi N, 2020]).

1.2.3 Podání mRNA

RNA je za fyziologických podmínek vysoce nestabilní. Podávání je ovlivněno cévním systémem, endoteliální bariérou, velikostí molekuly a interakcí mezi molekulou a receptory hostitelské buňky. Molekuly RNA jsou velké, hydrofobní a záporně nabitě. Pro zavádění RNA do buňky je potřeba zaváděcí systém, protože difúze přes membránu je neefektivní [Iavarone C, 2017]. Pro podání RNA bylo vyvinuto několik strategií, např. RNA konjugáty, modifikované RNA, virové vektory, mikročástice nebo nanočástice [Reichmuth AM, 2016].

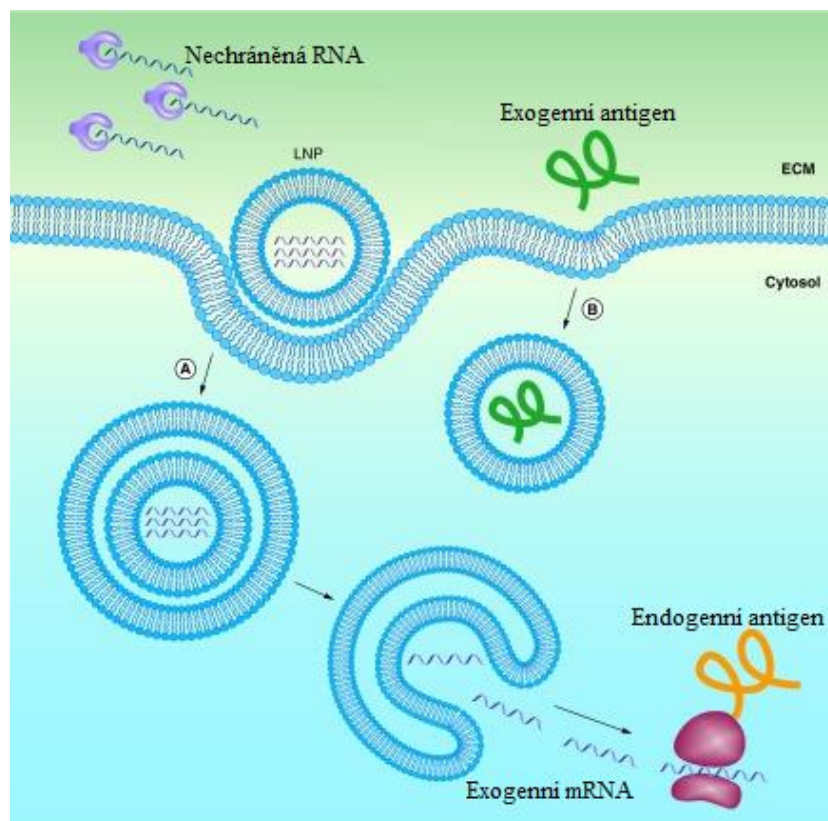
Vektory chrání mRNA před degradací extracelulárními ribonukleázami přítomnými v kůži a krvi [Kowalski P, 2019]. Směřují mRNA do cílových buněk a usnadňují jejich uvolňování do cytoplazmy konečné buňky [Iavarone C, 2017]. Navázání RNA na vektory dále pomáhá podporovat vazbu na sérové proteiny a následnou agregaci.

Virové vektory jsou viry, které nesou nukleovou kyselinu, při jejich vakcinaci

je problém s imunogenicitou nebo dále s karcinogenezí [Reichmuth AM, 2016]. Náhodné vložení vektoru ovlivňuje buňku a mohlo by dojít k zásahu do potenciálně nebezpečných lokusů. Vektorový návrh může snížit počet kopií na buňku, snížení počtu buněk povede k menšímu počtu protoonkogenových interakcí, nebo se může zvýšit proliferační stres buňky modifikované genem. Zde můžou vznikat maligní transformace [Baum Ch, 2006].

Nevirové vektory se stávají preferovanými. Jsou větší než virové vektory, mohly by nést větší obsah genetického materiálu. Pro dodání se používají lipidy, polymery, peptidy a anorganické nanočástice. Mezi nejčastější používané vektory pro dodávání RNA *in vivo* patří lipidové nanočástice (LNP) [Reichmuth AM, 2016].

Polymery pro přenos mRNA jsou modifikované řetězce mastných kyselin, nebo jsou to polymery obsahující lipidy, které účinně cílí na T lymfocyty a vedly k odstranění nádoru u myši. Buněčné penetrační peptidy (CPP) se využívají u mRNA vakcín jen málo, ale nedávno došlo k pokroku, kdy CPP obsahující sekvenci Arg-Ala-Leu-Ala kondenzují mRNA. Kondenzované částice pak narušují membránu a mohou jí pronikat. U myši došlo k silné reakci s cytotoxickými T lymfocyty. Lipidové nanočástice (LNP) jsou ionizovatelné nanočástice obsahující lipidy, původně měly sloužit k dodání siRNA. Vyvolávají trvalou imunitní odpověď proti více infekčním patogenům [Pardi N, 2020]. Jejich vznik je znázorněn na obrázku 8.



Obrázek 8 - LNP (lipidové nanočástice) používané pro dodávání RNA:

LNP chrání mRNA před degradací, zároveň usnadňují endocytózu a endosomální únik. A – mRNA je zapouzdřená do LNP, mRNA musí uniknout z endosomu, aby došlo k translaci, B – vstup exogenního antigenu, extracelulární protein ve vakcínách vstupuje podobně do buňky jako LNP, ale nemusí opustit endosom, aby došlo k prezentaci antigenu na buňce (převzato, upraveno podle [Reichmuth AM, 2016]).

Replikon je další způsob podání RNA vakcín. Je odvozený od různých RNA virů. Amplifikací RNA v cytoplazmě vzniká více mRNA, která kóduje antigeny a vznikají meziproducty jako dsRNA [Ulmer J, 2012]. Replikonu chybí geny virového strukturního proteinu, neprodukují infekční viriony a nešíří se do sousedních buněk. Replikon odvozený od alfa-viru je složen ze dvou sekvencí otevřených čtecích rámců (ORF) ohraničených nepřeloženými regiony (UTR) na koncích 5' a 3'. ORF na 5'-konci kóduje virový polyprotein, který je proteolyticky zpracován na 4 virové nestrukturní proteiny (nsPs) potřebné pro intracelulární amplifikaci [Maruggi G, 2019]. NsP1 je enzym, který katalyzuje reakci pro uzavření virové RNA a pomáhá k přilnutí replikačního komplexu (RC) na hostitelskou membránu. NsP2 má proteázovou aktivitu, pomocí které štěpí polyprotein na jednotlivé nsPs, a aktivitu helikázy odvíjející během replikace RNA. NsP3 je základní součást replikačního komplexu. NsP4 je RNA-dependentní RNA polymeráza, strukturuje RC a syntetizuje doplňkové meziproducty. Druhý ORF je přeložen ze subgenomové RNA a exprimuje antigen, který nahrazuje virový strukturní protein [Iavarone C, 2017].

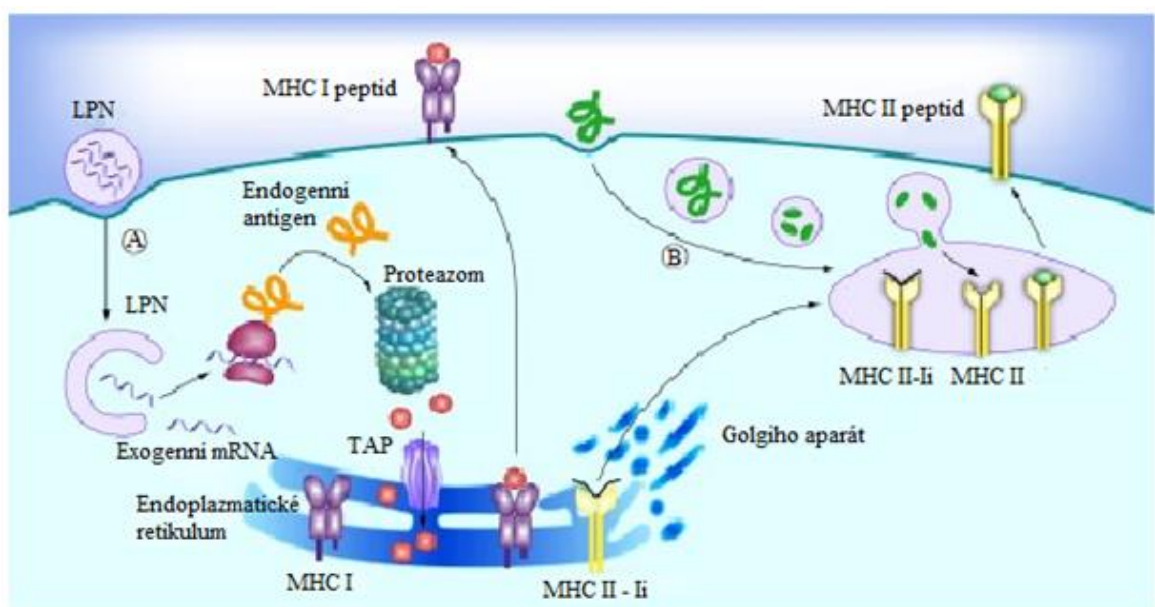
1.2.4 Vytvoření imunitní odpovědi

Aby došlo k produkci antigen-specifické imunitní odpovědi, mRNA z vakcíny se musí dostat do cytosolu buněk a exprimovat antigen. mRNA nahá stejně tak zapouzdřená v liposomu vyvolává vznik antigeně specifické reakce cytotoxických T lymfocytů a protilátkové reakce [Iavarone C, 2017]. Pro mRNA vakcíny jsou hlavním cílem antigen prezentující buňky (APC) a nejdůležitějším buněčným typem jsou dendritické buňky (DC). DC hrají rozhodující roli při zpracování a prezentaci antigenu vedoucí k vyvolání imunitní reakce [Reichmuth AM, 2016].

Transferované DC exprimují mRNA kódovaný antigen v nativní formě. Antigeny jsou zpracovány proteosomem a generované peptidové epitopy vstupují do endoplazmatického retikula, kde jsou navázány na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy I. MHC molekuly třídy I jsou přeneseny na povrch buňky, kde jsou epitopy prezentovány CD8+ T lymfocytům spolu s kostimulačními signály. Prezentace fragmentů antigenu na MHC II. třídy

indukuje vznik antigen specifických protilátek (viz. Obrázek 9). Dráha MHC třídy II může kódovat mRNA antigen, tak signál lysozomálního třídění LAMP1 [Reichmuth AM, 2016].

Interferon I (INF I) ovlivňuje účinnost mRNA vakcín. Jeho škodlivý účinek byl prokázán u samo-amplifikujících mRNA vakcín. Po zamezení aktivity INF receptoru I došlo k vyšší expresi kódovaného proteinu mRNA vakcínou a i antigen-specifické protilátky a imunitní odpovědi CD8+ T lymfocytů [Pepini T, 2017]. Naproti tomu INF I signalizace je potřebná pro protinádorovou imunitu vyvolanou nemodifikovanou vakcínou mRNA [Kranz LM, 2016]. Je pravděpodobné, že INF I bude pro některé typy mRNA vakcín mít negativní dopady, ale pro jiný typ vakcín bude zase potřebný [Pardi N, 2020].



