

PROFILAKTIČNA CEPIVA NA OSNOVI INFORMACIJSKE RNA PROTI NALEZLJIVIM BOLEZNIM

PROPHYLACTIC MESSENGER RNA-BASED VACCINES AGAINST INFECTIOUS DISEASES

AVTORJA / AUTHORS:

Ana Vencelj

izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Cepiva (vaccine) so praviloma profilaktična zdravila, s katerimi preprečujemo nalezljive bolezni, a razvijajo tudi terapevtske vakcine za zdravljenje (kroničnih) virusnih okužb

POVZETEK

Cepiva na osnovi informacijske RNA (mRNA) predstavljajo izjemno obetavno platformo cepiv, saj omogočajo hiter odziv na grožnje novih patogenov. Temeljijo na vnosu genskega zapisa za enega ali več antigenov povzročitelja nalezljive bolezni neposredno v celice vakcinirane osebe. Na podlagi genske informacije transfecirane celice prehodno izrazijo proteinski antigen in ga predstavijo na svoji površini v obliki peptidov, vezanih na poglavitni kompleks tkivne skladnosti. Tako predstavljene jih zaznajo limfociti T. Če usmerimo antigen na celično membrano ali v zunajcelični prostor, pride tudi do robustnega humoralnega imunskega odziva. V zadnjem desetletju beležimo precejšen napredek na področjih encimske sinteze mRNA, razumevanja imunomodulatornih lastnosti same eksogene mRNA in dostavnih sistemov mRNA-cepiv ter doseganja učinkovite transfekcije in translacije *in vivo*, kar je omogočilo nedavno odobritev prvih tovrstnih cepiv v Evropski uniji in ZDA. V prispevku predstavljamo mehanizme delovanja, način proizvodnje in dosedanje klinične izkušnje s profilaktičnimi mRNA-cepivi proti nalezljivim boleznim.

KLJUČNE BESEDE:

cepivo, klinične raziskave, mehanizem delovanja, mRNA

ABSTRACT

Messenger RNA (mRNA) vaccines are an extremely promising vaccine platform, as they allow for immediate response to new pathogen threats. mRNA vaccines are based on introducing genetic information for one or more antigens of a pathogen directly into cells of a vaccinated individual. The transfected cells use this genetic information to transiently express the encoded protein antigen and display it on the cell surface in the form of antigenic peptides bound to major histocompatibility complex, thereby activating T lymphocytes. If the encoded intact antigen is directed to the cell surface or the extracellular space, robust humoral response is also observed. In the last decade, important progress has been made in the areas of enzymatic mRNA synthesis, understanding im-



munomodulatory properties of exogenous mRNA as well as materials for mRNA delivery, and optimizing transfection and *in vivo* translation efficiency, leading to approval of first mRNA-based vaccines in the European Union and United States. Here, we review the mechanisms of actions, production technologies and current clinical experience with prophylactic mRNA vaccines against infectious diseases.

KEY WORDS:

clinical trials, mechanism of action, mRNA, vaccine

in rakavih boleznih. V članku se osredotočamo izključno na profilaktična cepiva na osnovi informacijske RNA (mRNA). Ta relativno nova platforma je zelo obetavna, saj omogoča izjemno hiter odziv na grozeče epidemije virusnih boleznih, kot se je izkazalo v aktualnem primeru covid-19 – vsega deset mesecev po tem, ko je Svetovna zdravstvena organizacija razglasila pandemijo, sta prejeli pogojno dovoljenje za promet v EU in ZDA že dve cepivi na osnovi mRNA, še 14 takih cepiv proti covid-19 pa trenutno po svetu vrednotijo v kliničnih raziskavah (1). mRNA-cepiva so privlačna tudi, ker dobro posnemajo proces naravne okužbe z vidika procesiranja in predstavljanja virusnih antigenov (za razliko od konvencionalnih inaktiviranih ali proteinskih vakcin), kar je ključnega pomena za proženje tako humoralnega kot celičnega imunskega odziva (2).

Leta 1989 so prvič poročali o uspešnem izražanju modelnega proteina luciferaze po transfekciji evkariontskih celic z mRNA, pripravljeno s transkripcijo *in vitro* (3). Leto kasneje je ista raziskovalna skupina potrdila tudi izražanje več poročevalskih genov po vnosu pripadajočih mRNA v mišje skeletne mišične celice *in vivo* (4). Od takrat je tehnologija terapevtikov na osnovi nukleinskih kislin močno napredovala: kopičilo se je znanje o potrebnih regulatornih elementih, ki vplivajo na biološko razpolovno dobo mRNA v celicah in na nivo izražanja kodiranega proteina, strukturnih modifikacijah, ki uravnavajo imunomodulatorne lastnosti eksogene mRNA, ter dostavnih sistemih. V zadnjem desetletju so številni raziskovalci pokazali, da vnos primerno izbranega genskega zapisa za proteinski antigen patogena intradermalno, subkutano ali intramuskularno izzove oblikovanje imunskega spomina, ki živali zaščiti pred okužbo, čemur je sledilo tudi vrednotenje varnosti in imunogenosti mRNA-cepiv na človeških prostovoljcih (2, 5).

