



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Νεότερες Εξελίξεις στα mRNA εμβόλια»

**Μεταπτυχιακός Φοιτητής : ΣΑΪΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
Μοριακός Βιολόγος**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) Δήμας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Φαρμακολογίας. Επιβλέπων**
- 2) Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής. Μέλος**
- 3) Παπαθανασίου Ιωάννα, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας.
Μέλος**

ΛΑΡΙΣΑ, 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS

“LATEST DEVELOPMENTS AT mRNA VACCINES”

POST-GRADUATE STUDENT

SAITIS IOANNIS

LARISA, 2023



Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα από όλους την οικογένεια μου, την σύζυγο μου **Κλεοπάτρα** και τις κόρες μου **Μαριάννα** και **Μιχαέλα**, οι οποίες έδειξαν απεριόριστη κατανόηση και συμπαράσταση σε αυτή την δύσκολη και απαιτητική περίοδο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, όπως επίσης και τους γονείς, μου **Μιχάλη** και **Μαρία**, που πάντα με ενθάρρυναν να προσπαθώ να βελτιώνομαι κυρίως ως άνθρωπος.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον **Prof. Δήμα Κωνσταντίνο** για τις συνέχεις συμβουλές, επισημάνσεις και προτάσεις για την εκπόνηση αυτής της Διπλωματικής Εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υπεύθυνη του Μεταπτυχιακού Προγράμματος **Prof. Τσέζου Ασπασία** αλλά και όλα τα μέλη του Προγράμματος, από του Διδάσκοντες μέχρι και την Γραμματειακή Υποστήριξη, όπου πάντα προσπαθούσαν να μας βοηθήσουν.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εμβόλια με βάση το mRNA, έχουν αποδειχθεί ευρέως ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική θεραπείας κυρίως στην ανοσοθεραπεία. Τα εξαιρετικά πλεονεκτήματα που συνδέονται με τα εμβόλια mRNA, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής αποτελεσματικότητάς τους, των σχετικά ήπιων παρενεργειών και του χαμηλού κόστους παραγωγής, τους επέτρεψαν να επικρατήσουν σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Αυτή την περίοδο υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από τρέχουσες κλινικές προσπάθειες που επικεντρώνονται στα εμβόλια μολυσματικών ασθενειών, ανοσοθεραπείες καρκίνου, θεραπευτικές θεραπείες υποκατάστασης πρωτεϊνών και θεραπεία γενετικών ασθενειών.

Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις έχουν αμβλύνει ορισμένα ζητήματα που εμποδίζουν την ανάπτυξη εμβολίων mRNA, όπως αστάθεια, αλλά και η χαμηλή αποτελεσματικότητα που υπάρχει τόσο στη μετάφραση γονιδίων όσο και στις *in vivo* παραδόσεις. Η ανοσογονικότητα του mRNA μπορεί επίσης να προσαρμοστεί σημαντικά ως αποτέλεσμα των αναβαθμισμένων τεχνολογιών.

Σε αυτή την εργασία αναφέρονται τα στάδια της παραγωγής των εμβολίων και κατά το ποσό η βελτίωση αυτών έχει προσπελάσει σημαντικούς παράγοντες περιορισμού, όπως η σταθερότητα της δομής του mRNA και η προστασία από την αποδόμηση του.

Επίσης γίνεται αναφορά των αποτελεσμάτων στο πεδίο εφαρμογής των μολυσματικών ασθενειών αλλά και των γονιδιακών παθήσεων, επισημαίνονται οι περιορισμοί που έχουν προκύψει για την κάθε περίπτωση ξεχωριστά και αναφέρονται οι νέες προσεγγίσεις για την αποφυγή αυτών στις τρέχουσες κλινικές μελέτες.

Λέξεις Κλειδιά: mRNA εμβόλια, βελτιστοποίηση εμβολίων, γονιδιακές θεραπείες ανοσογονικότητα, κλινικές μελέτες.

ABSTRACT



mRNA-based vaccines have been widely demonstrated as a promising treatment strategy primarily in immunotherapy. The exceptional ability of mRNA vaccines, including their high efficacy, relatively mild side effects, and low production costs, allowed them to prevail in preclinical and clinical trials. There are currently a large number of ongoing researches in clinical stages, focused on infectious disease vaccines, cancer immunotherapies, protein replacement therapies, and genetic disease therapy.

Recent technological advances have mitigated some issues hampering the development of mRNA vaccines, such as instability, but also the low efficacy that exists in both gene translation and *in vivo* deliveries. The immunogenicity of mRNA can also be significantly adjusted as a result of upgraded technologies.

This Master's thesis introduces the stages of vaccine production and how the improvements have overcome important limiting factors, such as the stability of the mRNA structure and protection against its degradation.

It also refers to the results in the field of application of infectious diseases and gene diseases, highlights the limitations arisen for each case separately and refers to new approaches to avoid them in current clinical studies.

Keywords: mRNA vaccines, mRNA vaccine optimisation, gene therapies, immunogenicity, clinical studies.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1 i) Εισαγωγή.....	Σελ 6
1ii) DNA και mRNA Εμβόλια.....	Σελ 6
1iii) Ιστορική Ανασκόπηση mRNA εμβολίων.....	Σελ 9
1iv) Ο ρόλος της πανδημίας από τον ιο SARS-CoV2.....	Σελ 9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Μεθοδολογία Ανάπτυξης των mRNA εμβολίων

2.i) Σύνθεση mRNA εμβολίου	Σελ 11
2ii) Τρόπος Δράσης mRNA.....	Σελ 15
2iii) Στάδια παραγωγής.....	Σελ 17
2iv) Μέθοδοι Χορήγησης.....	Σελ 18
2v) Νέες τεχνολογίες βελτίωσης στόχευσης των mRNA εμβολίων.....	Σελ 26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Θεραπευτικοί στόχοι

3 i) Μεταδοτικές ασθένειες.....	Σελ 29
3ii) mRNA εμβόλια και Καρκίνος	Σελ 38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Μελλοντικοί στόχοι

4 i) Χρήση της τεχνογνωσίας των mRNA εμβολίων σε γονιδιακές παθήσεις	Σελ 49
4 ii) Περιορισμοί των mRNA εμβολίων.....	Σελ 53
4 iii) Ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων χορήγησης.....	Σελ 55
4 iv) Μελλοντικές θεραπείες λοιμώξεων:	Σελ 55
4 v) Νέες προσεγγίσεις για την θεραπεία του Καρκίνου.....	Σελ 56
4 vi) Ανάπτυξη υπολογιστικών μοντέλων και δικτύων.....	Σελ 57
4 vii) Συμπεράσματα.....	Σελ 60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σελ 61



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1i) Εισαγωγή

Η ανθρωπότητα εδώ και εκατοντάδες χρονιά προσπαθούσε να προφυλαχθεί από ασθένειες που έβλεπε ότι απειλούσαν την ανθρώπινη ύπαρξη. Για παράδειγμα, για την χρήση της ευλογιάς (smallpox) υπάρχουν αναφορές από τον 15ο αιώνα, ότι οι άνθρωποι σε διάφορα μέρη του κόσμου προσπάθησαν να αποτρέψουν μια ασθένεια εκθέτοντας σκόπιμα υγιείς ανθρώπους στην ευλογιά, μια πρακτική γνωστή ως variolation (από ένα όνομα για την ευλογιά, «la variole»).