Obrázek 9 - Vstup mRNA do buňky a následná prezentace antigenů:

A) LPN – lipidové nanočástice vypustí mRNA do cytosolu, následuje translace a tyto proteiny jsou degradovány proteosomem na menší peptidy. Ty jsou přeneseny do endoplazmatického retikula, aby byly vloženy do MHC I molekul. Peptidy jsou pomocí MHC I prezentovány na povrchu buňky CD8+ T lymfocytům. B) Protein vstoupil do buňky endocytózou a je prezentován MHC II molekulami.

Molekuly MHC II jsou chráněny invariantním řetězcem (Ii) před vazbou na endogenní peptidy v endoplazmatickém retikulu. Komplex je přenesen do Golgiho aparátu, kde je invariantní řetězec nahrazen antigeny. MHC II se na povrchu buňky prezentuje CD4+ T lymfocytům (převzato, upraveno podle [Reichmuth AM, 2016]).

2 Nový typ koronaviru SARS-CoV-2

Koronaviry jsou z čeledi *Coronaviridae* [Harrison AG, 2020]. V elektronovém mikroskopu mají vidět řetězec s glykoproteinovými špičkami, které vyčnívají z obalu, což je podobné koruně a od toho je odvozen název [Mudgal R, 2020]. Patří mezi největší RNA viry. Dělí se do 4 rodů – α -CoVs, β -CoVs, γ -CoVs, δ -CoVs. α a β infikují savce, γ a δ infikují savce i ptáky. U člověka bylo nalezeno 7 koronavirů. Čtyři ze sedmi obvykle způsobují běžné onemocnění horních dýchacích cest. Jsou to HCoV-229E, HCoV-OC43 (známé od 60. let), HCoV-NL63 a HCoV-HKU1 (objevy v letech 2004 a 2005) [Chang L, 2020]. Nový typ koronaviru SARS-CoV-2 je virus s pozitivním RNA řetězcem. Velikost genomu je okolo 29,9 kb [Canedo-Marroquín G, 2020]. Objevil se koncem roku 2019. Vyvolává těžký respirační syndrom a nemoc je označována jako COVID-19 [Hu B, 2021]. COVID-19 je zkratka z anglického „coronavirus disease 2019“ (koronavirová nemoc 2019) [Han HJ, 2021]. U člověka způsobuje asymptomatické infekce až těžké akutní dýchací potíže, někdy i smrt [Folegatti PM, 2020].

2.1 Přehled významných zástupců koronavirů

2.1.1 SARS-CoV

V roce 2002 se v čínské provincii Guangdong objevil nový β koronavirus, který má původ pravděpodobně u netopýrů [Chang L, 2020] [Rauch S, 2018]. Jeho označení SARS-CoV je odvozeno od Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus [Chang L, 2020]. V roce 2002 došlo k rozšíření nákazy mezi 8000 pacientů a to vedlo k úmrtí 774 nakažených ve 26 zemích. Šíření nákazy ale bylo zastaveno bezpečnostními opatřeními. Následně byl přerušen vývoj vakcíny proti SARS-CoV [Rauch S, 2018].

2.1.2 MERS-CoV

V roce 2012 se objevil další koronavirus v Saúdské Arábii, byl označen MERS-CoV (z angl. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus). Pravděpodobně se člověk v tomto případě infikoval prostřednictvím dromedárů, kteří se infikovali od netopýrů [Rauch S, 2018]. MERS, narozdíl od SARS, má vysokou úmrtnost, protože napadení dýchacích cest je smrtelné [Chang L, 2020]. Probíhá výzkum na vývoj vakcíny proti MERS-CoV, licencovaná vakcína však zatím není [Rauch S, 2018].

2.1.3 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 byl izolován roku 2019 z epiteliálních buněk dýchacích cest. Jako pneumonie se rozšířil ve Wu-Chanu. Patří do rodiny β -CoV. Po jeho sekvenování, byla zjištěna 86,5% shoda s genomem SARS-CoV netopýrů. Nový typ se liší od SARS-CoV a MERS-CoV [Chang L, 2020].

První známý případ byl dohledán 8. prosince 2019. 31. prosince Wu-Chan informoval veřejnost a WHO (Světovou zdravotnickou organizaci) o neznámém patogenu, který způsobuje těžké zápalý plic [Hu B, 2021].

Přestože geneticky to vypadá, že SARS-CoV-2 je přirozený virus, nejspíše původem ze zvířat, nejsou žádné důkazy, jak se ze zvířete přenesl na člověka. Jelikož první případy neměly souvislost s trhem mořských ryb (Huanan Seafood), kde bylo nejdříve vyhlášeno první místo nákazy a odtud se měl COVID-19 přenášet komunitně [Hu B, 2021]. V jedné francouzské studii byly zpětně zkoumány vzorky pacientů z jednotky intenzivní péče, kteří byli hospitalizováni v prosinci 2019. Bylo zjištěno, že jeden pacient byl pozitivní na COVID-19. Epidemie se tak ve Francii mohla začít šířit daleko dříve. Nelze ale vyloučit falešně pozitivní výsledek [Deslandes A, 2020].

2.2 Příznaky COVID-19

Koronaviry způsobují běžné nachlazení, mírné napadení horních dýchacích cest a někdy střevní potíže. COVID-19 se projevuje příznaky podobnými „chřipce“. Nejčastější příznaky jsou horečka následovaná únavou, suchý kašel, bolesti hlavy a dušnost [Canedo-Marroquín G, 2020]. Může ovšem dojít i k respirační tísní, pneumonii, selhávání ledvin, systémovému zánětu, multiorgánové dysfunkci až smrti [Harrison AG, 2020]. COVID-19 může zanechat i dlouhodobé následky, jako zánět myokardu.

COVID-19 se projevuje od 6 do 14 dnů po expozici SARS-CoV-2 [Canedo-Marroquín G, 2020]. S vyšším věkem je spojena vyšší úmrtnost, častější příjem na jednotku intenzivní péče, progresse syndromu akutní dechové tísně a vyšší horečka [Harrison AG, 2020].

V krevním obraze pozitivních pacientů byla nalezena leukopenie a lymfopenie [Wang MY, 2020]. V bronchoalveolární lavážní tekutině (BALF) u COVID-19 pacientů se závažnými příznaky bylo více prozánětlivých makrofágů a neutrofilů než u pacientů s mírnými příznaky. U lidí s těžkým průběhem jsou zvýšené prozánětlivé cytokiny (IL-6, IL-8) a je vyšší exprese zánětlivých chemokinů (CCL2) v makrofázích [Harrison AG, 2020].

Onemocnění můžeme rozdělit do 3 kategorií podle závažnosti na mírná, těžká a kritická. Většina pacientů má příznaky mírné a dojde u nich k uzdravení. Mezi těžké příznaky patří horečka, dušnost, saturace kyslíkem je <93 %, respirační frekvence je >30/min, parciální tlak arteriálního kyslíku k inspirovanému kyslíku je <300, pacienta je potřeba hospitalizovat na JIP. U kritických pacientů dochází k akutní respirační tísní (ARDS), respiračnímu selhání, septickému šoku, nebo selhání více orgánů, metabolické acidóze, anebo koagulační dysfunkci [Wang MY, 2020]. ARDS je způsobena cytokinovou bouří. Imunitní systém zahajuje destrukci hostitelských buněk a následně může nastat selhání nebo smrt orgánů [Kirtipal NS, 2020].

SARS-CoV-2 napadá i centrální nervovou soustavu (CNS). Schopnost viru vstoupit do CNS byla zkoumána na myších a na *in vitro* kulturách neuronových buněk. Neurony, astrocyty a oligodendrocyty by mohly být potenciálním cílem, protože na svém povrchu exprimují ACE-2 (angiotensin konvertující enzym 2). Proto někteří pacienti mohou vykazovat neurologické příznaky jako bolest hlavy, encefalitidu, poruchy vědomí a dokonce Guillain-Barrého syndrom. Virus pravděpodobně vstupuje do CNS přes periferní nervy, proto nejspíše dochází k poruchám čichu a chuti, nebo krevní cestou imunitními buňkami, kdy protein S nejspíše může narušit hematoencefalickou bariéru [Canedo-Marroquín G, 2020].

2.3 Přenos COVID-19

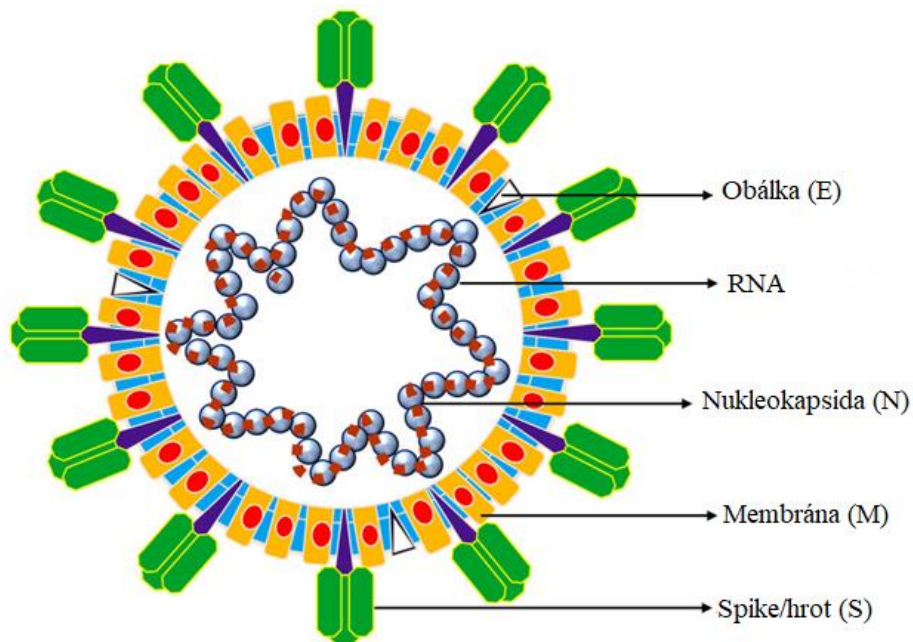
Primárně dochází ke kapénkovému přenosu. V průběhu pandemie byly zaznamenány přenosy pomocí aerosolu nebo přímým kontaktem s infikovanými plochami a také fekálně-orální přenos [Harrison AG, 2020].

Lidské koronaviry mohou vyvolávat střevní infekce s odlišnými stupni patogenity. Je to způsobeno prezentací angiotensin-konvertujícího-enzymu 2 (ACE2) a transmembránovou serinovou proteázou 2 (TMPRSS2) v gastrointestinálním traktu (GIT) na kartáčovém lemu střevních buněk. Proto se u některých pacientů s COVID-19 projevilo onemocnění trávicího traktu. U 20 % pacientů byla zaznamenána virová RNA ve stolici, a to i po skončení respiračních příznaků. Titry SARS-CoV-2 mohou být v GIT daleko déle [Harrison AG, 2020].

2.4 Struktura koronaviru

Koronaviry jsou pozitivní obalené RNA viry s jedním řetězcem [Folegatti PM, 2020]. β-koronavirus SARS-CoV-2 je podobný SARS-CoV ze 79 % a z 50 % MERS-CoV. Je složen z 1273 aminokyselin [Hu B, 2021].

Genom je ze 14-ti otevřených čtecích rámců (ORF), 2/3 ORF kódují 16 nestrukturálních proteinů (nsp1-16) tvořících komplex replikázy. 1/3 kóduje 9 doplňkových proteinů a 4 strukturální proteiny: hrotový protein/spike (S), obálkový protein (E), membránový protein (M) a nukleokapsidový protein (N) [Harrison AG, 2020]. Ze 4 strukturálních genů SARS-CoV-2 má 90 % podobných se SARS-CoV. Liší se v genu S (hrotový protein) [Hu B, 2021]. Struktura SARS-CoV-2 je naznačena na obrázku 10.