2 KAJ SO CEPIVA NA OSNOVI mRNA IN KAKO DELUJEJO?

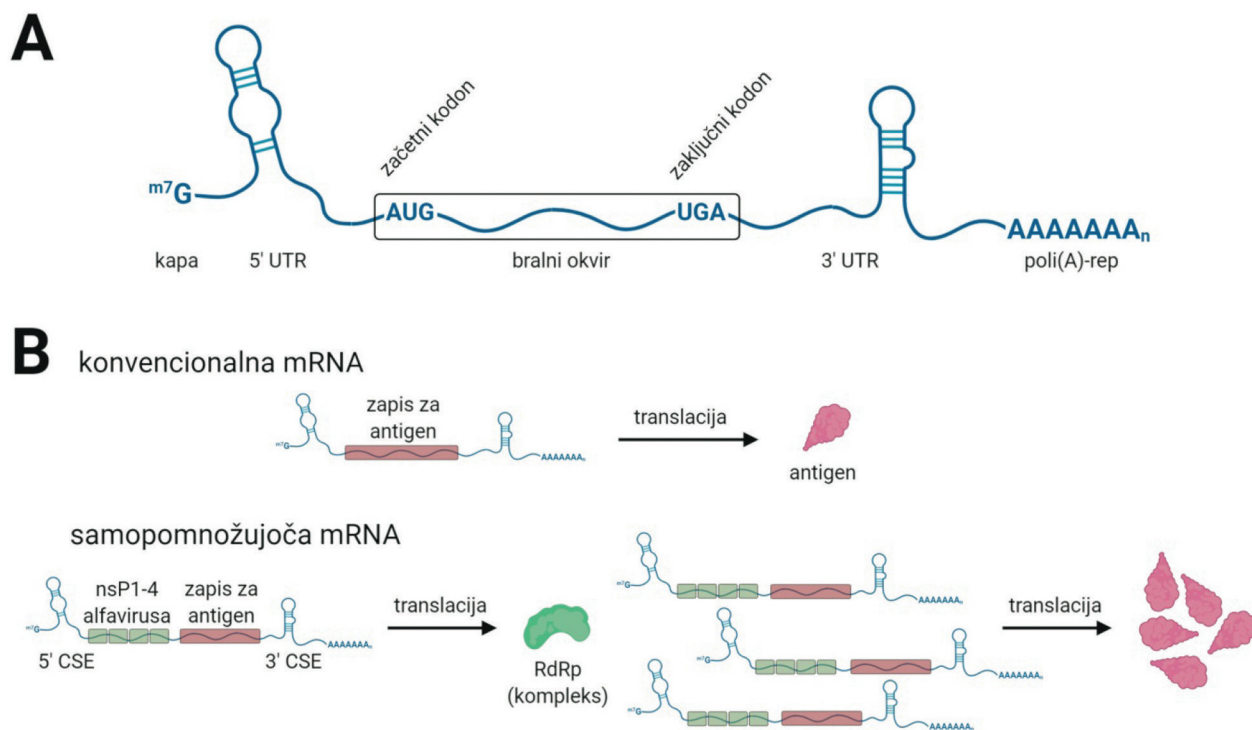
Najenostavnejša mRNA-cepiva kot učinkovino vsebujejo mRNA, ki nosi zgolj genski zapis za proteinski antigen patogena. Zaradi kemijske in encimske nestabilnosti molekul RNA ter za doseganje učinkovitejše dostave v celice mRNA običajno vgradijo v lipidne nanodelce, redkeje nanodelce iz kationskih polimerov, ali tvorijo komplekse s pozitivno nabitimi proteini, kakršen je protamin (podpoglavje 3.3). mRNA sintetizirajo encimsko v procesu transkripcije *in vitro* na osnovi lineariziranega plazmida, ki nosi genski zapis za antigen pod nadzorom bakteriofagnega promotora (T7, T3 ali SP6) (2, 5). Minimalne strukturne zahteve za mRNA so predstavljene na sliki 1A. Transkript posnema zrelo mRNA, kakršna se nahaja v citosolu evkariontskih celic, in je sestavljen iz bralnega okvirja (kodirajoče regije), ki ga obdajata neprevedeni regiji (*untranslated regions*, UTR), na 5'-koncu mRNA je prisotna kapa iz 7-metilgvanozina, povezanega s prvim nukleotidom prek 5'-trifosfatne skupine, na 3'-koncu pa rep iz 100 do 250 adenozijskih ostankov. Ti regulatorni neokodirajoči elementi ščitijo mRNA pred razgradnjo z nukleazami in so ključni za proces translacije (sinteze kodiranega proteina). Encimska sinteza mRNA je izjemno učinkovita (poročajo o donosih, višjih od 2 g mRNA/L), neodvisna od nukleotidnega zaporedja in njen obseg je mogoče razmeroma enostavno povečati (2). Način proizvodnje, ki za razliko od konvencionalnih vakcin na proteinski osnovi (atenuiranih, inaktiviranih in rekombinantnih proteinskih cepiv) ali virusnih vektorskih cepiv ne zahteva uporabe celičnih kultur ali jajc, omogoča hitro in cenovno ugodno pripravo učinkovine ter zagotavlja odsotnost vsakršnih kontaminantov, kot so virusi ali proteini ekspresijskega sistema. Po transkripciji *in vitro* matrično DNA razgradijo z DNazo, mRNA pa kromatografsko prečistijo, da odstranijo encime, proste nukleotide, fragmente DNA in nepopolno sintetizirano RNA. Sledi še sterilizacija s filtracijo in vgradnja v ustrezen dostavni sistem (2, 5).

Poleg t. i. konvencionalnih mRNA-cepiv nekatera podjetja razvijajo tudi samopomnožujoča mRNA-cepiva (slika 1B, preglednica 1) (2, 6). Ta so osnovana na genomu alfavirusov in so kot taka pravzaprav vektorska cepiva, ki jih proizvajamo s transkripcijo *in vitro* ali pomnoževanjem in pakiranjem v virusne delce s pomočjo posebnih pakirnih celičnih linij, ki izražajo alfavirusne strukturne proteine. Pri načrtovanju samopomnožujočih mRNA-cepiv iz genoma alfavirusov odstranijo gene za strukturne proteine in jih nado-

mestijo z zapisom za želeni antigen, ohranijo pa regulatorne elemente (5'-kapo, 5'- in 3'-cis elemente (CSE) in poli(A)-rep) ter gene za nestrukturane proteine nsP1-4, ki tvorijo replikazni kompleks (od RNA odvisno RNA-polimerazo, *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp). Po vstopu v celico se tako najprej tvori RdRp, ki ustvari kopije virusnega vektorja, kar omogoča uporabo bistveno nižjih odmerkov cepiva in daljše izražanje antigena.

Ribonukleinske kisline so izrazito nestabilne molekule, kar zelo zaplete in posledično podraži logistiko (shranjevanje, transport in organizacijo) cepljenja s cepivi na osnovi mRNA. Osnovni razlog kemijske nestabilnosti RNA je nukleofilna narava hidroksilne skupine na položaju 2' riboze

(ta je v sicer strukturno sorodni molekuli DNA odsotna), ki – zlasti v alkalnem okolju, ko se deprotonira – napade fosforjev atom v sosednji fosfodiesterški vezi. Proces poteka predvsem na izpostavljenih 2'-hidroksilnih skupinah nestrukturirane (tj. enoverižne) RNA. Posledica je cepitev estrske vezi in nastanek 2',3'-cikličnega fosfatnega intermedija, ki hidrolizira do 2'- ali 3'-fosfata (7). Dolgoročno kemijsko stabilnost RNA v splošnem zagotavljamo s shranjevanjem RNA pri ekstremno nizkih temperaturah in nevtralnem pH ali z liofilizacijo. Izpopolnjene formulacije mRNA-cepiv lahko pomembno prispevajo k večji stabilnosti mRNA in ji hkrati nudijo zaščito pred hidrolizo z RNazami *in vivo* (8).



Slika 1: Močno poenostavljena struktura mRNA za vnos genskega zapisa za proteinski antigen (prirejeno po (6)). **A.** Splošni funkcijski elementi zrele evkariontske mRNA: 5'-kapa (7-metilgvanozin, m7G), 5'-neprevedena regija (5'-UTR), bralni okvir, ki ga omejujeta začetni in zaključni kodon, 3'-UTR in 3'-poliadenozinski (poli(A)) rep. **B.** Primerjava konvencionalnih in samopomnožujočih mRNA-cepiv. Prva nosijo le zapis za antigen, druga (osnovana na alfavirusnem vektorju) pa tudi gene za proteine nsP1-4, ki skupaj tvorijo replikazni kompleks, ki v celicah ustvarja kopije virusnega vektorja. CSE – cis-regulatorni element, RdRp – od RNA odvisna RNA-polimeraza. Sliko smo pripravili z BioRenderjem.

Figure 1: A simplified depiction of mRNA for delivery of genetic information encoding a protein antigen (adapted from (6)). **A.** General functional elements of mature eukaryotic mRNA: 5' cap (7-methyl guanosine, m7G), 5' untranslated region (UTR), open reading frame flanked by start and stop codons, 3' UTR and polyadenosine (poly(A)) tail. **B.** Comparison of conventional and self-amplifying mRNA vaccines. The former only encode an antigen, whereas the latter (based on alphavirus) in addition harbour genes encoding proteins nsP1-4 which form the replicase complex responsible for amplifying the viral vector. CSE – cis-acting element, RdRp – RNA-dependent RNA polymerase. Graphics made with BioRender.

Preglednica 1: Nekatere prednosti in pomanjkljivosti/slabosti konvencionalnih in samopomnožujočih mRNA-cepiv (povzeto po (9)).
Table 1: Advantages and disadvantages of conventional and self-amplifying mRNA vaccines (adopted from (9)).