Για παράδειγμα, το 1721, η Mary Wortley Montagu έφερε τον εμβολιασμό κατά της ευλογιάς στην Ευρώπη, ζητώντας να εμβολιαστούν οι δύο κόρες της κατά της ευλογιάς, όπως είχε παρατηρήσει στην Τουρκία και το 1774 ο Benjamin Jesty κάνει μια σημαντική ανακάλυψη δοκιμάζοντας την υπόθεσή του ότι η μόλυνση με cowpox, έναν ιό βοοειδών που μπορεί να εξαπλωθεί στον άνθρωπο, θα μπορούσε να προστατεύσει ένα άτομο από την ευλογιά (Πηγή: WHO).

Μετάπειτα ακολουθήσαν τα επιτυχημένα πειράματα του Louis Pasteur, που το 1872 δημιουργεί το πρώτο εργαστηριακά παραγόμενο εμβόλιο: το εμβόλιο για τη χολέρα των πτηνών στα κοτόπουλα, ενώ το 1885 αποτρέπει επιτυχώς τη λύσσα μέσω εμβολιασμού μετά την έκθεση.

Το διάστημα μεταξύ 1918-1919, η πανδημία της ισπανικής γρίπης σκοτώνει περίπου 20-50 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, ωθώντας την τότε παγκόσμια κοινότητα να προάγει σε άμεση προτεραιότητα την δημιουργία ενός εμβολίου για την γρίπη. Ίσως ήταν και το έναυσμα να κατανοήσει ο επιστημονικός κόσμος της υγείας, ότι ο εμβολιασμός θα αποτελούσε ένα αναπόσπαστο κομμάτι ερευνάς και ανάπτυξης για την αποφυγή φαινομένων πανδημίας, αφού έχει αλλάξει ριζικά ο τρόπος ζωής και επικοινωνίας μεταξύ των κοινοτήτων, κυρίως στις γρήγορα αναπτυσσόμενες χώρες της Ευρώπης και της Αμερικής.

Από τότε, τα εμβόλια έχουν επιτύχει τεράστιες προκλήσεις, όπως η εξάλειψη ασθενειών όπως η ευλογιά και ο περιορισμός πολλών παιδικών ασθενειών. Ο εμβολιασμός είναι από τις πιο οικονομικά αποδοτικές θεραπείες που υπάρχουν σήμερα. Όμως, η μέχρι πρότινος διαθέσιμη τεχνολογία των εμβολίων δεν είχε επιτρέψει την έγκαιρη παραγωγή αποδοτικών εμβολίων για τον περιορισμό απειλητικών ασθενειών που έχουν εμφανιστεί τα τελευταία χρόνια, όπως ο ιός Έμπολα ή ο ιός SARS-CoV-2 όπου για την αντιμετώπισή τους, η αναβάθμιση των υπαρχόντων εμβολίων κρίθηκε απαραίτητη.

1ii) DNA και mRNA Εμβόλια

Σε αντίθεση με τα συμβατικά εμβόλια που εφαρμόζονται, για παράδειγμα, στην αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων, διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της χρήσης μιας εξασθενημένης, κατεστραμμένης ή αδρανοποιημένης έκδοσης ενός παθογόνου (ιού ή βακτηρίων), τα εμβόλια DNA και mRNA χρησιμοποιούν γενετικά υλικά που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη του παθογόνου για να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση. Συγκεκριμένα, τα εμβόλια DNA χρησιμοποιούν μικρά μόρια DNA (πλασμίδια), ενώ τα εμβόλια mRNA χρησιμοποιούν το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) του παθογόνου για να επιτύχουν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού (Abbasi, 2020). Όμως υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές στο τρόπο δράσης τους, για παράδειγμα στο DNA εμβόλιο κατά την είσοδό του στο ανθρώπινο κύτταρο, το πλασμίδιο θα

πρέπει να διεισδύσει στο κυτταρόπλασμα και στην συνέχεια την πυρηνική μεμβράνη πριν μπορέσει να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου. Μόλις βρεθεί μέσα στον πυρήνα, το γενετικό υλικό που μεταφέρεται από το πλασμίδιο μετατρέπεται σε αγγελιοφόρο RNA (mRNA) το οποίο στη συνέχεια επιστρέφει πίσω στο κυτταρόπλασμα όπου μεταφράζεται σε παραγωγή ιικής ή βακτηριακής πρωτεΐνης, αυτή η διαδικασία διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων για την καταπολέμηση του ξένου αυτού γενετικού υλικού.

Όμως τα mRNA εμβόλια δεν χρειάζεται να διαπεράσουν την πυρηνική μεμβράνη αφού παραμένουν στο κυτταρόπλασμα όπου εισάγουν ένα συνθετικά δημιουργημένο τμήμα της γενετικής ακολουθίας που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη (αντιγόνο). Αυτά τα μεμονωμένα τμήματα mRNA απορροφώνται από τα δενδριτικά κύτταρα και αυτά με την σειρά τους χρησιμοποιούν τα ριβοσώματα ώστε να μεταφράσουν το mRNA προτού το καταστρέψουν. Στη συνέχεια, αφού διαβαστούν από τα ριβοσώματα, θα παραγάγουν την πρωτεΐνη, δηλαδή το αντιγόνο, η οποία κωδικοποιείται στο mRNA. Το αντιγόνο θα εκφραστεί στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων και θα διεγείρει την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Η ικανότητα αυτή να παραγάγει το κύτταρο το αντιγόνο, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πολύ περισσότερων τμημάτων αντιγόνου σε αυτές τις κυτταρικές επιφάνειες, γεγονός το οποίο θα μπορεί να ενισχύσει την ανοσοαπόκριση του οργανισμού μας, μέσω της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας (Goldman, 2020).

Αυτό είναι ένα βασικό πλεονέκτημα, ότι δεν χρειάζεται να εισέλθουν στον πυρήνα, αφού απλώς χρειάζεται να φτάσουν στο κυτταρόπλασμα για να ενεργοποιήσουν την σύνθεση των βακτηριακών ή ιικών πρωτεϊνών, παρακάμπτοντας αρκετούς περίπλοκους μηχανισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα εμβόλια mRNA να παράγουν υψηλότερη ανοσολογική απόκριση και να πλεονεκτούν σε σχέση με τα DNA εμβόλια, ενώ προκλινικές και κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα εμβόλια mRNA παρέχουν ασφαλή και μακροχρόνια ανοσολογική απόκριση σε ζωικά μοντέλα και ανθρώπους (Zhang *et al.*, 2019).

Επίσης, το γεγονός όμως ότι τα DNA εμβόλια θα πρέπει να εισέλθουν στον πυρήνα, αυξάνει το ενδεχόμενο πιθανής ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή και τις πιθανές συνέπειες για τα διαγονιδιώματικά κύτταρα (Doerfler *et al.*, 2018), ενώ η πιθανότητα τυχαίας ενσωμάτωσης γονιδιώματος είναι σχεδόν μηδενική στα mRNA εμβόλια (Maruggi *et al.*, 2019). Δυστυχώς όμως, ακόμα αναφέρονται μερικές περιπτώσεις όπου ο μηχανισμός δράσης τους τα κάνει πιο επιρρεπή σε παρενέργειες.

Γενικά η τεχνολογία mRNA παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ελκυστική εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών εμβολίων ή ακόμα και των εμβολίων DNA. Σε αντίθεση με τα εξασθενημένα ή αδρανοποιημένα εμβόλια, το mRNA είναι ακριβές καθώς θα εκφράσει μόνο ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και θα προκαλέσει κατευθυνόμενη ανοσοαπόκριση. Επιπλέον, προάγει τόσο τη χυμική όσο και την κυτταρική ανοσολογική απόκριση και επάγει το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (Pollard *et al.* 2013).