Obrázek 10 - Struktura SARS-CoV-2
(převzato, upraveno podle [Kirtipal NS, 2020]).

Dále byl u SARS-CoV-2 popsán přídatný gen ORF8, který kóduje nový protein. U některých pacientů došlo k delecí tohoto genu, což je nejspíše ukazatel lidské adaptace na mezidruhový přenos ze zvířete. U SARS-CoV je tento gen podobný, ale započíná dráhy intracelulárního stresu [Hu B, 2021].

2.4.1 Nestrukturální proteiny

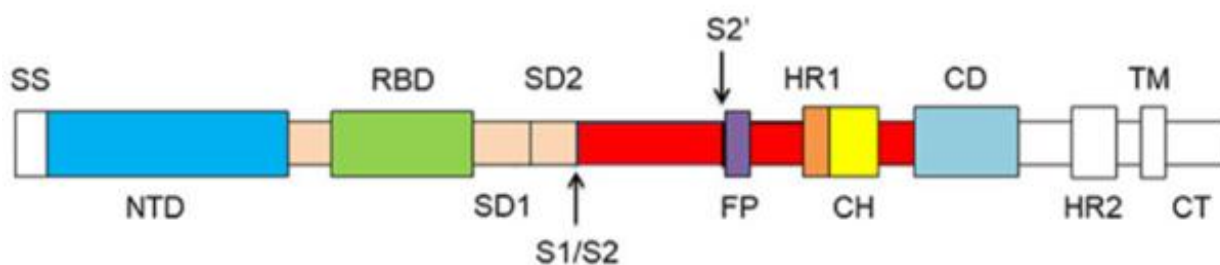
Nsp1 zprostředkovává zpracování a replikaci RNA. Váže se na 18S ribozomální RNA ve vstupním kanálu mRNA ribozomu. Účastní se translace mRNA. Nsp2 formuje u hostitelské buňky signální dráhu přežití. Nsp3 nejspíše odděluje protein po translaci. Nsp4 obsahuje transmembránovou doménu 2 (TM2) a modifikuje membránu endoplazmatického retikula. Nsp5 se účastní replikace polyproteinu. Nsp6 je nejspíše transmembránová doména. V přítomnosti nsp7 a nsp8 je zvýšená kombinace nsp12 a templátu primeru mRNA. Nsp9

se jako protein váže na ssRNA. Nsp8 a nsp9 se navazují na 7SL RNA, která je v části pro rozpoznávání signálu, aby došlo k narušení přenosu proteinu na buněčnou membránu. Nsp10 se účastní methylace čepičky virové mRNA. Nsp12 obsahuje RNA-dependentní polymerázu. Nsp13 se váže s ATP a doména, která váže zinek na nsp13 se účastní replikace nebo transkripce. Nsp14 je doména exoribonukleázy. Nsp15 má aktivitu endoribonukleázy závislé na manganatých iontech. Nsp16 je 2'-O-ribóza methyltransferáza. Po infekci SARS-CoV-2 se nsp16 váže na rozpoznávací domény mRNA [Wang MY, 2020].

2.4.2 Hrotový protein (S)

Glykoproteinový hrot (S) na povrchu virové částice zprostředkovává vazbu na receptory a vstup do buněk. Na hrotový protein a jeho vazbu na receptor buněk se zaměřují některé vakcíny [Folegatti PM, 2020]. Při napadení hostitele se SARS-CoV-2 připojuje na receptor, angiotensin-konvertující-enzym 2 (ACE2), přes doménu vázající receptor (RBD) na viru [Harrison AG, 2020]. Může se napojit i na ACE2 receptor prasete, fretky, makaka rhesus, cibetky, kočky, králíka a psa [Hu B, 2021].

Monomer S proteinu má molekulovou hmotnost přibližně 180 kDa [Ou X, 2020]. Každý hrot je 20 - 40 nm dlouhý [Pillay T, 2020]. S protein má 1273 aminokyselinových zbytků a lze jej rozdělit na 3 podjednotky S1, S2 a S2' [Silveira M, 2021]. S1 se váže na receptor hostitelské buňky a je složena z N-terminální domény (NTD) a receptorové vazebné části (RBD). S2 je složena z fúzního peptidu (FP), heptadové repetice 1 (HR1), centrálního helixu (CH), spojovací domény (CD), heptadové repetice 2 (HR2), transmembránové domény (TM) a cytoplazmatického ocásku (CT). S2 podjednotka iniciuje spojení membrány viru a hostitelské buňky [Wang MY, 2020]. Během fúze se protein S2 nachází v několika stavech (nativní/prefúzní, prehairpin/střední stav, postfúze/stav vlásenky). Potom dochází ke štěpení S2 povrchovými proteázami [Silveira M, 2021]. Celá primární struktura proteinu S je naznačena na obrázku 11.



Obrázek 11 - Primární struktura S proteinu:

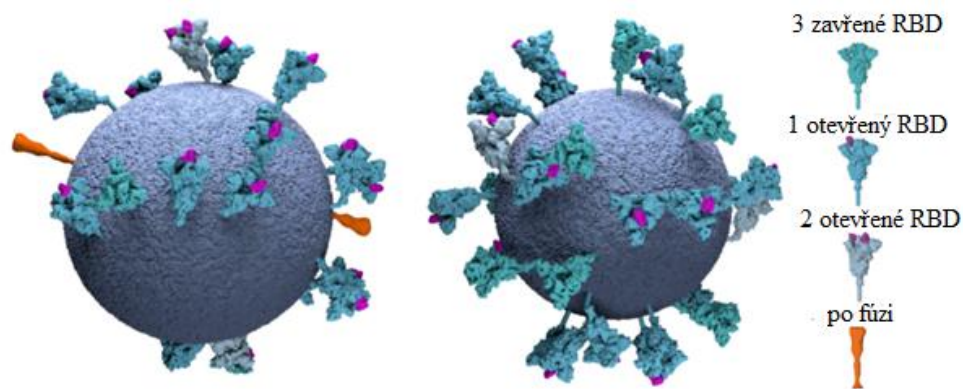
Domény jsou od sebe odlišeny barvami. SS – jednoduchá sekvence, NTD – N-terminální doména, RBD – doména vazající receptor, SD1 – subdoména 1, SD2 – subdoména 2, S1/S2 – štěpící místo proteázy, S2' - místo štěpení proteázou S2', FP – fúzní peptid, HR1 – heptadové repetice, opakování 1, CH – centrální helix, CD – doména spojení (konektoru), HR2 – heptadové repetice, TM – transmembránová doména, CT – cytoplazmatický ocas (převzato, upraveno podle [Wang MY, 2020]).

Na S proteinu je polybazické štěpné místo S1/S2, které je štěpeno buněčným katepsinem L a transmembránovou serinovou proteázou S2 (TMPRSS2). Katepsin L aktivuje virus. TMPRSS2 pomáhá viru vstoupit do buňky [Harrison AG, 2020]. TMPRSS2 je exprimována ve vysokých dávkách s ACE2 na buňkách nosního epitelu a v plicích a bronchiálních cestách. Po proteolytickém zpracování proteinu S se aktivuje endolytická cesta [Hu B, 2021].

S protein má 2 formy struktury. Otevřený a uzavřený stav. Uzavřený stav má 3 rozpoznávací motivy, které nevyčnívají z rozhraní tvořeného proteiny. Pro otevřený stav je typická RBD v konformaci „nahoru“. Tento stav je potřebný ke spojení membrány viru a hostitelské buňky [Wang MY, 2020].

Při navazování na ACE-2 přes S protein dochází k strukturální přestavbě spike proteinu z prefúzní formy na postfúzní. S protein před fúzí má receptor vazající doménu (RBD) na trimerickém vrcholu hrotu nad fúzním jádrem. 3 stejné RBD jsou obklopeny třemi N terminálními doménami (NTD), které jsou specificky mobilní. V uzavřené prefúzní konformaci leží 3 RBD naplocho na hrotu a částečně uzavírají vazebné místo pro receptor. V otevřené prefúzní konformaci dochází u 1 nebo více RBD ke zvednutí a je vystaveno vazebné místo pro receptor (obrázek 12). Povrch trimeru je glykosylován na 22 potenciálních N-vázaných glykosylačních místech na monomer. Po navázání na receptor přechází prefúzní forma na postfúzní, přičemž se spojuje fúzní peptid s transmembránovou doménou [Ke Z, 2020].

Na povrchu viru se běžněji vyskytuje uzavřená konformace. Otevřená konformace je indukována nebo stabilizována pouze vazbou na ACE2 [Ke Z, 2020].



Obrázek 12 - Vazebná místa SARS-CoV-2:

RBD – receptor vázající doména (převzato, upraveno podle [Ke Z, 2020]).

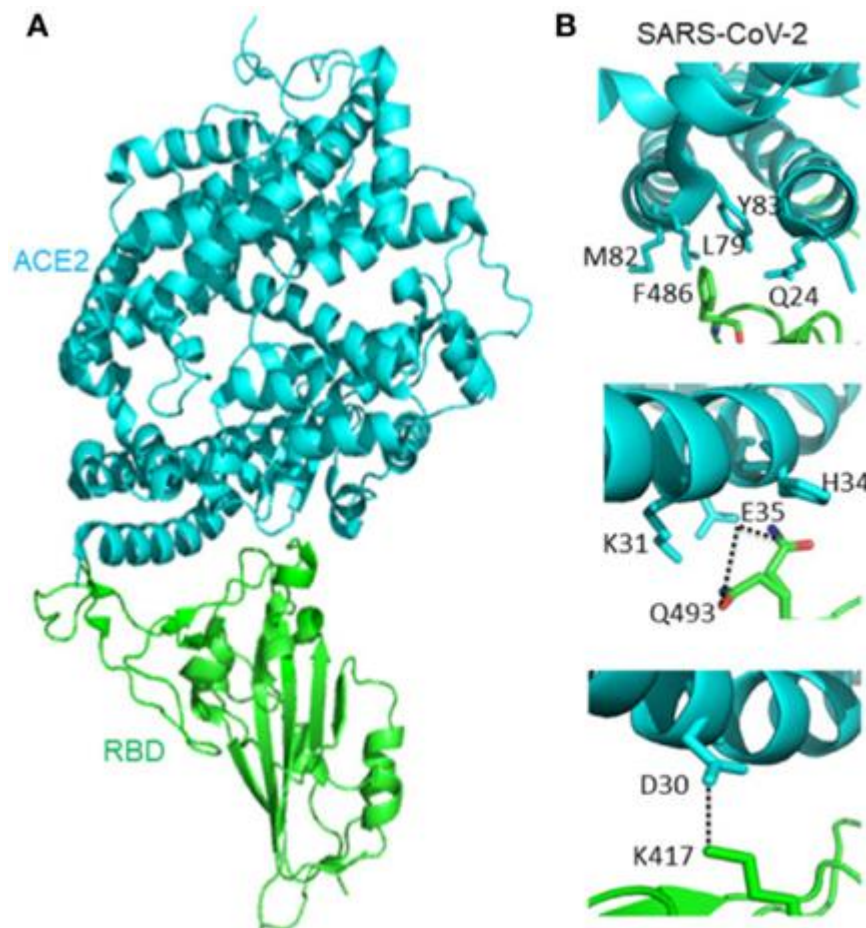
2.4.3 Heptadové repetice

Šestišroubovicový svazek (6-HB) je složen z heptadové repetice 1 (HR1) a 2 (HR2). Je potřebný pro fúzi membrán, proto se na něj můžou zaměřovat některá léčiva. Rozdíl mezi 6HB u SARS-CoV a SARS-CoV-2 je, že SARS-CoV-2 má schopnost stabilizovat 6HB konformaci a zesílit interakci mezi HR1 a HR2, což způsobuje vyšší infekčnost. Protein HR1-L6-HR2 má tyčinkový tvar. 3 domény HR1 se pojí paralelně do trimeru spirálovité cívky. 3 HR2 domény se proplétají kolem středu svinuté cívky antiparalelně, kvůli hydrofobní síle. Hydrofobní zbytky se váží na HR2 s hydrofobní drážkou, která je tvořena dvěma sousedními šroubovicemi HR1. 6HB struktura je podobná S2 podjednotce [Wang MY, 2020].