Platforma	Prednosti	Pomanjkljivosti/slabosti
Konvencionalna in samopomnožujoča mRNA-cepiva	- encimska sinteza, ne uporabljamo jajc ali celičnih kultur za proizvodnjo - možnost hitre in obsežne proizvodnje - cepiva neinfektivna, ne prihaja do integracije v genom prejemne celice, razgradnja mRNA z endogenimi celičnimi mehanizmi - izražanje <i>in situ</i>: nativen proteinski antigen - aktivacija mehanizmov prirojene imunosti okrepi humoralno in celično imunost	- nestabilnost RNA - v nekaterih primerih opažena nižja imunogenost pri ljudeh v primerjavi s poskusnimi živalmi (prenosljivost rezultatov; poglavje 4), nova tehnologija - vnetni proces zaradi sproščanja IFN tipa I - težave, povezane z učinkovito dostavo v celice
Konvencionalna mRNA-cepiva	- mRNA krajša v primerjavi s samopomnožujočo mRNA - možna vgradnja spremenjenih nukleozidov - neposredno izražanje antigena iz mRNA - imunski odziv proti vektorju ni prisoten	- potrebni višji odmerki - izražanje antigena časovno krajše - morebitna toksičnost spremenjenih nukleotidov, nova tehnologija - višja cena in zapletena logistika cepljenja v primerjavi s »klasičnimi« (inaktiviranimi ali oslabljenimi) cepivi
Samopomnožujoča mRNA-cepiva	- močnejše in časovno daljše izražanje antigena - potrebni nižji odmerki - intrinzično adjuvantno delovanje - apoptoza transfeciranih celic vodi do okrepljenega prevzema proteinskih antigenov s strani APC in predstavljanja antigenov z MHC I - možnost dostave več antigenov z enim vektorjem	- vnetni proces zaradi pomnoževanja vektorja - mRNA daljša v primerjavi s konvencionalnimi mRNA (težavnejša proizvodnja) - morebitna toksičnost proteinov nsP - možen imunski odziv proti vektorju

APC – antigen predstavitvena celica, IFN – interferon, MHC – poglobitni kompleks tkivne skladnosti

2.1 PREVZEM mRNA IN SPROŠČANJE IZ ENDOSOMOV

RNA so velike in na račun fosfatnih skupin v sladkorno-fosfatnem ogrodju izrazito negativno nabite molekule, kar otežuje njihovo učinkovito dostavo v celice. Z mRNA-cepivi lahko transfeciramo antigen predstavitvene celice, zlasti dendritične celice, *ex vivo* ali pa vakcino injiciramo neposredno, največkrat v mišično tkivo (2). Transfekcija dendritičnih celic *ex vivo* in njihova avtologna infuzija je oblika celičnega zdravljenja, ki jo razvijajo za boj proti rakavim boleznim, zato je v prispevku ne obravnavamo podrobno. mRNA-cepiva največkrat formulirajo v obliki nanodelcev (premera približno 100 nm) iz kationskih lipidov (2, 5). Ce-

lična površina je namreč negativno nabita; kationski lipidi tako omogočijo ne le nevtralizacijo negativnih nabojev na mRNA, temveč so ključnega pomena tudi za tvorbo elektrostatskih interakcij med celično površino in nanodelci ter za kasnejše sproščanje iz endosomov. Kationskim lipidom so praviloma dodani še naravni fosfolipidi, ki pomagajo pri tvorbi lipidnega dvosloja, holesterol kot stabilizator membrani in na lipide vezan polietilenglikol (PEG) za izboljšanje koloidne stabilnosti nanodelcev (lipopleksov; podpoglavje 3.3) (5). Raziskave na živalih so pokazale, da sistemska aplikacija lipopleksov vodi do kopičenja mRNA v hepatocitih (na račun vezave na apolipoprotein E in posledične receptorsko posredovane endocitoze) (10), medtem ko subkutana, intradermalna in intramuskularna aplikacija zagota-

vljajo lokalno in nekoliko daljše izražanje kodiranih proteinov, kar je ugodno z vidika proženja imunskih odzivov (11, 12). Lipopleksi vstopajo v celice v zapletenem procesu endocitoze, pri čemer pride do uvihanja celične membrane, ki se odcepi in tvori endosomske vezikle. Ti zorijo in se zlivajo z lizosomi, ki dostavljajo presnovne hidrolitične encime, zato mora mRNA še pravočasno zapustiti endosome in vstopiti v citosol, s čimer se izogne razgradnji (5). Ni povsem jasno, kakšen je mehanizem sproščanja mRNA iz endosomov, a verjetno zajema zlitje membrane lipopleksa in endosoma, zato sestava lipidnih komponent dostavnega sistema pogojuje učinkovitost transfekcije.

mRNA sama po sebi deluje imunostimulatorno, saj aktivira številne endosomske (TLR7 in TLR8) in citosolne receptorje (RIG-I in MDA-5) prirojene imunosti, kar vodi do sproščanja interferonov tipa I (IFN-I) in nekaterih drugih vnetnih citokinov (2, 13). Po eni strani je to dobrodošlo, saj aktivira antigen predstavitvene celice in okrepi imunski odziv proti kodiranemu antigenu, a interferonska signalizacija nespecifično zavre tvorbo proteinov v celicah, kar oslabi proces izražanja antigena. Nekatera cepiva na osnovi mRNA zato vsebujejo spremenjene nukleozide, ki so manj imunostimulatorni (podpoglavje 3.1). Samopomnoževalna mRNA-cepiva, ki se namnožujejo v celicah, seveda vsebujejo le običajne nukleotide, hkrati pa se med pomnoževanjem tvori dvovertična struktura RNA, ki je izrazito imunostimulativna, zato imajo močan adjuvantni učinek (2). Proteini, ki tvorijo replikazni kompleks, za organizem predstavljajo neoantigene, zato lahko pride do imunskega odziva proti samemu vektorju, kar utegne voditi do manj učinkovitega imunskega odziva pri nadaljnjih cepljenjih z enako platformo, saj bi predhodno senzitivizirani citotoksični limfociti uničili transfecirane celice, še preden bi te izdelale proteinski antigen cepiva.

2.2 TRANSLACIJA

mRNA se ne prenese v celično jedro (kot to velja za gensko informacijo DNA-vektorskih cepiv) in v citosolu vstopa neposredno v ribosome, ki na osnovi predstavljenega nukleotidnega zaporedja sintetizirajo polipeptidno verigo antigena. Čeprav v celice vnašamo tujo gensko informacijo, veljajo cepiva na osnovi mRNA z vidika insercijske mutageneze za nadvse varna, torej ni nikakršne možnosti za integracijo v genom. Antigen se zaradi takojšnjega začetka translacije tvori izjemno hitro in ker je sintetiziran *in situ*, je polipeptidna veriga pravilno zvita, protein je deležen vseh ustreznih posttranslacijskih modifikacij in je usmerjen na ustrezno mesto v celici (npr. v celično membrano) (2).

mRNA ima razmeroma kratko življenjsko dobo in se sčasoma razgradi, zato je izražanje antigena prehodne narave.