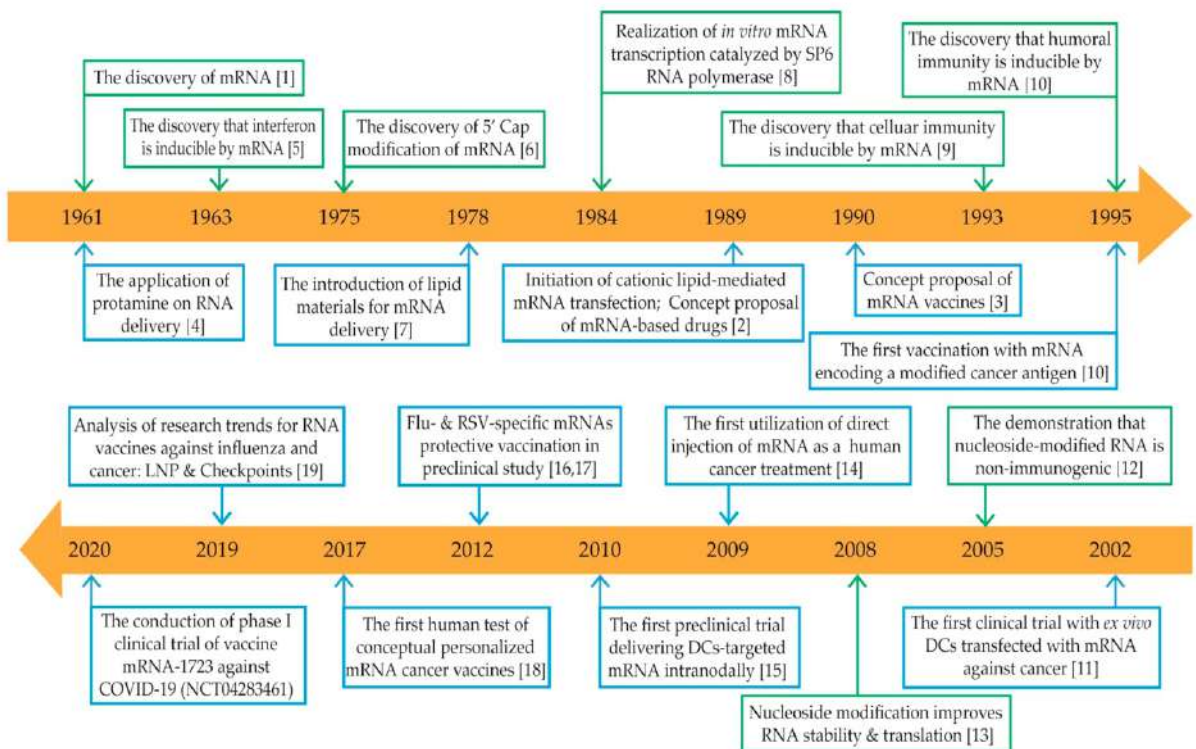
Ένα μεγάλο μειονέκτημα των mRNA εμβολίων είναι η ευαίσθητη δομή τους, η οποία απαιτεί ειδικές συνθήκες μεταφοράς και φύλαξης, γεγονός που περιορίζει την διαδικασία εμβολιασμού σε πολλές χώρες που δεν έχουν τις απαραίτητες, υψηλού κόστους, υποδομές. Αυτός είναι ένας από τους λόγους, από τα πρώτα χρόνια προσπαθειών ανάπτυξης mRNA εμβολίων όπου οδήγησε στην εγκατάλειψη αυτών των εμβολίων ως λύση, όπως και η ελλιπής διαθέσιμη, τότε, τεχνολογία που απαιτούνταν αλλά και το κόστος για την παραγωγή τους. Όμως οι πολλά υποσχόμενες δυνατότητες του mRNA, όχι μόνο αναγκαστικά στο προστατευτικό πεδίο των λοιμώξεων, αλλά στις νόσους με γενετικό/κληρονομικό υπόβαθρο όπως και στο καρκίνο, σε συνδυασμό με τις νέες τεχνολογικά προηγμένες τεχνικές που μειώνουν το χρόνο και το κόστος παραγωγής, και σε

συνδυασμό με τις πρόσφατες πανδημίες, δημιούργησαν την ανάγκη για ανάπτυξη νέας γενιάς εμβολίων και ανάγκασε να στραφεί ξανά το ενδιαφέρον προς αυτή την κατηγορία εμβολίων.

1iii) Ιστορική Ανασκόπηση mRNA εμβολίων

Η ανακάλυψη του mRNA ήταν αποτέλεσμα πολυετών ερευνών κυρίως την δεκαετία του 1950, φτάνοντας στις αρχές τις δεκαετίας του 1960 όπου ταυτόχρονες ομάδες έκαναν αγώνα δρόμου για την επίσημη επικύρωση και παρουσίαση του mRNA στην επιστημονική κοινότητα. Οι ομάδες που ήταν ταυτόχρονα κοντά ήταν : η ομάδα του Watson και η ομάδα των Brenner, Jacob και Meselson όπου οι δεύτεροι κατάφεραν οριακά να δημοσιεύσουν πρώτοι στο *Nature*, το Φεβρουάριο του 1961 την ανακάλυψη του.

Η παρακάτω εικόνα 1, παρουσιάζει χρονολογικά, την ανακάλυψη του mRNA, την μελέτη του, τις ανακαλύψεις μηχανισμών, τις προσπάθειες εφαρμογής του σε φάρμακα/θεραπείες αλλά και στην εφαρμογή του στα εμβόλια για την αντιμετώπιση του ιού COVID-19.



Εικόνα 1: Τα πράσινα περιγράμματα των πλασιών αντιπροσωπεύουν ανακαλύψεις και προόδους στους μηχανισμούς mRNA, ενώ τα μπλε αντιπροσωπεύουν ανακαλύψεις και προόδους στις εφαρμογές φαρμάκων με βάση το mRNA. (Πηγή : Shuqin *et al*, 2020)

Από το σχεδιάγραμμα αξίζει να αναφερθούν μερικές σημαντικές ημερομηνίες όπως : το 1961 όπου το mRNA αναγνωρίστηκε ως ενδιάμεσο μέσο που μεταφέρει γενετικές πληροφορίες από DNA σε ριβοσώματα για πρωτεϊνική σύνθεση (Brenner *et al*, 1961) ενώ στο διάστημα 1975 έως

το 1978 έγινε η ανακάλυψη και ανάπτυξη τεχνικών για καλύτερη παράδοση (Papahadjopoulos, 1975) και σταθερότητα του mRNA με την χρήση 5-cap, (Furuishi 1975 και Dimitriadis 1978).

Το 1990, ο Wolff με την ομάδα του (Wolff *et al*, 1990), κατάφεραν να δείξουν ότι οι ενδομυϊκές ενέσεις mRNA που παράγονται με *in vitro* μεταγραφή (*in vitro* transcription - IVT) θα μπορούσαν να εκφράσουν κωδικοποιημένες πρωτεΐνες στον μυ στο σημείο της ένεσης. Μέχρι τότε το mRNA είχε μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με το DNA, διότι τα mRNA δεν ήταν η πιο ενδεδειγμένη επιλογή λόγω της αστάθειας τους και η έρευνα επικεντρώθηκε κυρίως στο πλασμιδικό DNA και στο ιικό DNA.

Μια σημαντική χρονιά είναι και το 1996, όταν mRNA εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά εναντίον του καρκίνου σε ποντίκια (Boczkowski *et al*, 1996) όπως και το 2002 όπου επιτευχθεί η πρώτη κλινική δοκιμή με χορήγησή *ex vivo* αυτόλογων δενδριτικών κυττάρων (DCs) που περιέχουν mRNA το οποίο κωδικοποιεί το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) κατά μεταστατικού καρκίνου του προστάτη (Heiser *et al*, 2002).