2.4.4 Doména vázající receptory

Doména vázající receptory (RBD) fyzicky rozpoznává receptor ACE2. Antivirové sloučeniny a protilátky cílí právě na tuto doménu. RBD má u SARS-CoV-2 2 strukturální domény – jádro a externí subdomény. Základní subdoména je vysoce konzervovaná. Tvoří ji 5 β antiparalelních řetězců a disulfidové vazby. Jádro je z 5 β listů uspořádaných antiparalelně a spojených smyčkami a krátkými šroubovicemi. RBM je motiv vázající receptor, který je mezi β 4 a β 7 řetězci. Zde se nachází většina vazebných míst k navázání SARS-CoV-2 na ACE2. Peptidy na N konci ACE2 tvoří vazebné místo, které je ze 2 laloků. RBM se váže na malý lalok na spodní straně ACE2. Povrch RBM je mírně konkávní, aby se vytvořil prostor pro ACE2. Mezi ACE2 a RBM jsou interakce, které ovlivňují vazebnou afinitu, jako například vodíkový

můstek nebo disulfidický můstek [Wang MY, 2020]. Celková struktura ACE2 a RBM je vyobrazena na obrázku 13.



Obrázek 13 - Interakce mezi ACE2 a RBD u SARS-CoV-2:

A – Celá struktura SARS-CoV-2 RBD vázající se na ACE2. ACE2 (angiotensin konvertující enzym 2) je zobrazen modře, RBD (receptorové vazebné části) jsou zeleně. B – interakce mezi ACE2 a RBD, které ovlivňují vazebnou afinitu. Vodíková vazba mezi Q493 a E35 je znázorněna čárkami. Solný můstek mezi D30 a K417 je znázorněn čárkami (převzato, upraveno podle [Wang MY, 2020]).

2.4.5 RNA-polymeráza-závislá na RNA

RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp) katalyzuje syntézu virové RNA. Při replikaci SARS-CoV-2 se využívá komplex replikace/transkripce, který se skládá z virových nestrukturálních proteinů a jádra (RdRp). RdRp je v nsp12 a potřebuje doplňkové faktory jako nsp7 a nsp8 [Wang MY, 2020].

2.4.6 Hlavní proteáza

Hlavní proteáza (Mpro) zprostředkovává replikaci a transkripci virového genu. Hydrolyzuje polyprotein nejméně na 11 konzervovaných místech a startuje štěpení pp1a a pp1b (překrývající se polyproteiny) [Hung HCH, 2020]. Tvoří homodimer, protomer A a protomer B, oba se skládají ze 3 subdomén. 2. a 3. subdoména je spojena smyčkou. Mezi 1. a 2. subdoménou je rozštěp, který se nachází ve vazebném místě pro substrát [Wang MY, 2020].

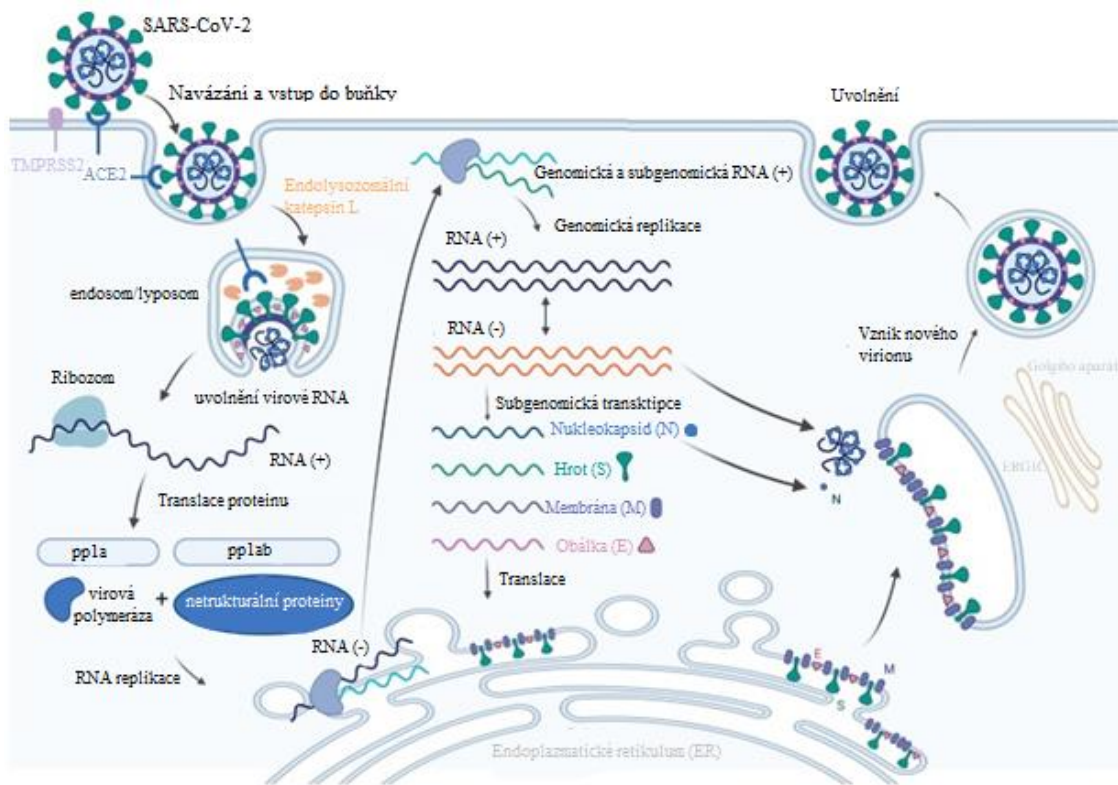
Hlavní proteáza a RdRp jsou důležité při replikaci SARS-CoV-2, výsledkem je hrotový protein [Wang MY, 2020].

2.5 Vstup do buňky

SARS-CoV-2 se přes RBD (S1 podjednotku) navazuje na ACE2 receptor a lidské proteázy aktivují vstup do buňky, štěpí S glykoprotein na S1 a S2 podjednotku. S2 umožňuje vstup do buňky [Kirtipal NS, 2020]. Dochází ke spojení virové membrány s buněčnou [Hu B, 2021], viz obr. 14.

Genom je uvolněn do cytoplazmy buňky a dochází k translaci ORF1 a ORF2 do replikázových virových proteinů, které jsou rozštěpeny hostitelskými a virovými proteázami na nsPs. nsPs se strukturním proteinem tvoří komplex multiproteinových replikáz transkriptáz (RTC), který provádí replikaci a transkripci virového genomu. RdRp (hlavní protein replikázy-transkriptázy) zajišťuje syntézu a transkripci negativních subgenomových molekul RNA z pozitivních mRNA molekul. Negativně nabitě řetězce jsou templát pro pozitivní nově vznikající řetězce mRNA [Kirtipal NS, 2020].

Replikované proteiny se v endoplazmatickém retikulu přemění na dvojmembránové vezikuly (DMV). V DMV začíná replikace, RNA s pozitivním vláknem slouží jako templát pro RNA s negativním řetězcem a subgenomickou RNA. Translací subgenomické RNA vznikají strukturní proteiny a pomocné proteiny (N, S, M, E). Proteiny jsou vloženy do mezikomory endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, kde se sestavují nové viriony. Ty jsou následně vylučovány z buňky [Harrison AG, 2020].



Obrázek 14 - Znázornění buněčného cyklu koronaviru SARS-CoV-2:

TMPRSS2 – povrchová transmembránová serinová protéza 2, RNA (+) – ribonukleová kyselina s pozitivním řetězcem, pp1a a pp1ab – polyproteiny, RNA (-) – RNA s negativními řetězci, ERGIC – mezikomora endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (převzato, upraveno dle [Harrison AG, 2020]).

2.6 Imunitní odpověď

Lidé nemají imunitu proti koronaviřům, proto jakákoliv nová infekce jako SARS-CoV-2 je náročná pro imunitní systém. Imunitní odpověď proti SARS-CoV-2 není ještě zcela dešifrována, nejspíše se imunitní odpovědi podobají těm proti SARS-CoV a MERS-CoV [Kirtipal NS, 2020].

2.6.1 Vrozená imunitní odpověď

Patogeny (PAMP) jsou rozpoznávány receptory pro rozpoznávání vzorců (PRR). Podle exprimovaných receptorů na hostitelské buňce dochází k rozpoznávání viru. Toll-like receptory (TLR) 7 a 8 spouštějí primární odpověď po navázání na receptory hostitelské buňky, kde je virová mRNA. Dochází k aktivaci exprese interferonu I (INF I) [Canedo-Marroquín G, 2020], který se při virové infekci v organismu produkuje [Kirtipal NS, 2020].

Při probíhající infekci SARS-CoV-2 *in vitro* byla zjištěna nedostatečná odpověď INF I. Ve vzorcích plazmy a biopsiích nebyla přítomnost $INF\beta$ a $INF\gamma$. Nejspíše je to příčina vysoké

úmrtnosti. Po zlepšení pacienta v kritickém stavu se hladiny zvýšily [Canedo-Marroquín G, 2020].

Při virových infekcích se aktivuje Tank-vazebná kináza (TBK1), ale při infekci SARS-CoV-2 k její aktivaci nedochází [Canedo-Marroquín G, 2020]. TBK1 je serin-threonin kináza, které se nachází v celém těle. Produkuje interferon typu 1 (INF1), dále se podílí na aktivaci různých buněčných cest vedoucích k produkci INF a protizánětlivých cytokinů [Ahmad L, 2016].

2.6.2 Adaptivní humorální a buněčná imunitní odpověď

Humorální a buněčná odpověď zprostředkovaná T (CD4+ a CD8+) a B lymfocyty následuje po prezentaci antigenu. T CD4+ lymfocyty odpovídají proti virové infekci a stimulují B lymfocyt k produkci protilátek. T CD8+ lymfocyty zabíjejí infikované buňky [Kirtipal NS, 2020].

U pacientů nakažených SARS-CoV-2 byla zjištěna lymfopenie. T lymfocyty CD4+ a CD8+ a paměťové buňky jsou u závažných případů nízké, to způsobuje nedostatečnou antivirovou reakci na infekci [Canedo-Marroquín G, 2020].

Průtoková cytometrie při analýze periferní krve ukázala, že počty periferních CD4+ a CD8+ T lymfocytů byly hodně sníženy. Jejich stav byl hyperaktivován, protože byl vysoký podíl lidského leukocytového antigenu HLA-DR (CD4 3,47 %) a CD38 (CD8 39,4 %) dvojitě pozitivní frakce. Byla zvýšená koncentrace prozánětlivých CCR6+ Th17 v CD4+ T lymfocytech. V CD8+ T buňkách byly obsaženy vysoké koncentrace cytotoxických granulí, ve kterých bylo 31,6 % buněk pozitivních na perforin, 64,2 % buněk pozitivních na granulysin a 30,5 % buněk pozitivní na granulysin a perforin. Výsledky analýzy naznačují, že při nadměrné aktivaci T lymfocytů se zvyšuje Th17 a cytotoxicita CD8 T buněk. To může zodpovídat za závažné imunitní poškození pacienta [Xu Z, 2020].