2.3 PROCESIRANJE IN PREDSTAVLJANJE ANTIGENA

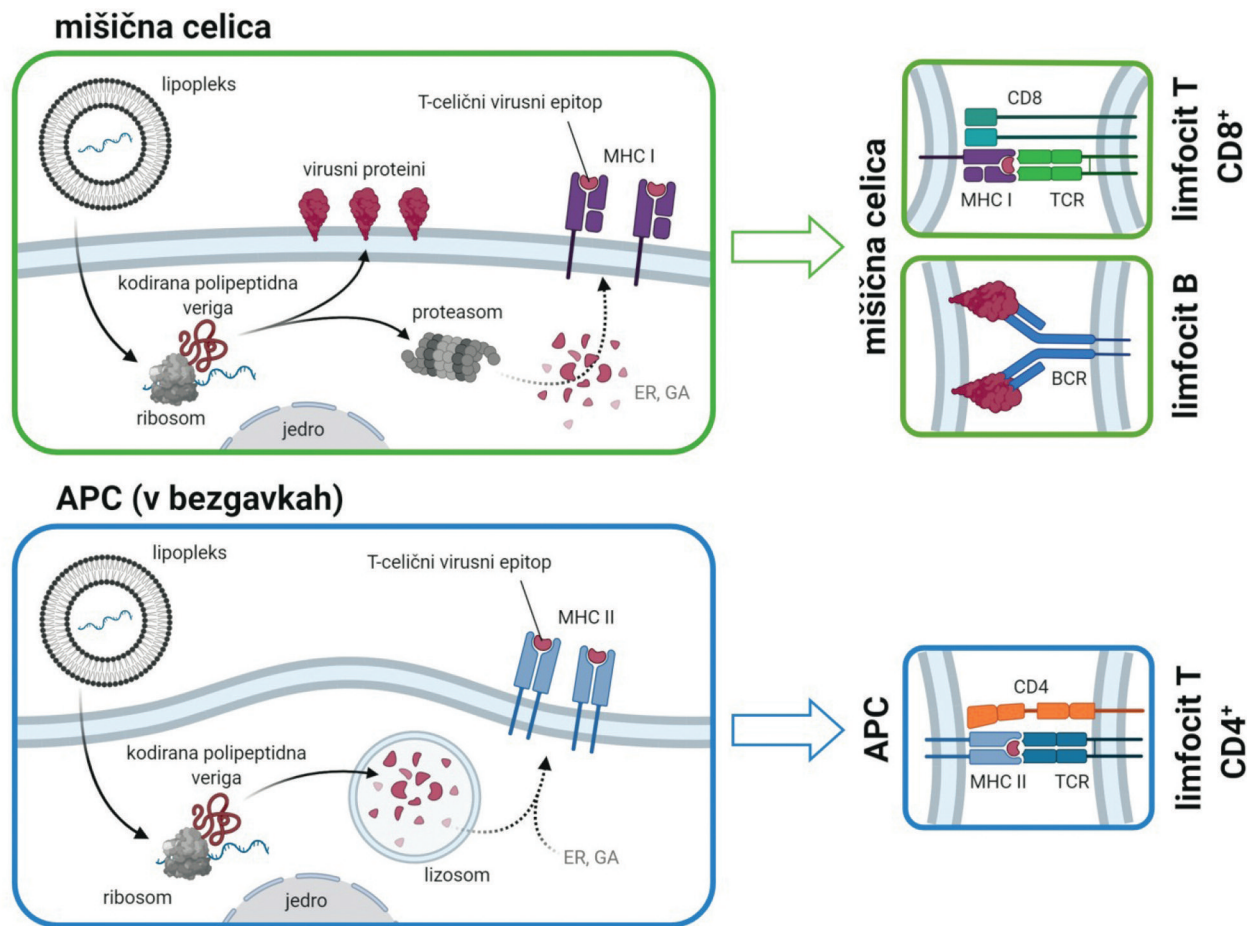
mRNA-cepiva z izražanjem antigena neposredno v transfecirani celici posnemajo proces virusne okužbe (2). Mišične celice izdelajo kodiran virusni membranski protein in ga izrazijo na svoji površini, kjer ga zaznajo limfociti B (slika 2). Del nastalega antigena celice razgradijo s specializiranimi proteaznimi kompleksi v citosolu, imenovanimi proteasomi. Nastali peptidi se prenesejo v lumen endoplazemskega retikuluma, kjer se vežejo na poglavitni kompleks tkivne skladnosti I (MHC I), od tam pa z vezikularnim transportom potujejo prek Golgijevega aparata na celično površino. Antigenske peptide, vezane na MHC I, prepoznajo citotoksični limfociti T (CD8⁺). mRNA prvenstveno vstopa v antigen predstavitvene celice (dendritične celice in makrofage), ki so sposobne tudi alternativnega procesiranja antigenov (slika 2), pri čemer antigenske peptide izrazijo na MHC II. V tej obliki antigen zaznajo T-celice pomagalk (CD4⁺), ki uravnavajo aktivacijo in diferenciacijo limfocitov B in citotoksičnih limfocitov T. Upoštevajoč še imunomodulatorno delovanje same sintezne mRNA so mRNA-cepiva sposobna izzvati širok spekter imunskih odzivov.

3 POMEMBNEJŠE INOVACIJE NA PODROČJU mRNA-CEPIV

Poglavitne težave, ki so ovirale klinični razvoj mRNA-cepiv, so nestabilnost RNA, neučinkovita dostava mRNA v celice in dejstvo, da transfekcija z eksogeno RNA lahko izzove vnetne procese. Optimizacija procesov formulacije, zlasti vgradnja mRNA v lipidne nanodelce, nudi zaščito RNA pred zunanjimi vplivi in omogoča učinkovito dostavo v celice, medtem ko z optimizacijo strukture mRNA lahko odločilno vplivamo na njeno zaznavanje s celičnimi receptorji prirojene imunosti in izboljšamo učinkovitost translacije *in vivo*.

3.1 OPTIMIZACIJA STRUKTURE mRNA

Endogena mRNA v jedru evkariontskih celic doživi posttranskripcijske modifikacije, kot sta pripenjanje 5'-kape in 3'-poli(A)-repa. Pri transkripciji *in vitro* je ta funkcionalna