Αξίζει να αναφερθεί ότι το 2005, η Kariko και η ομάδα της, πέτυχαν την ανοσοδιέγερση με την χρήση εμβολίων mRNA τροποποιημένων νουκλεοσιδίων (Kariko, Weissman, *et al*. 2004). Οι μελέτες των Kariko και Weissman, θα έχουν μελλοντικά πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανάπτυξη εμβολίων εναντίον του COVID-19, όπου θα χρησιμοποιηθούν από τις εταιρίες Moderna και Pfizer και θα τους απονεμηθεί το βραβείο «Lasker» για την συμβολή τους.

Το 2012 πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες προ κλινικές μελέτες για τον προστατευτικό εμβολιασμό εναντίον του ιού της γρίπης-A (Petsch *et al*, 2012) και για τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (Respiratory Syncytial Virus- RSV) (Geall *et al*, 2012) φτάνοντας στο 2020 όπου πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες κλινικές δοκιμές σε Φαση- I (Liu *et al*, 2020) του mRNA-1723 εμβολίου εναντίον του COVID-19 (Shuqin Xu *et al*, 2020).

1.iv) Ο ρόλος της πανδημίας από τον ιό SARS-CoV-2

Το ξέσπασμα της πανδημίας COVID-19 στις αρχές του 2020 ανάγκασε την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα να αναζητήσει γρήγορη λύση στην πρόληψη, σε παγκόσμιο επίπεδο, απέναντι στον ιό SARS-CoV-2 που είχε προκαλέσει τόσους πολλούς θανάτους σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα.

Όλη η επιστημονική κοινότητα προσπαθούσε να εκμεταλλευτεί οποιαδήποτε τεχνολογία είχε διαθέσιμη, με την τεχνολογία των DNA εμβολίων να δείχνει μονόδρομος. Τα mRNA εμβόλια ήταν ακόμα μία θεωρητικά ιδανική λύση, αλλά με πολλούς περιορισμούς που καθυστερούσαν την ολοκληρωμένη επιτυχή εφαρμογή τους.

Η παγκόσμια κινητοποίηση που προκλήθηκε από όλες τις κοινωνικές ομάδες όπως της επιστήμης, της πολιτικής, της τέχνης όπως και πολλών άλλων, με σκοπό να συγκεντρωθούν τεράστιοι πόροι από ανθρώπινο δυναμικό, τεχνολογικό εξοπλισμό αλλά και πρωτόγνωρα τεραστία χρηματικά ποσά, ώθησε όλα τα τμήματα Έρευνας και Ανάπτυξης, ιδιωτικών και πανεπιστημιακών τμημάτων αλλά και των φαρμακοβιομηχανιών, να ρίξουν σχεδόν όλο το βάρος τους στην ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου με το mRNA εμβόλιο να δείχνει η πιο υποσχόμενη λύση αν αντιμετωπιζόντουσαν οι περιορισμοί του. Έτσι παγκόσμια, γίνονταν προσπάθειες προσπέλασης των προβλημάτων όπως της σταθερότητας, της στόχευσης και διανομής των εμβολίων αυτών.

Η τεράστια πρόοδος που σημειώθηκε μέσα σε ένα τόσο σύντομο χρονικό διάστημα άφησε μια τεράστια κληρονομιά σε μια σειρά βασικών τεχνολογιών, συμπεριλαμβανομένων των στρατηγικών σχεδιασμού και παραγωγής mRNA αλλά και των συστημάτων χορήγησης, η οποία έχει προσδώσει μια τεράστια ώθηση στην αποτελεσματικότητα και υπερκέραση διαφόρων περιορισμών.

Η τεχνολογία mRNA κατάφερε να αλλάξει το τοπίο της συμβατικής ιατρικής σε μόλις ένα χρόνο με τη παρακάτω τριάδα να αποτελεί τις πιο ισχυρές εταιρείες παραγωγής mRNA εμβολίων:

Η **Moderna Therapeutics**, η οποία ιδρύθηκε το 2010, χρειάστηκε μόνο 45 ημέρες από την ταυτοποίηση της αλληλουχίας ιικού αντιγόνου έως την παραγωγή του πρώτου εμβολίου mRNA για κλινική χρήση με το νέο της εμβόλιο χρησιμοποιώντας την τεχνολογία mRNA και όχι την μέχρι τότε ευρέως χρησιμοποιούμενη των DNA εμβολίων. Το εμβόλιο της, με κωδικό όνομα *mRNA-1273*, είναι ένα εμβόλιο που χρησιμοποιεί ως φορέα τα νανοσωματίδια λιπιδίων (Lipid nanoparticles-LNPs τα οποία θα αναλυθούν περισσότερο στο *Κεφ 2iv*) ενώ το mRNA κωδικοποιεί την πρωτεϊνική ακίδα, πλήρους μήκους, του κοροναϊού SARS-CoV-2.

Η **Pfizer/BioNTech**, είναι μια εταιρία όπου έκλεισε τον μεγαλύτερο γύρο χρηματοδότησης που συγκέντρωσε ποτέ ευρωπαϊκή εταιρεία βιοτεχνολογίας στις 10 Ιουλίου 2019, παρήγαγε το πρώτο εγκεκριμένο εμβόλιο στον κόσμο για την αντιμετώπιση του COVID-19 με το εμβόλιο mRNA Comirnaty ή **BNT162b2**.

Και η **CureVac**, η οποία ιδρύθηκε το 2000 από τον Γερμανό βιολόγο Ingmar Hoerr οπου δημοσίευσε ένα άρθρο εκείνη την χρονιά, σχετικά με την αποτελεσματικότητα των εμβολίων με βάση το mRNA, θέμα με το οποίο είχε ασχοληθεί στα πλαίσια του διδακτορικού του. Αφού ολοκλήρωσε το διδακτορικό του ίδρυσε την εταιρεία και έχει το δικό της δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για ιονιζόμενα λιπίδια η οποία ανέπτυξε το **CureVac COVID-19 vaccine** (συντομογραφία **CVnCoV**).

Τον Δεκέμβριο του 2020, τα εμβόλια mRNA της Moderna και της BioNTech για τον COVID-19, BNT162b2 και mRNA-1273 αντίστοιχα, έλαβαν έγκριση έκτακτης ανάγκης από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) λόγω των εξαιρετικών αποτελεσμάτων κλινικών δοκιμών φάσης III.

Η αποτελεσματικότητα αυτών των εμβολίων mRNA έναντι της COVID-19 ήταν 95% και 94,1%, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας την υψηλή αποτελεσματικότητα του εμβολίου mRNA έναντι της πνευμονίας του νέου κορονοϊού (Polack 2020 και Baden 2021). Η καλύτερη κατανόηση των επιλογών χορήγησης των εμβολίων, μαζί με την ουσιαστική αντιμετώπιση των περιορισμών τους σε μεγάλο βαθμό, έδειξαν την πραγματική δυναμική τους και ότι στο άμεσο μέλλον, ένα μεγάλο τμήμα του εμβολιασμού θα τους ανήκει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Μεθοδολογία Ανάπτυξης των mRNA εμβολίων.