T buňky vyprodukovaly prozánětlivé cytokiny, které pomáhají obraně buněk. Apoptóza buněk způsobuje uvolnění specifických zánětlivých mediátorů, které aktivují makrofágy k vylučování interleukinu 1 (IL-1), interleukinu 6 (IL-6) a tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF α). Experimenty ukázaly zpožděné uvolňování cytokinů a chemokinů, ale hladiny uvolněných látek byly zvýšené [Kirtipal NS, 2020].

Po nakažení SARS-CoV-2 se v těle vytvoří protilátky IgM a IgG. Jako první protilátky se začnou tvořit IgM, následované IgG. Titry IgM ubývaly po určité době, ale IgG titry zůstaly stejné [O Murchu E, 2021].

2.7 Léčba COVID-19

2.7.1 Antivirotika

Inhibitory replikace SARS-CoV-2 jsou remdesivir (GS-5734), flavilavir (t-705), ribavirin, lopinavir a ritonavir. Lopinavir a ritonavir inhibují pomocí 3CLpro, ostatní zástupci se zaměřují na RbRp [Hu B, 2021].

Lopinavir a ritonavir *in vitro* inhibují SARS-CoV-2 a MERS-CoV. U pacientů byl malý terapeutický účinek kombinací léčiv. Ve Velké Británii byl ukončen program klinických studií, protože nebyl pozorován pozitivní účinek. V jiných zemích dále klinické studie probíhají [Hu B, 2021].

Remdesivir je obdobný adenosinu. Je silným inhibitorem RdRp, kovalentní vazbou na primer ukončí řetězec RNA. Účinně inhibuje replikaci SARS-CoV-2 *in vitro*. Má širokospektrální antivirové účinky. Po vstupu viru do buňky se začlení do nově vznikající virové DNA k ukončení replikace dříve, než se RNA stane zralou [Wang MY, 2020]. U hospitalizovaných může zkrátit dobu zotavení, ale statistický rozdíl v úmrtnosti nebyl významný. V Evropské unii je to jeden ze schválených druhů léčby [Hu B, 2021].

Japonský lék proti chřipce favilavir byl pro léčbu schválen pouze v Rusku, Číně a Indii. Studie v Číně, která se zabývala favilavirem, dokázala, že se snížily příznaky onemocnění a zkrátila se doba, kdy byl virus v organismu [Hu B, 2021]. Je to analog purinové báze, jehož aktivní metabolit interferuje s virovou replikací inhibicí virové RNA polymerázy [Canedo-Marroquín G, 2020].

2.7.2 Specifické monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (mAb) mají potenciál působit proti vznikajícím virům. U SARS-CoV-2 se izolují protilátky, které se zaměřují na různé antigeny. Specifické monoklonální protilátky blokují vstup viru přes ACE2 *in vitro*, jelikož jsou namířeny proti proteinu S, ale při pokusu *in vivo* blokování ACE2 selhalo. Zatím jsou všechny mAb na léčbu COVID-19 ve stádiu studií [Canedo-Marroquín G, 2020].

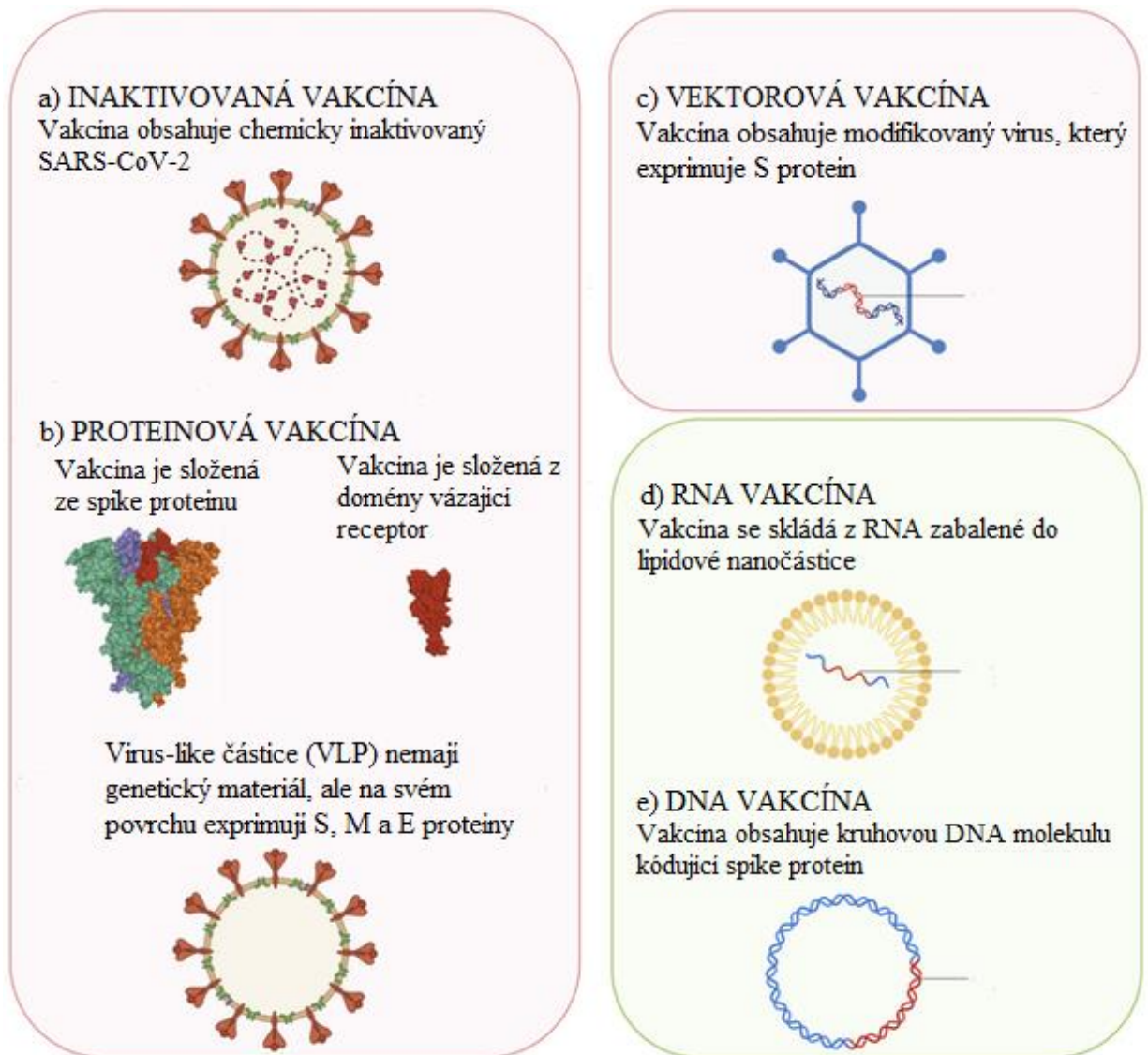
2.7.3 Plazmová transfúze

Při akutních infekcích se k imunoterapii používá transfúze plazmy. Pasivně dodáváme do těla plazmu s vysokými titry protilátek, které jsou od uzdravujícího se jedince. Při převodu plazmy dochází ke snížení virové nálože a zlepšení klinických parametrů jako například snížení teploty, zvýšení saturace oxyhemoglobinu, zlepšení hladiny lymfocytů a snížení hladiny CRP.

S podáním plazmy se můžou u pacienta objevit i nežádoucí účinky, které jsou obecně spojené s podáním transfúze [Canedo-Marroquín G, 2020].

3 Vakcíny proti koronaviru SARS-CoV-2

Proti SARS-CoV-2 se vyvíjí více než 100 různých vakcín. Nejčastěji se vakcíny zaměřují proti proteinu S, který zprostředkovává vazbu na receptor hostitelských buněk a vstup do nich [Ura T, 2021]. Jednotlivé typy vakcín jsou uvedeny na obrázku 15.



Obrázek 15 - Typy vakcín proti koronaviru SARS-CoV-2.

VLP – částice podobné virům (z angl. virus like particles), které nemají genetický materiál, ale na svém povrchu exprimují proteiny typické pro virus (upraveno, převzato dle [Sow, 2020]).

3.1 Vývoj vakcín

Klinický vývoj vakcín je ovlivněn přísnými požadavky na klinické studie s velkým počtem pacientů a nároků na testy. Opatření při vývoji zajišťují, že konečná vakcína bude

bezpečná a účinná. Obvykle se vakcína vyvíjí 10–15 let, od provedení předklinických studií po získání licence. Vývoj vakcín pro COVID-19 se urychlil díky podobnosti se SARS-CoV a MERS-CoV, proti kterým jsou vakcíny již vyvinuty [Silveira M, 2021].

Klinické testy můžeme rozdělit do 4 fází. V první fázi se vakcína podává zdravým dobrovolníkům a stanoví se její bezpečnost a dávkování. Druhá fáze se zaměřuje na počáteční stimulaci a dále na bezpečnost. Dávky jsou aplikovány malému počtu zdravých lidí. Ve třetí fázi se stanovuje účinnost vakcíny u velké skupiny lidí. Čtvrtá fáze se provádí po schválení vakcíny, aby byla potvrzena její bezpečnost. Následují studie dlouhodobých účinků [Silveira M, 2021].

U některých vakcín je potřeba více dávek podávaných s odstupem týdnů nebo měsíců. Rozmezí mezi dávkami je důležité, aby došlo k vytvoření protilátek a paměťových buněk. Tělo je takto připravováno na napadení virem [World Health Organization, 2020].

3.2 Genetické vakcíny proti SARS-CoV-2

Vakcíny na bázi nukleových kyselin využívají imunogenní vlastnosti patogenního organismu. Aplikují se geny nebo jejich fragmenty kódující imunogenní antigeny. Pro vstup do buňky se využívají plazmidy s DNA nebo RNA nebo virionové replikony. O jednotlivých typech vakcín bude zmínka v následujících kapitolách.

3.2.1 DNA vakcíny

V klinickém výzkumu je několik DNA vakcín (viz. tabulka 2). DNA vakcíny jsou schopné vyvolat buněčnou i humorální imunitní odpověď, ale nedojde k vyvolání významné klinické reakce, proto byly licencovány pouze ve veterinární medicíně [Silveira M, 2021]. Výhodou je stabilní vyvolání buněčné i humorální odpovědi, lze je snadno a levně připravit ve velkém množství a mají vysokou skladovací stabilitu. U vakcín není jasná jejich účinnost a bezpečnost při použití [Dong Y, 2020].

Tabulka 2 – Seznam DNA vakcín vyvíjených proti SARS-CoV-2:

IM – intramuskulární podání, *ID* – intradermální podání, *EP* – elektroporace, *oral* – podání orální, *imunogenem* u všech uvedených vakcín je *S protein* (převzato, upraveno dle [Silveira M, 2021]).

Vakcína	Fáze studie	Podání	Místo studie
DNA vakcína [GX-19]	Fáze 1-2	IM	Korea

DNA vakcína [AG0301-COVID19]	Fáze 1-2	IM	Japonsko
DNA vakcína [AG0302-COVID19]	Fáze 1-2	IM	Japonsko
DNA vakcína [INO-4800]	Fáze 1	ID (EP)	Spojené státy americké
DNA vakcína [bacTRL-Spike Vaccine]	Fáze 1	Oral	Austrálie
DNA vakcína [Covigenix VAX-001]	Fáze 1	IM	Kanada

U všech vakcín proti SARS-CoV-2 v klinických studiích byl jako antigen použit S protein [Silveira M, 2021].