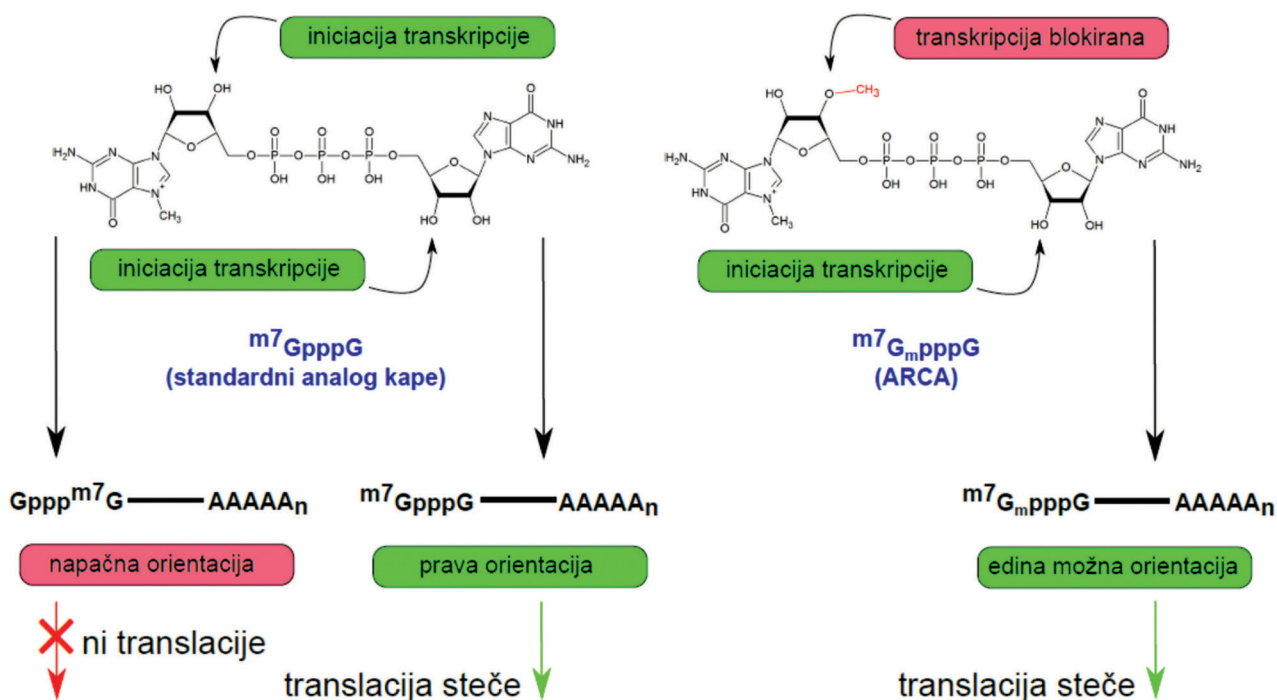


Slika 2: Procesiranje in predstavljanje antigenov po vstopu sintezne mRNA v celice (prirejeno po (14)). Zgoraj: Mišične celice na površini izražajo nativne membranske virusne proteine, ki jih prepoznajo limfociti B, in pripadajoče antigenske peptide (nastale pri razgradnji s proteasomom), vezane na poglavitni kompleks tkivne skladnosti I (MHC I), ki jih prepoznajo citotoksični limfociti T (CD8+). Spodaj: Antigen predstavitevne celice (APC) procesirajo proteinske antigene na enak način (ni prikazano), hkrati pa jih delno razgradijo tudi v endosomskih veziklih. Antigenski peptidi se nato vežejo na MHC II in z vezikularnim transportom potujejo v celično membrano, kjer jih prepoznajo T-celice pomagalke (CD4+). BCR – B-celični receptor, ER – endoplazemski retikulum, GA – Golgijev aparat, TCR – T-celični receptor. Sliko smo pripravili z BioRenderjem.

Figure 2: Antigen processing and presentation after synthetic mRNA entry into cells (adapted from (14)). Upper panel: Muscle cells display native viral membrane proteins on their surface, allowing antigen recognition by B lymphocytes. A fraction of synthesized antigens is degraded in the cytosol by proteasomes and the resulting antigenic peptides are displayed on cell surface bound to type I major histocompatibility complex (MHC I), allowing recognition by cytotoxic lymphocytes T (CD8+). Lower panel: In addition to mechanisms of antigen processing described above (not shown) specialized antigen presenting cells also degrade proteins in endosomal vesicles. The antigenic peptides are bound to MHC II and transferred to cell surface via vesicular transport, where they are recognized by helper T cells (CD4+). BCR – B cell receptor, ER – endoplasmic reticulum, GA – Golgi apparatus, TCR – T cell receptor. Graphics made with BioRender.

elementa zrele mRNA potrebno dodati naknadno (2, 5). Kapo na 5'-konec sinteznih transkriptov dodajo encimsko (tj. z uporabo rekombinantnega encimskega kompleksa virusa vakcinije) ali pa že med transkripcijo uporabijo analoge kape (*anti-reverse cap analogue*, ARCA; slika 3), pri katerih je 3'-hidroksilna skupina 7-metilgvanozina metili-

rana, kar zagotavlja pravilno orientacijo kape (15). Tudi poli(A)-rep je mogoče dodati po zaključeni transkripciji z rekombinantnim encimom poli(A)polimerazo iz bakterije *E. coli*, a je bolj ekonomična uporaba matrične DNA z zapisom za dolgo zaporedje adenzinov, tako nastala mRNA pa ima tudi bolj definirano dolžino poli(A)-repa.



Slika 3: Transkripcija *in vitro* z uporabo standardnega analoga 7-metilgvanozinske kape (levo) in analoga ARCA (anti-reverse cap analogue; desno), katerega 3'-hidroksilna skupina je metilirana (povzeto po (16)). Če pri encimski sintezi uporabijo dinukleotid m^7GpppG , približno polovica transkriptov nosi 5'-kapo v napačni orientaciji. Nanje se iniciacijski dejavnik translacije eIF-4E ne veže, zato je translacija *in vivo* bistveno manj učinkovita. Če uporabijo dinukleotid ARCA (m^7G_mpppG), nastanejo le transkripti s 5'-kapo ustrezne orientacije in učinkovitost translacije je visoka. **Figure 3:** *In vitro* transcription using the standard 7-methylguanosine cap analogue (left) and the anti-reverse cap analogue (ARCA; right) with 3' hydroxyl group methylated (adopted from (16)). If the standard dinucleotide m^7GpppG is used in enzymatic synthesis, about a half of transcripts harbours the 5' cap in reverse orientation. As the translation initiation factor eIF-4E does not bind reverse capped products, the *in vivo* translation is fairly inefficient. On the other hand, the use of ARCA dinucleotide (m^7G_mpppG) leads to a single correctly capped product, significantly increasing the extent of translation.

Optimizacija kodirajočega zaporedja je smiselna z vidika uporabe pogostejših alternativnih kodonov za isti aminokislinski ostanek in odstranitev višjih struktur mRNA (kot posledice lokalnega zvitja, npr. tvorbe zank ali lasnic), kar pripomore k učinkovitosti procesa translacije (2, 5). 5'-UTR je vpletena v iniciacijo translacije, 3'-UTR pa uravnava stabilnost mRNA in obseg izražanja proteina. Pomembni dejavniki, ki določajo funkcionalnost neprevedenih regij, so nukleotidno zaporedje, dolžina in sekundarna struktura (2, 5), zato je racionalno načrtovanje teh funkcionalnih elementov nemogoče. Praviloma uporabijo neprevedene regije genov, za katere je znano, da povečajo stabilnost in okrepijo izražanje mRNA. Orlandini von Niessen in sodelavci (17) so pripravili knjižnico 3'-UTR dolgoživih mRNA in s poročevalskim celičnim testom izbrali več funkcijskih elementov, ki so omogočali do trikrat višjo produkcijo kodiranih proteinov *in vivo* v primerjavi s konvencionalno 3'-UTR iz človeškega gena za β -globin. Optimizacija izražanja antigena

je v vakciniranih miših pričakovano izzvala tudi močnejši imunski odziv.

Pomemben napredek pri optimizaciji delovanja mRNA-cepiv je tudi zmanjševanje imunostimulatornih lastnosti sintezne mRNA. Znano je, da določena, zlasti z uridinom bogata nukleotidna zaporedja v RNA aktivirajo t. i. vzorčno prepoznavne receptorje TLR7 in TLR8 (18, 19), zato z zamenjavo uridinov za njegove analoge, ki se sicer naravno pojavljajo v RNA kot posledica posttranskripcijskih modifikacij (kot sta psevdouridin ali N1-metilpsevdouridin), lahko močno omejijo vnetne procese po vakcinaciji z mRNA in omogočijo boljše izražanje antigena.

3.2 OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE mRNA

Uvedba 5'-kape in 3'-poli(A)-repa med postopkom transkripcije *in vitro* (podpoglavje 3.1) je stroškovno učinkovita,

ker ne zahteva ločenih encimskih reakcij z vmesno izolacijo in čiščenjem RNA s precipitacijo. Tako so izgube med procesom proizvodnje učinkovine manjše. Končno čiščenje sintezne mRNA s HPLC je potrebno za odstranitev nečistot, ki izhajajo iz encimske sinteze; zlasti je problematična dvo-verižna RNA, ki aktivira receptorja TLR3 in RIG-I. Čiščenje s HPLC ima omejeno kapaciteto, zato so Baidersdorfer in sodelavci razvili alternativen način čiščenja, ki je osnovan na selektivni adsorpciji dvoverižne RNA na celulozo (20). Metoda je enostavna, cenovno zelo ugodna in učinkovita primerljivo s HPLC.