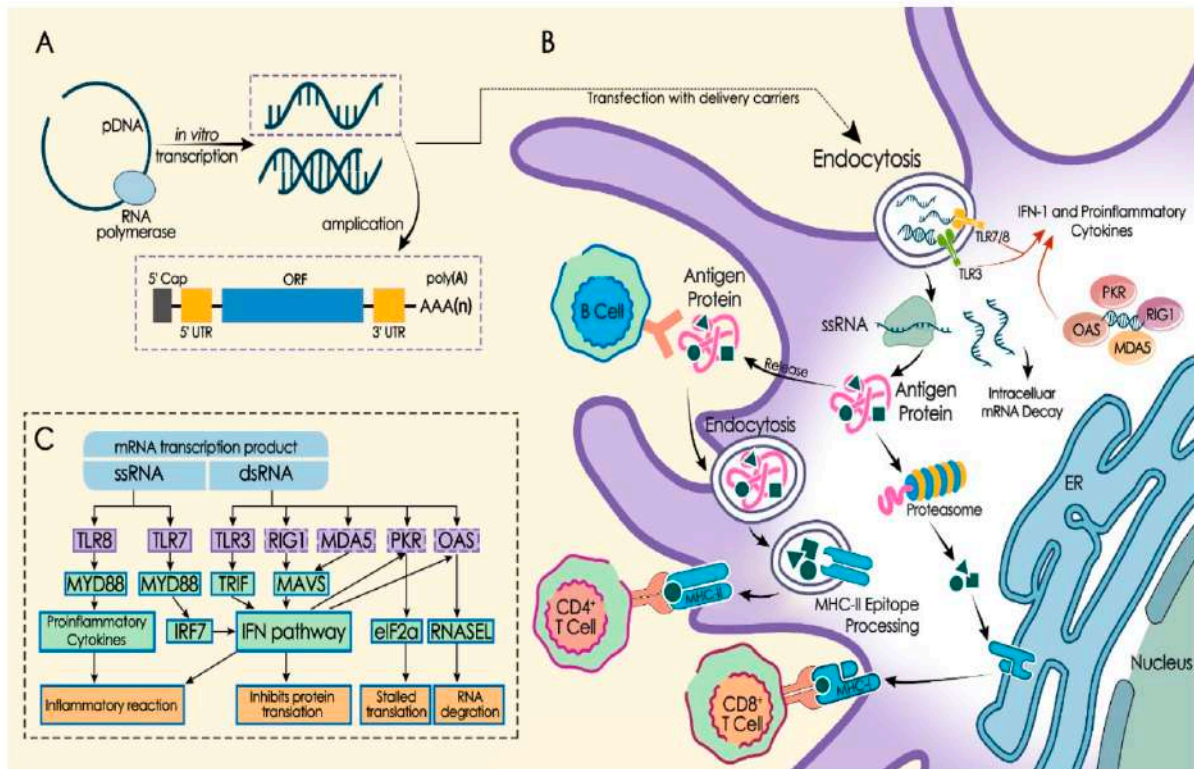
2.i) Σύνθεση mRNA εμβολίου

Η κατασκευή εμβολίων mRNA απαιτεί την εισαγωγή του κωδικοποιημένου αντιγόνου σε ένα πρότυπο DNA από όπου το mRNA μεταγράφεται *in vitro*. Σε αντίθεση με το DNA, το mRNA χρειάζεται μόνο να φτάσει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα μεταγραφεί στο αντιγόνο *in vivo*, χρησιμοποιώντας τον κυτταρικό μηχανισμό. Με αυτόν τον τρόπο, οποιαδήποτε επιθυμητή ακολουθία μπορεί να σχεδιαστεί, να παραχθεί *in vitro* και να παραδοθεί σε οποιονδήποτε τύπο κυττάρου (Maruggi *et al.* 2019). Ο πιο συχνός τρόπος παραγωγής τους, χρησιμοποιεί T3, T7, ή SP6 RNA πολυμεράσες και γραμμικό DNA (γραμμικό πλασμιδικό DNA ή συνθετικό DNA) για τη σύνθεση του επιθυμητού mRNA από το αντίστοιχο πρότυπο DNA με ενίσχυση της περιοχής ενδιαφέροντος με χρήση της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) ή ενός γραμμικού πλασμιδίου. Το πρότυπο DNA στη συνέχεια επεξεργάζεται με πεπτικά ένζυμα, όπως DNases, και το mRNA καθαρίζεται (purification) για την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων. Είναι μια γρήγορη αντίδραση μόνο λίγων ωρών, σε αντίθεση με τις χρονοβόρες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή συμβατικών εμβολίων. Επιπλέον, αυτός ο μειωμένος χρόνος μειώνει την πιθανότητα μόλυνσης (Pascolo, 2015)

Ο τρόπος δράσης του *in vitro* μεταγραμμένου (IVT) mRNA είναι ότι αναγνωρίζεται από διάφορους ενδοσωμικούς έμφυτους ανοσοποιητικούς υποδοχείς τύπου Toll όπως ο υποδοχέας TLR3, ο TLR7 και ο TLR8 αλλά και κυτταροπλασματικούς έμφυτους ανοσοποιητικούς υποδοχείς, όπως η ενεργοποιημένη με RNA πρωτεϊνική κινάση (RNA-dependent protein kinase-PKR), η πρωτεΐνη γονιδίου I επαγόμενη από ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I), η πρωτεΐνη 5 σχετιζόμενη με διαφοροποίηση μελανώματος (melanoma differentiation-associated protein 5-MDA5) και 2'-5'-ολιγοαδενυλική συνθάση (OAS)(εικόνα 2C).

Η όλη διαδικασία δημιουργεί ένα προ-φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον που οδηγεί σε ενεργοποίηση των αντιγονοπαρουσιαζόντων κυττάρων (antigen presenting cells-APCs) που προκαλούν την αύξηση των επιπέδων προφλεγμονωδών κυτοκινών (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 και IL-12), χημειοκινών και μονοξειδίου του αζώτου (NO) και παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση συνδιεγερτικών μορίων (CD40, CD80, CD86) στην μεμβράνη τους. Όλες αυτές οι αλλαγές στη λειτουργία των APC επιτρέπουν την επαγωγή της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης, όπου τόσο τα T όσο και τα B λεμφοκύτταρα παίζουν κρίσιμο ρόλο (εικόνα 2B). Οι υποδοχείς TLRs παίζουν επίσης ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω άμεσης ή έμμεσης επίδρασης στη λειτουργία των CD4⁺ και CD25⁺ T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή τους και την επακόλουθη καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης ή την αντιστροφή της καταστολής (αντι-καταστολή) (Linares-Fernández *et al.* 2020), (εικόνα 2C).

Η δομή των εμβολίων mRNA είναι παρόμοια με του ευκαρυωτικού mRNA. Η βασική δομή του έχει ως εξής: είναι ένα μονόκλωνο μόριο με μια καλύπτρα στο 5' άκρο, μια πολύ (A) ουρά στο 3' άκρο και ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) που πλαισιώνεται εκατέρωθεν από αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions-UTRs) (Pollard *et al.* 2013) (εικόνα 2A).