Vakcína AG0301-COVID-19 používá dvě imunizační schémata. První dávka je nízká (1,0 mg), druhá dávka je vysoká (2,0 mg). Podává se intramuskulárně s odstupem dvou týdnů. Vakcína se testuje na dobrovolnících ve věku 20 až 65 let [Silveira M, 2021].

Vakcína Invio (INO-4800) kóduje celý protein S, který je ve formě plazmidu pGX9501 podáván intradermálně elektroporací kožních buněk. Používá stejnou platformu jako vakcína proti MERS (INO-4700), protože u MERS proběhla s kladnými výsledky I. a II. fáze vývoje [Silveira M, 2021]. Vakcína je v I. a II. fázi výzkumu. Studie ukázala, že došlo k vyvolání humorální a imunitní odpovědi T buněk u 94 % účastníků po 2 dávkách, také došlo k vyvolání nežádoucích účinků 1. stupně [Li Y, 2020]. INO-4800 indukuje tvorbu neutralizačních protilátek, které zabraňují vazbě proteinu na SARS-CoV-2 s receptorem ACE2 na hostitelské buňce [Silveira M, 2021].

Vakcína bacTRL-Spike obsahuje živou a rekombinantní *Bifidobacterium longum* je nepatogenní anaerobní bakterie, která je součástí lidské mikroflóry, obsahuje syntetickou plazmidovou DNA kódující S protein. Bakterie zvyšuje odolnost jedince, tím že zvyšuje imunitní odpověď proti virové infekci [Silveira M, 2021].

Další vakcíny, které se podávají intramuskulárně, jsou v klinických studiích [Silveira M, 2021].

3.2.2 mRNA vakcíny

Po aplikaci vakcíny, zahrnující mRNA kódující proteinový antigen, dochází k syntéze proteinů, které jsou prezentovány na povrchu buňky a je stimulován imunitní systém [Han HJ, 2021]. Jejich hlavní výhodou je, že se nemusí dostat do jádra buňky, jak je tomu u DNA vakcín. Náklady na výrobu mRNA vakcín jsou nízké a výroba je rychlá [Ura T, 2021]. Přestože RNA je relativně nestabilní molekula, byly vyvinuty nové postupy přípravy vakcín, které zvyšují stabilitu a také účinnost translace proteinů, což zlepšuje imunitní odpověď [Silveira M, 2021].

Jako největší producenti mRNA vakcín jsou společnosti Moderna a BioNTech/Pfizer [Li Y, 2020].

3.2.2.1 mRNA-1273 (Moderna)

Vakcína od americké společnosti Moderna je na bázi mRNA. Po aplikaci dochází ke stimulaci mRNA, která je zabudovaná v lipidových nanočásticích. Vakcína obsahuje syntetický řetězec mRNA, který kóduje celý hrotový protein S [Wang MY, 2020]. Jedná se o první mRNA vakcínu, která byla proti COVID-19 vyvinuta v rekordním čase 63 dní [Silveira M, 2021].

V S proteinu jsou nahrazeny prolinem aminokyseliny na pozicích 986 a 987, aby došlo ke stabilizaci konformace. Nukleotidy jsou modifikovány ke zvýšení translace a poločasu rozpadu. Také dochází k aktivaci genů, které spolupracují s interferonem při vstupu do buňky [Li Y, 2020].

Ve fázi I klinického vývoje došlo k vytvoření neutralizačních protilátek u všech 45 pacientů po imunizaci 2 dávkami [Li Y, 2020]. Vakcína je podávána intramuskulárně ve 2 dávkách, které mezi sebou mají odstup 28 dní [Han HJ, 2021].

3.2.2.2 BNT162 (BioNTech a Pfizer)

Od společnosti BioNTech a Pfizer z Německa a Spojených států amerických jsou 4 kandidáti – BNT162b1, BNT162b2, BNT162a1, BNT162c2. BNT162b1 a BNT162b2 obsahují modifikované nukleosidy. BNT162c2 kóduje RBD S proteinu, vakcína je samoamplifikující mRNA. BNT162a1 kóduje celý protein S. U BNT162b1 v klinické fázi I / II bylo potvrzeno, že dvě dávky vyvolají dostatečné titry protilátek [Li Y, 2020].

Používaná vakcína na očkování je BNT162b2, která obsahuje lipidové nanočástice, kde je uložena modifikovaná mRNA SARS-CoV-2. Vakcína se podává 2krát s rozestupem 21 dní. Účinnost proti COVID-19 je 95% [Polack F, 2020].

3.2.3 Vektorové vakcíny

Vektorové vakcíny jsou složeny z nosného oslabeného viru (adenovirus nebo virus neštovic), který funguje jako – nosič/vektor. Vektor nese příslušný gen z viru, který je dopraven do buněk. U vakcín proti koronaviru je nejčastěji používán adenovirus. Do adenoviru se vkládá gen proteinu S [Dong Y, 2020].

Výhodou vektorových vakcín je, že se dají snadno a levně vyrobit. Do organismu nepřichází celý virus, ale pouze potřebná genetická informace na vyvolání imunitní odpovědi.

Nevýhodou je, že může přednostně dojít k navození imunity proti vektoru a je následovně omezena imunitní odpověď proti cílovému patogenu [Dong Y, 2020].

12 vakcín tohoto typu proti SARS-CoV-2 je v klinickém vývoji a 36 vakcín je v preklinickém vývoji [Li Y, 2020]. Vyvolávají silné imunitní reakce a mohou zvýšit humorální i buněčnou imunitu. Jako vektor se používá adenovirus typu 5 (Ad5), který kóduje protein S [Ura T, 2021]. 8 z 12 vakcín je vyrobeno z adenovirů AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) vyvinutých AstraZenecou a Oxfordskou univerzitou. Dále se vyvíjí Gam-COVID-Vac (Sputnik V nebo rAd26S+rAd5-S), Ad5 (CanSino Biological Inc a Beijing Institute of Biotechnology) a Ad26 (Johnson & Johnson a Beth Israel Deaconess Medical) [Li Y, 2020].

3.2.3.1 AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19, AstraZeneca)

Vakcína od společnosti AstraZeneca ve spolupráci s Oxfordskou univerzitou je vyvinuta v Británii a Švédsku [Medicínské centrum Praha, 2020]. ChAdOx1 nCoV-19 se skládá z adenovirového vektoru ChAdOx1, ve kterém je S protein SARS-CoV-2, dále zde je vedoucí sekvence aktivátoru tkáňového plazminogenu. Exprimuje S protein [Folegatti PM, 2020].

Ve fázi I/II v červenci 2020 bylo zjištěno, že dochází k vyvolání T-lymfocytární reakce, která je specifická proti proteinu S [Li Y, 2020]. Po aplikaci 2. dávky vakcíny byla snížena reaktogenicita [Folegatti PM, 2020]. Reaktogenicita je fyzicky se projevující zánět po očkování jako například bolest v místě vpichu, zarudnutí, otok nebo mohou nastat systémové příznaky jako horečka, bolest hlavy nebo myalgie [Hervé C, 2019]. Humorální odpověď na S protein byla na vrcholu 28. den po imunizaci. U všech účastníků byla pozorována humorální, buněčná imunita i neutralizující protilátky [Folegatti PM, 2020]. Průměrná účinnost vakcíny souhrnně byla 70 % [Li Y, 2020].

3.2.3.2 Ad26.CoV2.S (Janssen/Johnson & Johnson)

Vakcína byla vyvinuta ve Spojených státech amerických, Belgii a Izraeli [Medicínské centrum Praha, 2020]. Ad26.CoV2.S je rekombinantní, replikačně nekompetentní vektor Ad26 (adenovirový sérotyp), který kóduje celou délku proteinu S [Stephenson KE, 2021]. Vakcína je odvozena od původního izolovaného kmene z Wu-Chanu [Sadoff J, 2021].

Vektor Ad26 se využíval např. u vakcíny proti ebole, HIV a viru Zika. Vakcíny na bázi Ad26 jsou obecně bezpečné a vysoce imunogenní [Sadoff J, 2021].

Po první aplikaci Ad26.CoV2.S byla vyvolána silná humorální odpověď u více než 90% očkovaných, a to přítomností S-vázajících a neutralizujících protilátek, bez ohledu na věk nebo dávku vakcíny. Během 71 dní po podání se zvyšovaly a stabilizovaly titry protilátek [Sadoff J, 2021].

3.2.3.3 Sputnik V (Gam-COVID-Vac)

Jedná se o vakcínu vyvinutou v Rusku. Sputnik V je založen na heterologním rekombinantním adenovirovém přístupu, který využívá adenovirus 26 (Ad26) a adenovirus 5 (Ad5). Ad26 a Ad5 jsou vektory pro S protein. Při použití 2 různých adenovirů se cílí na vznik imunity, která bude odolnější. Odstup podání dvou dávek je 21 dní [Jones I, 2021].

První studie (1/2 fáze) byla zveřejněna v září 2020. Byly zde představeny slibné výsledky pro vytvoření účinné imunitní odpovědi a ochrany. Očkovaní vytvářeli silné protilátkové odpovědi cílené na S protein, vznikaly u nich neutralizující protilátky. Při dalších fázích studie nebyly zaznamenány žádné závažné nežádoucí účinky související s vakcínou. Účinnost vakcíny po první dávce je uváděna 91,6% [Jones I, 2021]. Vakcína ještě není mezi schválenými Evropskou unií [Evropská komise, 2021]. Pro použití léků v Evropské unii musí léčivo schválit EMA (European medicines agency), která po prozkoumání vakcíny Sputnik V vyhodnotí data, aby přínosy převažovaly nad riziky. Průběžná kontrola bude pokračovat, dokud nebude dostatek důkazů pro formální žádost o registraci [European medicines agency, 2021].

3.3 Ostatní typy vakcín proti SARS-CoV-2

3.3.1 Inaktivované vakcíny

Inaktivované vakcíny obsahují virus, který je inaktivovaný (tzn. usmrčen) a to nejčastěji vysokou teplotou, chemicky nebo ozařováním. Takový virus nezpůsobuje onemocnění, ale přesto vyvolává imunitní odpověď [Medicínské centrum Praha, 2020]. U SARS-CoV-2 bylo vyvinuto 6 vakcín tohoto typu, které jsou ve fázi klinických studií. Překážkou pro vývoj je výběr vhodných kmenů virů. 3 vakcíny jsou ve III. fázi klinických studií [Ura T, 2021].

Výhody inaktivovaných vakcín jsou: snadná produkce a stabilní exprese epitopů. Nevýhody jsou, že nedůležitý antigen může potlačit imunitní odpověď proti antigenu vedoucímu k tvorbě zneškodňujících protilátek [Dong Y, 2020]. Je také třeba vybalancovat riziko přílišné stimulace imunitního systému a vzniku velmi silné reakce v určitém orgánu, což by mohlo příslušný orgán poškodit [Medicínské centrum Praha, 2020].

Příkladem může být vakcína CoronaVac vyvinutá společností SinoVac v Číně [Medicínské centrum Praha, 2020]. Je navržena pro intramuskulární podání ve 2 dávkách, druhá dávka se podává 14 dní od první aplikace [Han HJ, 2021]. Vakcína CoronaVac je odvozena od kmene CN2 SARS-CoV-2. V preklinických studiích měla rozsáhlou neutralizační schopnost proti SARS-CoV-2 [Ura T, 2021]. V 1/2 fázi studie je potvrzeno, že se vytvoří neutralizační protilátky z 90% [Han HJ, 2021].