3.3 OPTIMIZACIJA DOSTAVNIH SISTEMOV ZA mRNA

Ustrezna formulacija mRNA je osrednjega pomena tako za učinkovito dostavo *in vivo* kot za zagotavljanje stabilnosti cepiva, obenem pa mora biti dostavni sistem biokompatibilen in netoksičen. Verjetno največji napredek pri razvoju mRNA-cepiv beležimo ravno na področju razvoja dostavnih sistemov (21), a so podrobnosti (kvantitativna sestava in način formulacije) poslovna skrivnost proizvajalcev cepiv. V obeh odobrenih mRNA-cepivih proti SARS-CoV-2 (preglednica 2) je mRNA, ki kodira virusni protein S, vgrajena v lipidne nanodelce, ki vsebujejo kationske lipide (ALC-0315 (((4-hidroksibutil)azandiil)bis(heksan-6,1-diil)bis(2-heksildekanoat); Comirnaty (Pfizer/BioNTech)) ali SM-102 (heptadekan-9-il 8-((2-hidroksietil)(6-okso-6-(deciloksi)heksil); COVID-19 Vaccine Moderna (Moderna)), ob tem pa še PEGilirane lipide (ALC-0159 (2-[PEG-2000]-N,N-ditetradecilacetamid; Comirnaty) ali PEG2000 DMG (1,2-dimiristol-rac-glicerol-3-metoksiPEG-2000; COVID-19 Vaccine Moderna) ter DSPC (1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfoholin) in holesterol. Nekatera od mRNA-cepiv, ki so do sedaj dosegla fazo predkliničnega in zgodnjega kliničnega razvoja, so slonela tudi na uporabi protamina, amfipatičnih peptidov, ki prehajajo lipidne membrane, ali kationskih polimerov (npr. polietilenimina, PEI) (21). Ker je PEI razmeroma citotoksičen, ga zamenjujejo za acilirane analoge (npr. funkcionalizirane s stearinsko kislino), ki izkazujejo boljši varnostni profil (npr. (22)). Zelo obetaven dostavni sistem predstavljajo tudi oligo(karbonat-b- α -amino estri), t. i. CART (*charge-altering releasable transporters*). Ti kot kationski polimeri sprva tvorijo nekovalentne komplekse z mRNA, ki učinkovito vstopajo v celice, ob spontani razgradnji do nevtralnih amidov v endosomih pa izgubijo pozitiven naboj in tako olajšajo sproščanje mRNA v citosol (23).

4 KLINIČNE IZKUŠNJE S CEPIVI NA OSNOVI mRNA

Cepiva na osnovi mRNA niso popolna novost, saj prva klinična raziskava s konvencionalnim mRNA-cepivom sega v leto 2013, že pred tem pa so človeškim prostovoljcem injicirali tudi samopomnožujočo alfavirusno RNA, pakirano v virusne delce (preglednica 2). Dosegljiva poročila kliničnih raziskav potrjujejo varnost takšnih profilaktičnih vakcin, vendar pa imunogenosti, ki so jo potrdili v predkliničnih raziskavah, niso vselej opazili tudi pri človeških prostovoljcih. V kliničnih raziskavah prve faze, v katerih so vrednotili varnost in imunogenost mRNA-cepiv s spremenjenimi nukleotidi, formuliranih v obliki lipidnih nanodelcev, proti virusu gripe sevov H10N8 (NCT03076385) in H7N9 (NCT03345043) (24), so v nasprotju s poskusi na živalih (miših, dihurjih in makakih) po cepljenju ljudi zabeležili razmeroma šibko in kratkotrajno imunost. Zanimiva so tudi opažanja iz klinične raziskave prve faze, v kateri so vrednotili imunogenost mRNA-cepiva z nespremenjenimi nukleotidi v kompleksu s protaminom proti steklini (NCT02241135) (25). Cepivo je po intradermalnem injiciranju uspešno zaščitilo miši pred okužbo ter izzvalo močan in dolgotrajen imunski odziv pri prašičih (26). Človeškim prostovoljcem so cepivo injicirali intramuskularno ali intradermalno, bodisi z uporabo brizg in igel ali z brezigelnim injektorjem. Nepričakovano so le prostovoljci, vakcinirani z brezigelnim injektorjem, razvili nevtralizirajoča protitelesa, a je bil imunski odziv razmeroma variabilen in je izzvenel po enem letu (25). Ta opažanja nakazujejo, da obstajajo pomembne medvrstne razlike v imunogenosti mRNA-cepiv, ki so verjetno posledica razlik v zaznavanju eksogene mRNA ali komponent dostavnih sistemov z receptorji nespecifične imunosti, ob tem pa velja veliko pozornost v kliničnih raziskavah posvetiti ne le višini odmerka in časovnim intervalom med ponovljenimi cepljenji, temveč tudi načinu aplikacije.

Največ podatkov o učinkovitosti in varnosti mRNA-cepiv so seveda zbrali za obe pogojno že odobreni cepivi proti virusu SARS-CoV-2. Obsežni klinični raziskavi tretje faze sta zajeli tudi starejše odrasle, ljudi z raznolikim genetskim ozadjem (etnično poreklo) in bolnike z boleznimi, ki so znan dejavnik tveganja za hujši potek covid-19 (astma, kronične pljučne bolezni, indeks telesne mase ≥ 30 , sladkorna bolezen, hipertenzija). Učinkovitost cepiv (zaščita pred covid-19) je ocenjena na visokih 95 % (95-odstotni interval zaupanja: 90,0–97,9; Comirnaty (Pfizer/BioNTech) (27)) oz.

94,1 % (95-odstotni interval zaupanja: 89,3–96,8; COVID-19 mRNA Vaccine (Moderna) (28)). Tudi če je pri cepljenih posameznikih prišlo do okužbe s SARS-CoV-2, je bolezen potekala v blagi obliki. Med zdravimi prostovoljci in kroničnimi bolniki bistvenih razlik v učinkovitosti cepiv niso opazili, podobno velja za različne starostne skupine. Reakto-genost je bila nekoliko bolj izražena pri mlajših udeležencih klinične raziskave, neželeni učinki so bili pretežno blagi in so hitro izzveneli. Najpogosteje so poročali o bolečinah na mestu vnosa cepiva, utrujenosti, glavobolu, bolečinah v mišicah ali sklepkih in pireksiji. Pri redkih prostovoljcih (4/21.720 (NCT04368728); 3/15.210 (NCT04470427)), ki so prejeli cepivo (in pri enem udeležencu iz skupine, ki je prejela placebo (1/15.210 (NCT04470427)) se je pojavila prehodna paraliza obraznega živca (Bellova pareza), po začetku množičnega cepljenja pa poročajo o sicer izjemno redkih alergijskih reakcijah. Pri tem velja izpostaviti, da aler-

gijske bolezni dihal in kože, anafilaksija po pikih žuželk, hrani ali zdravilih niso kontraindikacije za cepljenje s tema cepivoma (29). Cepijo se lahko tudi imunokompromitirani posamezniki in bolniki, ki prejemajo imunosupresivna zdravila, a je učinkovitost cepljenja pri teh verjetno nižja. Pregled dosedanjih kliničnih vrednotenj profilaktičnih cepiv na osnovi mRNA proti nalezljivim boleznim je zbran v preglednici 2. Večina raziskav zajema uporabo mRNA, ki po cepljenju izzovejo nastajanje enega ali več (gliko)proteinskih antigenov virusnih patogenov in s tem sprožijo aktivno imunizacijo proti povzročitelju nalezljive bolezni. Nasprotno v eni manjši klinični raziskavi prve faze vrednotijo varnost, farmakokinetiko in farmakodinamiko mRNA, ki kodira nevtralizacijsko monoklonsko protitelo (CHKV-24), usmerjeno proti virusu čikungunje. V tem primeru ne govorimo o cepivu, temveč posegajo po drugačni terapevtski strategiji, t. i. pasivni imunizaciji.

Preglednica 2: Pregled kliničnih raziskav profilaktičnih mRNA-cepiv proti nalezljivim boleznim (vir: clinicaltrials.gov).

Table 2: Clinical trials of prophylactic mRNA vaccines for infectious diseases (source: clinicaltrials.gov).