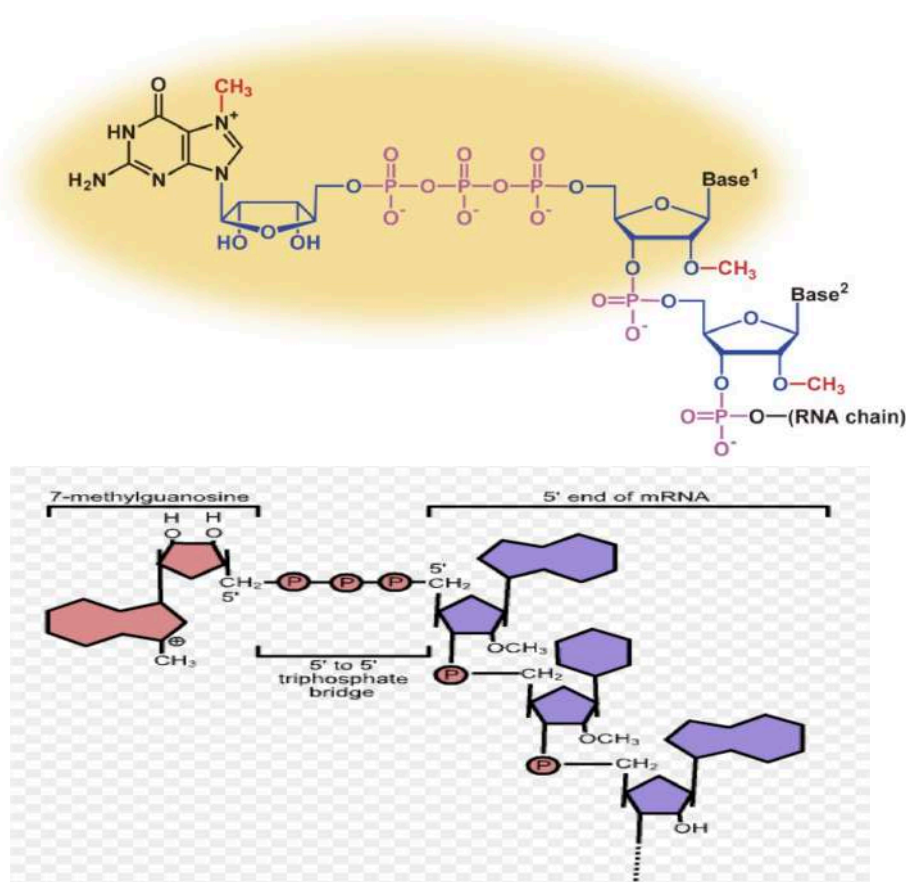
Εικόνα 2: mRNA *in vitro* μεταγραφή και ενεργοποίηση έμφυτης ανοσίας. (A) *in vitro* mRNA μεταγραφή. Χρησιμοποιώντας το DNA με την αλληλουχία κωδικοποίησης αντιγόνου ως πρότυπο, τα προϊόντα μεταγραφής περιέχουν μονόκλωνο RNA (ssRNA), δίκλωνο RNA (dsRNA) κ.λπ. Η δομή ssRNA κανονικά περιλαμβάνει (5' cap), (5' UTR), ανοικτή περιοχή πλαισίου ανάγνωσης (ORF) μη μεταφρασμένη περιοχή (3' UTR) και μια δομή ουράς πολυ -A. (B) Μετάφραση RNA και παρουσίαση αντιγόνου. Μέσω της ενδοκυττάρωσης, τα mRNAs εισέρχονται στη μετάφραση και την παρουσίαση αντιγόνου. Μερικά mRNAs συνδυάζονται με ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή και μεταφράζονται με επιτυχία. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν σε αντιγονικά πεπτίδια από πρωτεάσωμα στο κυτταρόπλασμα και να παρουσιαστούν σε αντιγονικά πεπτίδια από πρωτεάσωμα στο κυτταρόπλασμα και παρουσιάζονται σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) μέσω της MHC-I οδού ή μπορούν να απελευθερωθούν από το κύτταρο ξενιστή και να απορροφηθεί από DC. Στη συνέχεια, αποικοδομούνται και παρουσιάζονται στα βοηθητικά T κύτταρα και B κύτταρα μέσω της MCH-II οδού. (C) Αυτοεπικουρική Δράση (Self-Adjuvant effect), PRRs υποδοχείς αναγνωρίζουν τα mRNA *in vitro* παράγωγα. (Πηγή: Xu *et al.*, 2020)

Καλύπτρα στο 5' ακρο

Η σύνθεση της 5' καλύπτρας του mRNA έχει πολύ μεγάλη σημασία διότι έχει άμεσο ρόλο στη βελτίωση της σταθερότητας του mRNA στο κυτταρόπλασμα και την προστασία από εξωνουκλεάσες (Parker, 2004) όπως και κατά την διάρκεια της μετάφρασης, όταν η περιοχή αυτή αναγνωρίζεται από τον eIF4 (eukaryotic initiation factor 4) και δεσμεύεται πάνω του (Roers *et al.* 2016).

Υπάρχουν κυρίως δύο τύποι μεθόδων κάλυψης των mRNA. Ο πρώτος βασίζεται στη προσθήκη ενός κανονικού αναλογικού καλύμματος, της δομής m7GpppG (εικόνα 3) και στο *in vitro* σύστημα μεταγραφής mRNA (Schlake *et al.* 2012). Κατά τον δεύτερο, η κάλυψη mRNA πραγματοποιείται σε δύο βήματα, στο πρώτο γίνεται η *in vitro* μεταγραφή και η καλύπτρα προστίθεται σε δεύτερη φάση από την ενζυμική αντίδραση που χρησιμοποιεί το ένζυμο κάλυψης

του ιού Vaccinia (Vaccinia Capping Enzyme-VCE)(Martin *et al.* 1975). Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται διαφορετικά είδη καλυπτρών (cap analogues).



Εικόνα 3: Δομή καπακιού m⁷GpppNm pNm- (Cap 2) που αντιπροσωπεύει το m⁷G που συνδέεται με το 5' B-άκρο της πρωτογενούς μεταγραφής μέσω τριφωσφορικού 5B-5B. (Πηγή: Yasuhiro Furuishi)

Στα ευκαρυωτικά, η 7-μεθυλογουανοσίνη (m⁷G) συνδέεται, κατά την μεταγραφή, με το πρώτο RNA νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο του mRNA μέσω τριφωσφορικής γέφυρας 5'-5' για να σχηματίσει μια δομή καλύπτρας για να προστατεύσει το mRNA από την αποικοδόμηση από κυτταρικές εξωνουκλεάσες.

Πολύ(A) ουρά

Επόμενη βασική δομή είναι η πολύ-A ουρά (Poly-A tail). Όταν αποκαλύφθηκε ότι η Poly(A) ουρά μπορεί να ενισχύσει την έναρξη της μετάφρασης, παρατηρήθηκε ότι η αποτελεσματικότητα του σχηματισμού πολυσωμάτων αυξήθηκε ανάλογα με την αύξηση του μήκους της ουράς Poly-A έως και τις 68 βάσεις (Munroe *et al.*, 1990). Έχει όμως αποδειχθεί ότι η αύξηση των αριθμών των βάσεων πάνω από 120 βάσεις δεν επηρεάζει περισσότερο την πρωτεϊνική έκφραση (Kormann *et al.*, 2011)

Η poly-A ουρά παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάφραση καθώς και στην ενζυματική σταθερότητα του mRNA. Η ουρά poly-A συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες πρόσδεσης (Poly(A)-binding proteins- PABPs) ενώ λειτουργεί συνεργικά με αλληλουχίες 5'm⁷Gcap για τη ρύθμιση της μεταφραστικής αποτελεσματικότητας (Goss *et al.*, 2013).

Οι ουρές poly-A μπορούν να προστεθούν στο mRNA κωδικοποιώντας τες στο πρότυπο DNA ή κατ' επέκταση του IVT RNA μετά από μεταγραφή χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη poly-A πολυμεράση. Ωστόσο, η πολυαδενυλίωση με ανασυνδυασμένη πολυ(A) πολυμεράση έχει ως αποτέλεσμα μεταβλητό μήκος ουράς πολυ(A), δίνοντας έτσι πολυαδενυλιωμένο mRNA με ποικίλα μήκη.