3.3.2 Proteinové vakcíny

Vakcíny jsou vytvořeny z neškodných fragmentů protein nebo proteinových obalů napodobujících virus SARS-CoV-2. Proteinové vakcíny jsou bezpečné a ke zvýšení účinnosti často potřebují látky, tzv. adjuvans [Medicínské centrum Praha, 2020]. Adjuvans zvyšuje imunomodulační cytokinovou odpověď [Kaur SP, 2020].

Mezi proteinové vakcíny patří také vakcíny na bázi virových částic (virus-like particle, VLP), které jsou složeny pouze z povrchových bílkovin virů, ne jejich genů. Nemůže se tedy rozvinout onemocnění z aplikovaných částic [Medicínské centrum Praha, 2020]. VLP stimulují silné imunitní odpovědi, kvůli opakujícím se strukturám a také jsou bezpečnější, protože jim chybí genetický materiál [Dong Y, 2020].

U SARS-CoV-2 se využívá S protein. Vakcíny se připravují *in vitro*, dochází tak k potlačení rizika spojeného s manipulací s nebezpečnými viry. Vakcíny se podávají s adjuvans, která zajišťují dostatečnou imunitní reakci, to zvyšuje náklady na výrobu [Han HJ, 2021]. 13 podjednotkových proteinových vakcín bylo v klinickém výzkumu [Li Y, 2020].

Firma Novavax s vakcínou NVX-CoV2373 absolvuje IIb fázi výzkumu v Jižní Africe a III. fázi ve Velké Británii [Li Y, 2020]. Vakcína kóduje prefúzní S protein [Kaur SP, 2020]. Dále vakcína obsahuje adjuvans (Matix-M), které mají zlepšit imunitní odpověď. Aplikace by měla být dvojdávková po 21 dnech [Han HJ, 2021].

Ve fázi II je ještě vakcína Anhui Zhifei Longcom, která kóduje RBD protein. Doposud ale nebylo poskytnuto přesné složení a návrh vakcíny [Han HJ, 2021].

3.4 Očkování v České republice

V České republice jsou k dispozici vakcíny od společností Pfizer/BioNTech, Moderna a AstraZeneca. V polovině roku 2021 by měly dorazit vakcíny od Johnson & Johnson a Novavax. Do konce roku 2021 by měla být k použití genetická mRNA vakcína od firmy CureVac [Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra České republiky, 2020].

Registrace na očkování byla spuštěna 15.1.2021 pro osoby starší 80 let. Od 4. června je možnost registrace všech osob starších 16 let [Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra České republiky, 2020]. Proočkovanosť je znázorněna v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3 - Aplikované vakcíny proti SARS-CoV-2 v ČR:

Hodnoty jsou zaznamenány k datu 20.6.2021 (převzato, upraveno podle [COVID OČKOVÁNÍ, 2021]).

Výrobce	Očkováno	Zničeno
AstraZeneca	673 507	110
Janssen/Johnson & Johnson	78 098	0
Moderna	624 388	400
BioNTech/Pfizer	5 812 889	1 554
Celkem	7 188 882	2 064

Tabulka 4 - Proočkovanosť v ČR podle věku:

Hodnoty jsou z 20.6.2021 (převzato, upraveno podle [COVID OČKOVÁNÍ, 2021]).

Věková skupina	1. dávka		2. dávka	
	počet	proočkovanosť	počet	Proočkovanosť
0 - 17	19 309	1,0%	1 297	0,1%
18 - 24	137 847	20,6%	34 863	5,2%
25 - 29	146 086	23,5%	46 439	7,5%
30 - 34	233 474	32,5%	55 531	7,7%
35 - 39	299 749	39,8%	76 764	10,2%
40 - 44	449 901	50,4%	117 297	13,1%
45 - 49	508 080	57,6%	139 558	15,8%
50 - 54	416 548	60,3%	144 762	20,9%
55 - 59	426 492	63,7%	240 159	35,9%
60 - 64	426 336	68,2%	280 807	44,9%
65 - 69	503 625	74,9%	361 051	53,7%
70 - 74	499 093	80,3%	403 520	65,0%
75 - 79	341 826	81,9%	290 074	69,5%
80 +	349 683	78,1%	361 809	70,8%
celkem	4 758 049	52,3%	2 553 931	30,0%

K datu 20.6.2021 byla první dávka aplikování cca 50 % populace a druhou dávku absolvovalo 30 %. Nejvíce aplikovaných dávek bylo od společnosti BioNTech/Pfizer [COVID OČKOVÁNÍ, 2021].

3.5 Účinnost vakcín proti mutacím

Při replikaci viru se zvyšuje pravděpodobnost jeho mutace. Většina změn u viru nemá žádný nebo malý vliv na infekci a projev nemoci. Některé mutace mohou ovlivnit přenos viru (např. snadnější šíření) nebo závažnost onemocnění [World Health Organization, 2021].

Předpokládá se, že vakcíny, co jsou ve vývoji nebo jsou schváleny, poskytují určitou ochranu i proti novým mutacím virů. Je vyvolána široká imunitní odpověď, ve které je vytvořeno mnoho protilátek. Vakcíny by proti mutacím neměly být zcela neúčinné, kdyby tomu tak bylo, je možné měnit její složení, aby byla opět poskytována ochrana proti virům [World Health Organization, 2021].

ZÁVĚR

Úkolem bakalářské práce byla literární rešerše o genových vakcínách se zaměřením na vakcíny proti novému typu koronaviru SARS-CoV-2. Jedná se o aktuální problematiku, neboť v roce 2019 došlo k masivnímu šíření viru po celém světě a rozvoji pandemie v mnoha oblastech. To bylo impulsem k vývoji vakcíny proti SARS-CoV-2, neboť aplikace vakcíny způsobí imunizaci, kterou je organismus chráněn při dalším setkáním s patogenem. Genové vakcíny jsou slibnou alternativou konvenčních vakcín, můžeme je rozdělit na DNA a RNA. U DNA vakcín musí dojít k zavedení DNA do jádra buňky, zatímco mRNA se zavádí do cytosolu. V obou případech následuje prezentace antigenů na povrchu buňky a vyvolání imunitní odpovědi po jejich rozpoznání díky vazbě s HLA molekulami. DNA vakcína doposud nebyla schválena pro použití u lidí.

Koronaviry jsou RNA viry. U lidí způsobují onemocnění horních cest dýchacích. Nemoc, kterou vyvolává SARS-CoV-2, se nazývá COVID-19. Onemocnění se projevuje horečkou, únavou, kašlem, dušností nebo bolestí hlavy, k přenosu dochází pomocí kapének. RNA je obalená membránou, ve které jsou zakotvené S proteiny, které zprostředkovávají vazbu na receptor hostitelských buněk. Na tento protein se zaměřuje většina vakcín proti SARS-CoV-2.

V České republice jsou schválené vakcíny od společností Moderna, BioNTech/Pfizer a AstraZeneca. Společnosti Moderna a BioNTech/Pfizer vyrábějí mRNA vakcíny. Vakcína obsahuje plazmid se začleněnou RNA kódující S protein. Po aplikaci dochází ke stimulaci imunitního systému a vytvoření imunitní odpovědi a paměti. Obě vakcíny jsou podávány dvěma dávkami. Vakcína od společnosti AstraZeneca je vektorovou vakcínou. V adenovirovém vektoru ChAdOx1 je uložena informace o S proteinu, k jehož exprimaci dochází po aplikaci. V České republice jsou ještě používány vakcíny od firmy Janssen/Johnson&Johnson, které obsahují adenovirový vektor Ad26, který kóduje S protein v celé délce. Byla uvažována také vakcína Sputnik V z Ruska, ale ta není mezi schválenými vakcínami Evropskou unií.

LITERÁRNÍ ZDROJE

AHMAD, Liyana, Shen-Ying ZHANG, Jean-Laurent CASANOVA a Vanessa SANCHO-SHIMIZU. Human TBK1: A Gatekeeper of Neuroinflammation. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2016, **22**(6), 511-527 [cit. 2021-6-20]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2016.04.006

BAUM, Christopher, Olga KUSTIKOVA, Ute MODLICH, Zhixiong LI a Boris FEHSE. Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. *Human Gene Therapy* [online]. 2006, **17**(3), 253-263 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1043-0342. Dostupné z: doi:10.1089/hum.2006.17.253

CANEDO-MARROQUÍN, Gisela, Farides SAAVEDRA, Catalina A. ANDRADE, Roslye V. BERRIOS, Linmar RODRÍGUEZ-GUILARTE, María C. OPAZO, Claudia A. RIEDEL a Alexis M. KALERGIS. SARS-CoV-2: Immune Response Elicited by Infection and Development of Vaccines and Treatments. *Frontiers in Immunology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-4-27]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.569760

COVID OČKOVÁNÍ, 2021. Souhrnné statistiky očkování. COVID očkování [online]. Praha: OpenDataLab, 20.6.2021 [cit. 2021-6-20]. Dostupné z: <https://ockovani.opendatalab.cz/statistiky>

DESLANDES, A., V. BERTI, Y. TANDJAOU-LAMBOTTE, Chakib ALLOUI, E. CARBONNELLE, J.R. ZAHAR, S. BRICHLER a Yves COHEN. SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2020, **55**(6) [cit. 2021-04-08]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106006

DONG, Yetian, Tong DAI, Yujun WEI, Long ZHANG, Min ZHENG a Fangfang ZHOU. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2020, **5**(1) [cit. 2021-7-8]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-020-00352-y

ELNEKAVE, Mazal, Karina FURMANOV a Avi-Hai HOVAV. Intradermal naked plasmid DNA immunization: mechanisms of action. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2014, **10**(8), 1169-1182 [cit. 2020-12-29]. ISSN 1476-0584. Dostupné z: doi:10.1586/erv.11.66

EUROPEAN MEDICINES AGENCY: EMA starts rolling review of the Sputnik V COVID - 19 vaccine [online]. 2021 [cit. 2021-7-9]. Dostupné z:

<https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-starts-rolling-review-sputnik-v-covid-19-vaccine>

EVROPSKÁ KOMISE: Bezpečné vakcíny proti koronaviru [online].2021 [cit. 2021-6-22].