Patogen	Učinkovina/ formulacija	Režim	Začetek klinične raziskave	Število udelež.	Podjetje	Status klinične raziskave	Faza kliničnega vrednotenja, identifikacijska številka
HIV-1	AVX101, alfavirusna RNA, ki kodira protein Gag virusa HIV- 1, pakirana v virusne delce	10 ⁵ –10 ⁸ virusnih delcev, s. c., en odmerek, primerjava s placebom	2004	96	AlphaVax	zaključena	faza I (NCT00097838) (30)
Virus gripe A/Wyoming/ 03/2003	AVX502, alfavirusna RNA, ki kodira hemaglutinin virusa gripe A/Wyoming/ 03/2003, pakirana v virusne delce	2 × 10 ⁷ ali 2 × 10 ⁸ virusnih delcev, s. c. ali i. m., en ali dva odmerka, razporejena na tedna 0 in 8, primerjava s placebom	2007 2008	216 28	AlphaVax	zaključena	faza I/II (NCT00440362) faza I/II (NCT00706732) (31)
CMV	AVX601, alfavirusna RNA, ki kodira glikoprotein gB in fuzijski protein pp65/IE1 CMV, pakirana v virusne delce	2 × 10 ⁷ ali 2 × 10 ⁸ virusnih delcev, s. c. ali i. m., trije odmerki, razporejeni na tedne 0, 8 in 24, primerjava s placebom	2007	40	AlphaVax	zaključena	faza I (NCT00439803) (31, 32)

Virus stekline	mRNA CV7201, ki kodira glikoprotein RABV-G, kompleksirana z bazičnim proteinom protaminom	80–640 µg, i. m. ali i. d., odmerki razporejeni na dneve 0-7-28, 0-28 ali 0-28-56	2013	101	CureVac	zaključena	faza I (NCT02241135) (25)
Virus stekline	nekodirajoča RNA CV8102 kot adjuvant (agonist receptorjev TLR 7/8 in aktivator signalne poti RIG I), kompleksirana z majhnim kationskim peptidom CR12C	25–250 µg, i. m., samostojno ali v kombinaciji z inaktiviranim cepivom (Rabipur), odmerka razporejena na dneva 0 in 21	2014	72	CureVac	zaključena	faza I (NCT02238756) (33)
Virus gripe H10N8	mRNA-1440 (VAL-506440), ki kodira hemaglutinin 10, vgrajena v lipidne nanodelce	25–400 µg, i. m. ali i. d., odmerka razporejena na dneva 0 in 21, primerjava s placebom	2015	201	Moderna	zaključena	faza I (NCT03076385) (12, 24)
Virus zika	mRNA-1325, ni podatka o formulaciji	ni podatka o odmerjanju, primerjava s placebom	2016	90	Moderna	zaključena	faza I/II (NCT03014089)
Virus gripe H7N9	mRNA-1851 (VAL-339851), ki kodira hemaglutinin 7, vgrajena v lipidne nanodelce	10–50 µg, i. m., primerjava s placebom	2017	156	Moderna	zaključena	faza I (NCT03345043) (12, 24)



CMV	mRNA-1647* ali mRNA-1443, vgrajena v lipidne nanodelce	30–300 µg, odmerki razporejeni na mesece 0, 2 in 6, primerjava s placebom	2017	181	Moderna	zaključena	faza I (NCT03382405)
Virus stekline	mRNA CV7202, ki kodira glikoprotein RABV-G, vgrajena v lipidne nanodelce	naraščajoči odmerki, i. m., en ali dva odmerka (na dneva 0 in 28), primerjava z inaktiviranim cepivom (Rabipur)	2018	53	CureVac	v teku	faza I (NCT03713086)
Virusa hMPV in PIV3	mRNA-1653 (dve različni mRNA), ki kodirata proteina paramiksovirusov, vgrajeni v lipidne nanodelce	ni podatka o odmerjanju (dve roki: odrasli in otroci; primerjava s placebom)	2019	114	Moderna	v teku (poteka novačenje prostovoljcev)	faza Ib (NCT04144348)
Virus zika	mRNA-1893, ki kodira strukturni protein prME (tvori VLP), vgrajena v lipidne nanodelce	10–250 µg, i. m., odmerka razporejena na dneva 0 in 28, primerjava s placebom	2019	120	Moderna	zaključena	faza I (NCT04064905)
Virus čikungunje	mRNA-1944, ki kodira protitelo (CHKV-24), usmerjeno proti virusu čikungunje (<u>pasivna imunizacija</u>), vgrajena v lipidne nanodelce	naraščajoči odmerki, i. v. (infuzija), primerjava s placebom	2019	39	Moderna	v teku	faza I (NCT03829384)

CMV	mRNA-1647* (šest različnih mRNA), ki kodirajo membranski pentamerni kompleks in glikoprotein gB CMV, vgrajene v lipidne nanodelce	50–150 µg, odmerki razporejeni na mesece 0, 2 in 6, primerjava s placebom	2020	452	Moderna	v teku (poteka novačenje prostovoljcev - tako seropozitivnih kot seronegativnih - dve roki)	faza II (NCT04232280)
SARS-CoV-2	mRNA BNT162b2 (in druge), ki kodirajo protein Sp ali RBD, vgrajene v lipidne nanodelce	10–100 µg, i. m., odmerki razporejeni na dneva 0 in 21, primerjava s placebom	2020/2021	144 456 120 160 960 43998 4644 (otroci, 5-12 let) 4000 (nosečnice 18 let in več)	Pfizer/ BioNTech	v teku v teku v teku v teku v teku (poteka novačenje prostovoljcev) v teku (poteka novačenje prostovoljcev) v teku (poteka novačenje prostovoljk) pogojna odobritev COMIRNATY	faza I (NCT04523571) faza I/II (NCT04380701) (34) faza I/II (NCT04537949) faza I/II (NCT04588480) (35) faza II (NCT04649021) faza II/III (NCT04368728) (27) faza I/II/III (NCT04816643) faza II-III (NCT04754594)



SARS-CoV-2	mRNA-1273, ki kodira protein Sp, vgrajena v lipidne nanodelce	25–250 µg, i. m., odmerki razporejeni na dneva 0 in 28, primerjava s placebom	2020/2021	120	Moderna	v teku	faza I (NCT04283461) (36, 37)
				600		v teku	faza IIa (NCT04405076)
				30000		v teku	faza III (NCT04470427) (28)
				3000 (otroci 12-18 let)		v teku	faza II/III (NCT04649151)
				7050 (otroci 0,5-12 let)		v teku (poteka novačenje prostovoljcev)	faza II/III (NCT04796896)
pogojna odobritev COVID-19 Vaccine Moderna							
SARS-CoV-2	mRNA CVnCoV, ki kodira protein Sp, vgrajena v lipidne nanodelce	6–12 µg, i. m., odmerka razporejena na dneva 0 in 28 (+180), primerjava s placebom (tudi cepivoma proti hepatitisu A ali pnevmokokom)	2020/2021	280	CureVac	v teku	faza I (NCT04449276)
				660		v teku	faza II (NCT04515147)
				36500		v teku	faza IIb/III (NCT04652102)
				2520		v teku (poteka novačenje prostovoljcev)	faza III (NCT04674189)

CMV – citomegalovirus, hMPV – človeški metapnevmovirus, i.d. – intradermalno, i.m. – intramuskularno, i.v. – intravensko, PIV3 – virus parainfluence tipa 3, protein Sp – predfuzijska oblika proteina S (spike), RBD – receptor vezavna domena proteina S, s.c. – subkutano, VLP – virusu podobni delci (virus-like particles)