Το μήκος της poly-A ουράς παίζει ρόλο στην αποδόμηση του mRNA, επειδή η αφαίρεση ή η βράχυνση της ουράς σε λιγότερα από 12 υπολείμματα έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση του mRNA μέσω διάσπασης της δομής της καλύπτρας 5' και της εξωνουκλεολυτικής χώνευσης 5' έως 3' ή της αποδόμησης 3' έως 5' (Mugridge *et al.*, 2018)

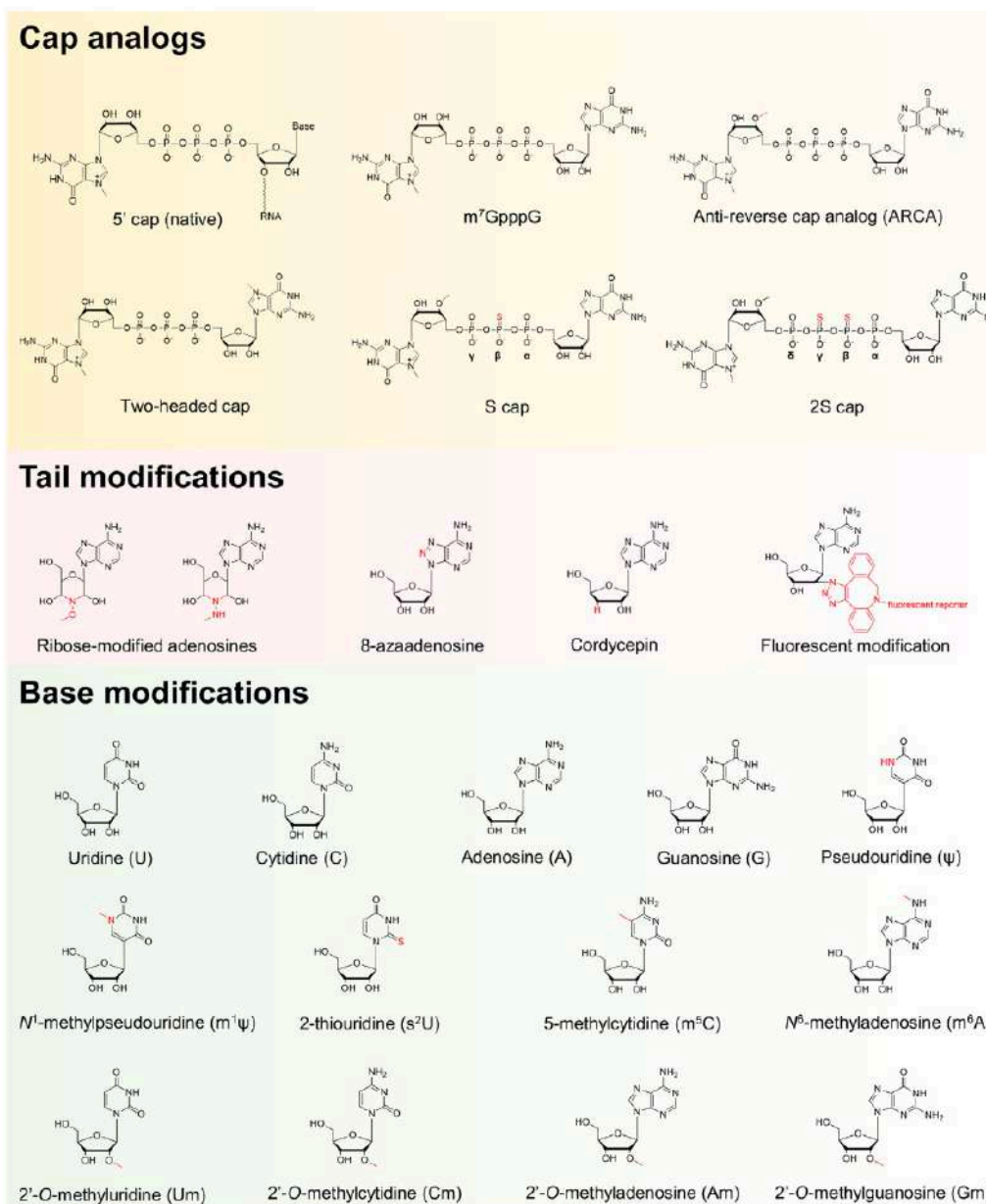
Αμετάφραστες Περιοχές

Η τρίτη δομή που παίζει σημαντικό ρόλο είναι οι αμετάφραστες περιοχές (**untranslated regions-UTRs**). Τα UTRs είναι μη κωδικοποιητικά μέρη της αλληλουχίας mRNA, που σχετίζονται με διαδικασίες αντιγραφής και μετάφρασης mRNA και μπορούν να μεταβάλουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της διάσπασης και της μετάφρασης του mRNA μέσω αντιδράσεων με πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (Schlake *et al.*, 2012).

Οι ρόλοι των UTRs περιλαμβάνουν (i) τη ρύθμιση της εξαγωγής mRNA από τον πυρήνα, (ii) τη ρύθμιση της μεταφραστικής αποτελεσματικότητας (Suknuntha *et al.*, 2018) (iii) την ενορχήστρωση του υποκυτταρικού εντοπισμού (Creusot *et al.* 2010) και (iv) τη σταθερότητα του mRNA (Asrani *et al.*, 2018). Η αλληλουχία, το μήκος και η δευτερεύουσα δομή του UTR επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης mRNA. Για να ενισχυθεί η σταθερότητα του mRNA και η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης, είναι σημαντικό να διασφαλιστεί η βελτιστοποίηση των UTR. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) και εικόνα 3, συνοψίζονται τα μέρη του mRNA που δέχονται τροποποίηση για την βελτίωση της αποδοτικότητας του.

Strategy	Introduction	Function	Example
Synthetic cap analogues and capping enzymes	Composed of 7-methylguanosine (m7G) linked by a 5'-5'-triphosphate bridge to the first transcribed nucleotide.	Binding of the 5' cap to eukaryotic translation initiation factor 4E(eIF4E) is crucial for efficient translation,	M7GpppN, M7GpppG
UTR	The 5' and 3' UTR of eukaryotic mRNAs play crucial roles in the post-transcriptional regulation of gene expression	Play crucial roles in the post-transcriptional regulation of gene expression through the modulation of nucleocytoplasmic mRNA transport, translation efficiency, subcellular localization and message stability	Human β -globin 3'-UTR
Poly(A) tail	The 3' poly(A) tail, in association with poly(A) binding proteins (PABP), plays a critical role in eukaryotic mRNA metabolism	Regulates the stability and translational efficiency of mRNA in synergy with the 5' cap, the internal ribosomal entry site and various other determinants	—
Sequence and/or codon optimization	Sequence and/or codon optimality is a major determinant of mRNA stability	Sequence and/or codon optimality is a major determinant of mRNA stability	—
Modified nucleosides	Some mRNA modifications have been shown to affect normal development	Decrease innate immune activation and increase translation	m6A, m5A, m1A, pseudouridine

Πίνακας 1: Σύνοψη τεχνικών βελτίωσης απόδοσης mRNA εμβολίων.