Dostupné z: https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_cs

FARRIS, Eric, Deborah M BROWN, Amanda E RAMER-TAIT a Angela K PANNIER. Micro- and nanoparticulates for DNA vaccine delivery. *Experimental Biology and Medicine* [online]. 2016, **241**(9), 919-929 [cit. 2020-12-29]. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1177/1535370216643771

FOLEGATTI, Pedro M, Katie J EWER, Parvinder K ALEY, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet* [online]. 2020, **396**(10249), 467-478 [cit. 2021-04-05]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)31604-4

FRUK, Ljiljana, Christoph O.FRANCK, Luise FANSLAU, Andrea BISTROVIC POPOV a Puneet TYAGI. Biopolymer-based Carriers for DNA Vaccine Design. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. [cit. 2020-12-29]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.202010282

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? *Drugs of Today* [online]. 2018, **54**(5) [cit. 2020-12-29]. ISSN 1699-3993. Dostupné z: doi:10.1358/dot.2018.54.5.2807864

HAN, Hyun Jee, Chinekwu NWAGWU, Obumneme ANYIM, Chinedu EKWEREMADU a San KIM. COVID-19 and cancer: From basic mechanisms to vaccine development using nanotechnology. *International Immunopharmacology* [online]. 2021, **90** [cit. 2021-6-20]. ISSN 15675769. Dostupné z: doi:10.1016/j.intimp.2020.107247

HARRISON, Andrew G., Tao LIN a Penghua WANG. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology* [online]. 2020, **41**(12), 1100-1115 [cit. 2021-04-09]. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2020.10.004

HERVÉ, Caroline, Béatrice LAUPÈZE, Giuseppe DEL GIUDICE, Arnaud M. DIDIERLAURENT a Fernanda TAVARES DA SILVA. The how's and what's of vaccine

reactogenicity. *Npj Vaccines* [online]. 2019, **4**(1) [cit. 2021-5-20]. ISSN 2059-0105. Dostupné z: doi:10.1038/s41541-019-0132-6

HOBERNIK, Dominika a Matthias BROS. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(11) [cit. 2020-12-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19113605

HOVAV, Avi-Hai, Michael W. PANAS, Christa E. OSUNA, Mark J. CAYABYAB, Patrick AUTISSIER a Norman L. LETVIN. The Impact of a Boosting Immunogen on the Differentiation of Secondary Memory CD8+ T Cells. *Journal of Virology* [online]. 2007, **81**(23), 12793-12802 [cit. 2020-12-29]. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01519-07

HU, Ben, Hua GUO, Peng ZHOU a Zheng-Li SHI. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(3), 141-154 [cit. 2021-04-08]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00459-7

HUNG, Hui-Chen, Yi-Yu KE, Sheng Yu HUANG, et al. Discovery of M Protease Inhibitors Encoded by SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2020, **64**(9) [cit. 2021-6-20]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00872-20

CHANG, Le, Ying YAN a Lunan WANG. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfusion Medicine Reviews* [online]. 2020, **34**(2), 75-80 [cit. 2021-04-05]. ISSN 08877963. Dostupné z: doi:10.1016/j.tmr.2020.02.003

IAVARONE, Carlo, Derek T. O'HAGAN, Dong YU, Nicolas F. DELAHAYE a Jeffrey B. ULMER. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2017, **16**(9), 871-881 [cit. 2020-12-29]. ISSN 1476-0584. Dostupné z: doi:10.1080/14760584.2017.1355245

JESUS, Tiago F, Bruno RIBEIRO-GONÇALVES, Diogo N SILVA, Valeria BORTOLAIA, Mário RAMIREZ a João A CARRIÇO. Plasmid ATLAS: plasmid visual analytics and identification in high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, **47**(D1), D188-D194 [cit. 2021-03-23]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky1073

- JONES, Ian a Polly ROY. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *The Lancet* [online]. 2021, **397**(10275), 642-643 [cit. 2021-6-20]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)00191-4
- JORRITSMA, Sytze H.T, Eric J. GOWANS, B. GRUBOR-BAUK a D.K. WIJESUNDARA. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine* [online]. 2016, **34**(46), 5488-5494 [cit. 2020-12-29]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.062
- KAUR, Simran Preet a Vandana GUPTA. COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Research* [online]. 2020, **288** [cit. 2021-7-9]. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/j.virusres.2020.198114
- KE, Zunlong, Joaquin OTON, Kun QU, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* [online]. 2020, **588**(7838), 498-502 [cit. 2021-04-20]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2665-2
- KIRTIPAL, Nikhil, Shiv BHARADWAJ a Sang Gu KANG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2020, **85** [cit. 2021-04-19]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2020.104502
- KOWALSKI, Piotr S., Arnab RUDRA, Lei MIAO a Daniel G. ANDERSON. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Molecular Therapy* [online]. 2019, **27**(4), 710-728 [cit. 2021-04-02]. ISSN 15250016. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymthe.2019.02.012
- KRANZ, Lena M., Mustafa DIKEN, Heinrich HAAS, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* [online]. 2016, **534**(7607), 396-401 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature18300
- LEE, Jihui, Shreedevi ARUN KUMAR, Yong Yu JHAN a Corey J. BISHOP. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomaterialia* [online]. 2018, **80**, 31-47 [cit. 2021-03-28]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2018.08.033
- LI, Yen-Der, Wei-Yu CHI, Jun-Han SU, Louise FERRALL, Chien-Fu HUNG a T.-C. WU. Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19. *Journal of*

Biomedical Science [online]. 2020, **27**(1) [cit. 2021-5-16]. ISSN 1423-0127. Dostupné z: doi:10.1186/s12929-020-00695-2

MARUGGI, Giulietta, Cuiling ZHANG, Junwei LI, Jeffrey B. ULMER a Dong YU. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Molecular Therapy* [online]. 2019, **27**(4), 757-772 [cit. 2021-04-04]. ISSN 15250016. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.020

MEDICÍNSKÉ CENTRUM PRAHA, Přehled vakcín proti COVID-19: mechanismy účinku, výhody a nevýhody [online]. Praha, 2020 [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <https://www.mc-praha.cz/mcp/prehled-vakcin-proti-covid-19-mechanismy-ucinku-vyhody-a-nevyhody/>

MUDGAL, Rajat, Sanketkumar NEHUL a Shailly TOMAR. Prospects for mucosal vaccine: shutting the door on SARS-CoV-2. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2020, **16**(12), 2921-2931 [cit. 2021-5-15]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2020.1805992

O MURCHU, Eamon, Paula BYRNE, Kieran A. WALSH, et al. Immune response following infection with SARS-CoV -2 and other coronaviruses: A rapid review. *Reviews in Medical Virology* [online]. 2021, **31**(2) [cit. 2021-04-20]. ISSN 1052-9276. Dostupné z: doi:10.1002/rmv.2162

OU, Xiuyuan, Yan LIU, Xiaobo LEI, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1) [cit. 2021-7-8]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-15562-9

PACHUK, Catherine J, Daniel E. MCCCELLUS, D. B. WEINER a C. SATISHCHANDRAN. *DNA vaccines--challenges in delivery* [online]. 2000 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11249641/>

PARDI, Norbert, Michael J HOGAN a Drew WEISSMAN. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2020, **65**, 14-20 [cit. 2021-04-02]. ISSN 09527915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2020.01.008

PARDI, Norbert, Michael J. HOGAN, Frederick W. PORTER a Drew WEISSMAN. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2018, **17**(4), 261-279 [cit. 2020-12-30]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd.2017.243

PEACHMAN, Kristina K, Immunization with DNA through the skin. *Methods* [online]. 2003, **31**(3), 232-242 [cit. 2020-12-29]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/S1046-2023(03)00137-3

PEPINI, Timothy, Anne-Marie PULICHINO, Thomas CARSILLO, et al. Induction of an IFN-Mediated Antiviral Response by a Self-Amplifying RNA Vaccine: Implications for Vaccine Design. *The Journal of Immunology* [online]. 2017, **198**(10), 4012-4024 [cit. 2021-04-03]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1601877

PILLAY, Tahir S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2020, **73**(7), 366-369 [cit. 2021-7-8]. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jclinpath-2020-20665

POLACK, Fernando P., Stephen J. THOMAS, Nicholas KITCHIN, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* [online]. 2020, **383**(27), 2603-2615 [cit. 2021-5-18]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2034577

RAUCH, Susanne, Edith JASNY, Kim E. SCHMIDT a Benjamin PETSCH. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [cit. 2021-03-04]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.01963

REICHMUTH, Andreas M, Matthias A OBERLI, Ana JAKLENEC, Robert LANGER a Daniel BLANKSCHTEIN. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery* [online]. 2016, **7**(5), 319-334 [cit. 2020-12-29]. ISSN 2041-5990. Dostupné z: doi:10.4155/tde-2016-0006

SADOFF, Jerald, Mathieu LE GARS, Georgi SHUKAREV, et al. Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* [online]. 2021, **384**(19), 1824-1835 [cit. 2021-6-20]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2034201

SHEDLOCK, Devon J. a David B. WEINER. *DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity* [online]. 2000 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11129646/>

SHI, Junfeng, Yifan MA, Jing ZHU, Yuanxin CHEN, Yating SUN, Yicheng YAO, Zhaogang YANG a Jing XIE. A Review on Electroporation-Based Intracellular

Delivery. *Molecules* [online]. 2018, **23**(11) [cit. 2021-03-31]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23113044

SILVEIRA, Marcelle Moura, Gustavo Marçal Schmidt Garcia MOREIRA a Marcelo MENDONÇA. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life Sciences* [online]. 2021, **267** [cit. 2021-03-21]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2020.118919

SOW, Aïssatou Aïcha, 2020. COVID-19 vaccine update: Pfizer may bet he frontrunner, but Canada has hedged its bets. In: The Conversation [online]. United Kingdom: The conversation Trust (UK) Limited, © 2010 – 2021 [cit. 2021-7-8]. Dostupné z: https://theconversation.com/covid-19-vaccine-update-pfizer-may-be-the-frontrunner-but-canada-has-hedged-its-bets-149962?fbclid=IwAR06L_y9cDR4rqibwSgfjBWLyeDnDoMmpCpGu3FdEpGzXpZ1DgR5VB_DkZU

STEPHENSON, Kathryn E., Mathieu LE GARS, Jerald SADOFF, et al. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19. *JAMA* [online]. 2021, **325**(15) [cit. 2021-6-20]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2021.3645

TUTYKHINA, Irina L, Dmitrii.N. SHCHERBININ, M.M. SHMAROV, D. lu LOGUNOV a B. S. NARODISKII. [Advantages and prospects of the use of genetic vaccines for the protection from dangerous and socially significant infections] [online]. 2011 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22168038/>

ULMER, Jeffrey B., Peter W. MASON, Andrew GEALL a Christian W. MANDL. RNA-based vaccines. *Vaccine* [online]. 2012, **30**(30), 4414-4418 [cit. 2021-04-04]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.060

URA, Takehiro, Akio YAMASHITA, Nobuhisa MIZUKI, Kenji OKUDA a Masaru SHIMADA. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Vaccine* [online]. 2021, **39**(2), 197-201 [cit. 2021-5-16]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2020.11.054

V'KOVSKI, Philip, Annika KRATZEL, Silvio STEINER, Hanspeter STALDER a Volker THIEL. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews*

Microbiology [online]. 2021, **19**(3), 155-170 [cit. 2021-5-22]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00468-6

WANG, Mei-Yue, Rong ZHAO, Li-Juan GAO, Xue-Fei GAO, De-Ping WANG a Ji-Min CAO. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10** [cit. 2021-04-18]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.587269

WANG, Yan, Haixin CUI, Kui LI, et al. A Magnetic Nanoparticle-Based Multiple-Gene Delivery System for Transfection of Porcine Kidney Cells. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(7) [cit. 2021-6-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0102886

WORLD HEALTH ORGANIZATION, How do vaccines work? [online]. 2020 [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-do-vaccines-work>

WORLD HEALTH ORGANIZATION, The effects of virus variants on COVID-19 vaccines [online]. 2021 [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-effects-of-virus-variants-on-covid-19-vaccines>

XU, Zhe, Lei SHI, Yijin WANG, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine* [online]. 2020, **8**(4), 420-422 [cit. 2021-04-19]. ISSN 22132600. Dostupné z: doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X

ZDRAVOTNÍ POJIŠTOVNA MINISTERSTVA VNITRA ČESKÉ REPUBLIKY, © 2020. Očkování proti covidu-19. nejdůležitější otázky a odpovědi. Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra ČR [online]. Praha: Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra České republiky [cit. 2021-6-19]. Dostupné z: https://www.zpmvcr.cz/o-nas/covid-19/ockovani-proti-covidu-19-nejdulezitejsi-otazky-a-odpovedi?fbclid=IwAR1a30m7_w6K4um1S0ii-MCgyLOc5NF5rqD2C1r8u-mb3m6MBB44P599h-U