5 SKLEP

Cepiva na osnovi mRNA predstavljajo eno najobetavnejših platform, saj zaradi možnosti hitre in obsežne proizvodnje, neodvisne od strukture kodiranega proteinskega antigena, omogočajo izjemno hiter odziv na grožnje novih patogenov in jih je moč razmeroma enostavno prilagajati potencialnim mutacijam, ki spremljajo širitev patogenov v populaciji. Kljub izjemnemu napredku pri razvoju mRNA-cepiv proti infekcijskim in rakavim boleznim v zadnjih dveh desetletjih ostaja nekaj pomembnih vprašanj odprtih. Tako trenutno ni znano, ali posamezni formati mRNA-cepiv (npr. modifikacije 5'-kape in regulatornih regij mRNA, uporaba spremenjenih nukleozidov) sprožajo različne vrste imunskih odzivov oz. ali so primernejši za določen nabor terapevtskih aplikacij. Ključnega pomena bo razumevanje imunostimulatornih učinkov same sintezne mRNA, ki prek indukcije sproščanja citokinov in kemokinov domnevno pomembno vpliva na obseg in kakovost odzivov limfocitov T in B z aktivacijo in novačenjem različnih celic imunskega sistema (21). Življenjska doba mRNA *in vivo* ter nivo izražanja antigena (kar pomembno določa tudi interferonski odziv) pomembno vplivata na kinetiko in obseg predstavljanja antigenskih peptidov na MHC I in MHC II (21). Rezultati nedavnih raziskav na živalih nakazujejo, da mRNA-cepiva s spremenjenimi nukleotidi, formulirana v obliki lipidnih nanodelcev, izzovejo močan odziv folikularnih T-celic pomagalk in limfocitov B v germinalnih centrih bezgavk, kar vodi do robustne tvorbe nevtralizacijskih protiteles (38, 39). Manj je podatkov o tem, kako spremenjeni nukleotidi v mRNA-cepivih vplivajo na odziv citotoksičnih limfocitov T. Znano je, da nespremenjena mRNA izzove robustne odzive citotoksičnih limfocitov T proti tumorskim antigenom (40, 41), a v tovrstnih raziskavah praviloma ne spremljajo humoralnega imunskega odziva. V prihodnosti si obetamo tudi nadaljnji napredek v razvoju dostavnih sistemov, s čimer bi npr. selektivno transfecirali posamezne vrste celic *in vivo*, povečali stabilnost cepiv (omogočili enostavnejše shranjevanje) in optimizirali njihov imunomodulatorni učinek.

6 LITERATURA

1. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines [Internet]. WHO; 2021 [cited 2021 May 25]; Available from:

- <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
2. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Apr;17(4):261-79.
3. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(16):6077-81.
4. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8.
5. Gomez-Aguado I, Rodriguez-Castejon J, Vicente-Pascual M, Rodriguez-Gascon A, Solinis MA, Del Pozo-Rodriguez A. Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 Feb 20;10(2).
6. Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther*. 2020 Oct 22.
7. Mikkola S, Lonnberg T, Lonnberg H. Phosphodiester models for cleavage of nucleic acids. *Beilstein J Org Chem*. 2018;14:803-37.
8. Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the cold reality of mRNA vaccine stability. *J Pharm Sci*. 2021 Mar;110(3):997-1001.
9. Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Mol Ther*. 2019 Apr 10;27(4):757-72.
10. Akinc A, Querbes W, De S, Qin J, Frank-Kamenetsky M, Jayaprakash KN, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther*. 2010 Jul;18(7):1357-64.
11. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015 Nov 10;217:345-51.
12. Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychov A, Brito LA, Hassett KJ, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol Ther*. 2017 Jun 7;25(6):1316-27.
13. Iavarone C, O'Hagan D T, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017 Sep;16(9):871-81.
14. Ciaramella G. Shedding light on our prophylactic vaccines' mechanism of action [Internet]. Moderna; 2017 [cited 2021 May 25]; Available from: <https://www.modernatx.com/moderna-blog/shedding-light-our-prophylactic-vaccines-moa>.
15. Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA*. 2001 Oct;7(10):1486-95.
16. Organic Chemistry > Organic Molecules > Biomolecules > RNA > RNA processing > Capping [Internet]. [cited 2021 May 25]; Available from: <https://sites.google.com/site/learnorganicchem/organic-molecules/biomolecules/rna/rna-processing>.
17. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol Ther*. 2019 Apr 10;27(4):824-36.
18. Diebold SS, Massacrier C, Akira S, Paturel C, Morel Y, Reis e Sousa C. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol*. 2006 Dec;36(12):3256-67.
19. Forsbach A, Samulowicz U, Volp K, Hofmann HP, Noll B, Tluk S, et al. Dual or triple activation of TLR7, TLR8, and/or TLR9 by

- single-stranded oligoribonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2011 Dec;21(6):423-36.
20. Baierdorfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, et al. A facile method for the removal of dsRNA contaminant from in vitro-transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019 Apr 15;15:26-35.
 21. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol.* 2020 Aug;65:14-20.
 22. Zhao M, Li M, Zhang Z, Gong T, Sun X. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Deliv.* 2016 Sep;23(7):2596-607.
 23. McKinlay CJ, Vargas JR, Blake TR, Hardy JW, Kanada M, Contag CH, et al. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jan 24;114(4):E448-E56.
 24. Feldman RA, Fuhr R, Smolenov I, Mick Ribeiro A, Panther L, Watson M, et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine.* 2019 May 31;37(25):3326-34.
 25. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet.* 2017 Sep 23;390(10101):1511-20.
 26. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jun;10(6):e0004746.
 27. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020 Dec 31;383(27):2603-15.
 28. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med.* 2020 Dec 30.
 29. Košnik M, Avčin T, Zidar M. Stališča glede obravnave alergijskih bolezni med covid epidemijo [Internet]. NIJZ; 2021 [cited 2021 May 25]; Available from: https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/alergoloska_staliska_covid_feb_2021.pdf.
 30. Wecker M, Gilbert P, Russell N, Hural J, Allen M, Pensiero M, et al. Phase I safety and immunogenicity evaluations of an alphavirus replicon HIV-1 subtype C gag vaccine in healthy HIV-1-uninfected adults. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Oct;19(10):1651-60.
 31. Mogler MA, Kamrud KI. RNA-based viral vectors. *Expert Rev Vaccines.* 2015 Feb;14(2):283-312.
 32. Bernstein DI, Reap EA, Katen K, Watson A, Smith K, Norberg P, et al. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine.* 2009 Dec 11;28(2):484-93.
 33. Doener F, Hong HS, Meyer I, Tadjalli-Mehr K, Daehling A, Heidenreich R, et al. RNA-based adjuvant CV8102 enhances the immunogenicity of a licensed rabies vaccine in a first-in-human trial. *Vaccine.* 2019 Mar 22;37(13):1819-26.
 34. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature.* 2020 Oct;586(7830):594-9.
 35. Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature.* 2020 Oct;586(7830):589-93.
 36. Anderson EJ, Roupael NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2020 Dec 17;383(25):2427-38.
 37. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary report. *N Engl J Med.* 2020 Nov 12;383(20):1920-31.
 38. Lindgren G, Ols S, Liang F, Thompson EA, Lin A, Hellgren F, et al. Induction of robust B cell responses after influenza mRNA vaccination is accompanied by circulating hemagglutinin-specific ICOS+ PD-1+ CXCR3+ T follicular helper cells. *Front Immunol.* 2017;8:1539.
 39. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, Parkhouse K, Cain DW, Jones L, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med.* 2018 Jun 4;215(6):1571-88.
 40. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Lower M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature.* 2015 Apr 30;520(7549):692-6.
 41. Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature.* 2016 Jun 16;534(7607):396-401.