Σχέδιο 3: Μια επισκόπηση αναλόγων καλύπτρας, διαμόρφωσης της πολύ (A) ουράς και των χημικών τροποποιήσεων των βάσεων του *in vitro* μεταγραμμένου mRNA. (Πηγή: Gao *et al.* 2021)

2ii) Τρόπος Δράσης mRNA εμβολίου

Με βάση την δράση, το mRNA μπορεί να παρουσιάσει κάποιες ιδιότητες παρόμοιες με το ιογενές mRNA όταν λειτουργεί ως φορέας εξωγενών γονιδίων. Σε αυτή την περίπτωση, το mRNA μπορεί να αναγνωριστεί από τα αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα (APCs), τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν υποδοχείς αναγνώρισης (Pattern Recognition Receptors-PRRs) όπως ο υποδοχέας τύπου Toll 3 (TLR3), TLR7 και TLR8, οι οποίοι εκφράζονται συνήθως στην κυτταρική επιφάνεια ή εντός των ενδοσωμάτων και είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των οποίων οι εξωκυτταρικές περιοχές εκφράζουν επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση από τα μοτίβα PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) τα οποία παράγονται από μικρόβια, και τα μοτίβα DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), τα

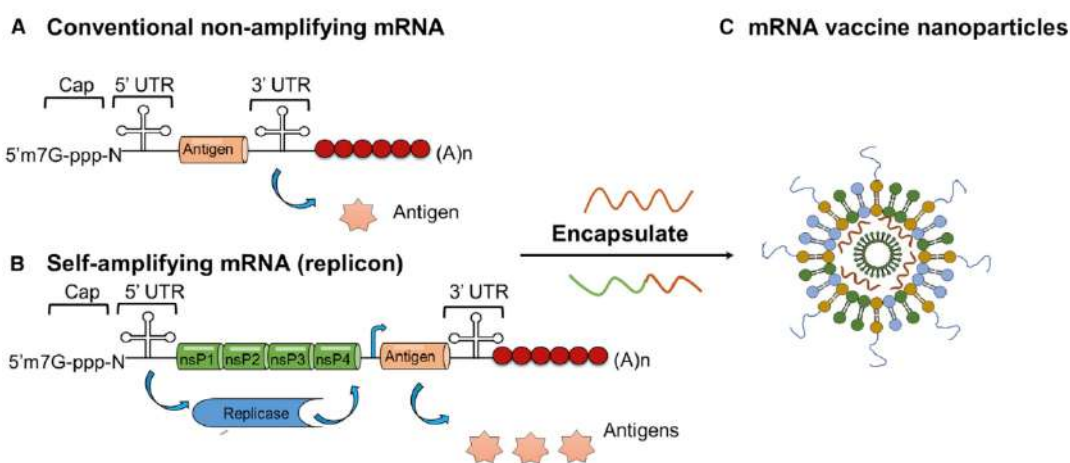
οποία παράγονται από κατεστραμμένα ή μεταλλαγμένα κύτταρα ξενιστές (Fukata *et al.*, 2009, Kowalski *et al.*, 2019, Kallen *et al.* 2013)) (εικόνα 2B και εικόνα 15).

Η ιδιότητα της ισχυρής προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης του mRNA, είναι ένα τεράστιο πλεονέκτημα που φαίνεται στα εμβόλια mRNA. Το μονόκλωνο RNA (ssRNA) μπορεί να ενεργοποιήσει την αντιϊκή δραστηριότητα των DC (dendritic cells) μέσω αναγνώρισης TLR7 και TLR8 κατά τη διάρκεια μετάδοσης mRNA *in vivo* (Heil *et al.* 2017), ενώ το dsRNA μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική ενεργοποίηση μέσω αναγνώρισης TLR3 (Verbeke *et al.*, 2019) (εικόνα 2B και 2C). Ωστόσο, η υπερβολική ανοσολογική απόκριση που διεγείρεται από το mRNA στο κυτταρόπλασμα θα διεγείρει τα κύτταρα να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IFN -I και άλλων ιντερφερονών που μπορούν να αναστείλουν τη μετάφραση του mRNA και τελικά να οδηγήσουν σε μεταφραστική στασιμότητα, υποβάθμιση RNA, μείωση ενεργοποίησης CD8⁺ T κυττάρων και τελικά τερματισμό ανοσολογικής απόκρισης (De Beuckelaer *et al.*, 2017).

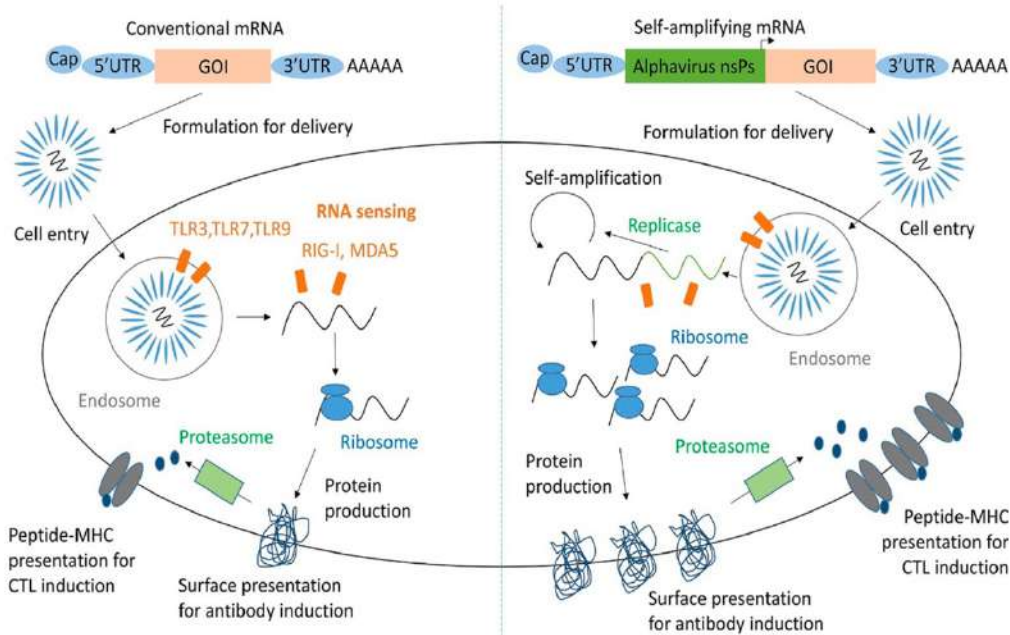
Μια άλλη ιδιότητα των mRNA εμβολίων είναι η ικανότητα της αυτοενίσχυσης. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι RNA που δοκιμάζονται στην εφαρμογή εμβολίων, **το αυτοενισχυόμενο RNA (self-amplifying RNA-saRNA)** και **το μη αναπαραγόμενο RNA (non replicative RNA- nrRNA)** ή **συμβατικό (conventional)** (εικόνα 4).

Σε σύγκριση με το nrRNA, το saRNA αντιγράφει περισσότερο προϊόν μεταξύ των 5'UTR και ORF. Ως εκ τούτου, το saRNA θα μπορούσε να παράγει μεγάλη ποσότητα αντιγόνου πρωτεΐνης και να προκαλέσει ισχυρή ανοσολογική απόκριση σε σχετικά μικρή δόση. Για παράδειγμα, οι Beissert *et al.* ανέπτυξαν ένα εμβόλιο trans-ενισχυτικού RNA, το οποίο σε πολύ μικρή ποσότητα ήταν επαρκές για την πρόκληση ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης (Beissert *et al.*, 2020). Ωστόσο, λόγω του μεγαλύτερου μήκους, η «συσκευασία» saRNA είναι πιο δύσκολη σε σύγκριση με εκείνη του nrRNA (Lundstrom *et al.*, 2018).

Στη συμβατική μορφή mRNA, το αντιγόνο επιλογής πλαισιώνεται μόνο από περιοχές UTR, μια ουρά 3' poly(A) και μια 5' καλύπτρα. Αυτή η μορφή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, τα μόρια είναι απλά και μικρά και η πιθανότητα ανεπιθύμητης ανοσολογικής απόκρισης μειώνεται αφού δεν κωδικοποιούνται άλλες πρωτεΐνες (Kwon *et al.*, 2018). Η εικόνα 5 παρουσιάζει περιληπτικά τον τρόπο παραγωγής πρωτεϊνών από δυο διαφορετικές μορφές mRNA.



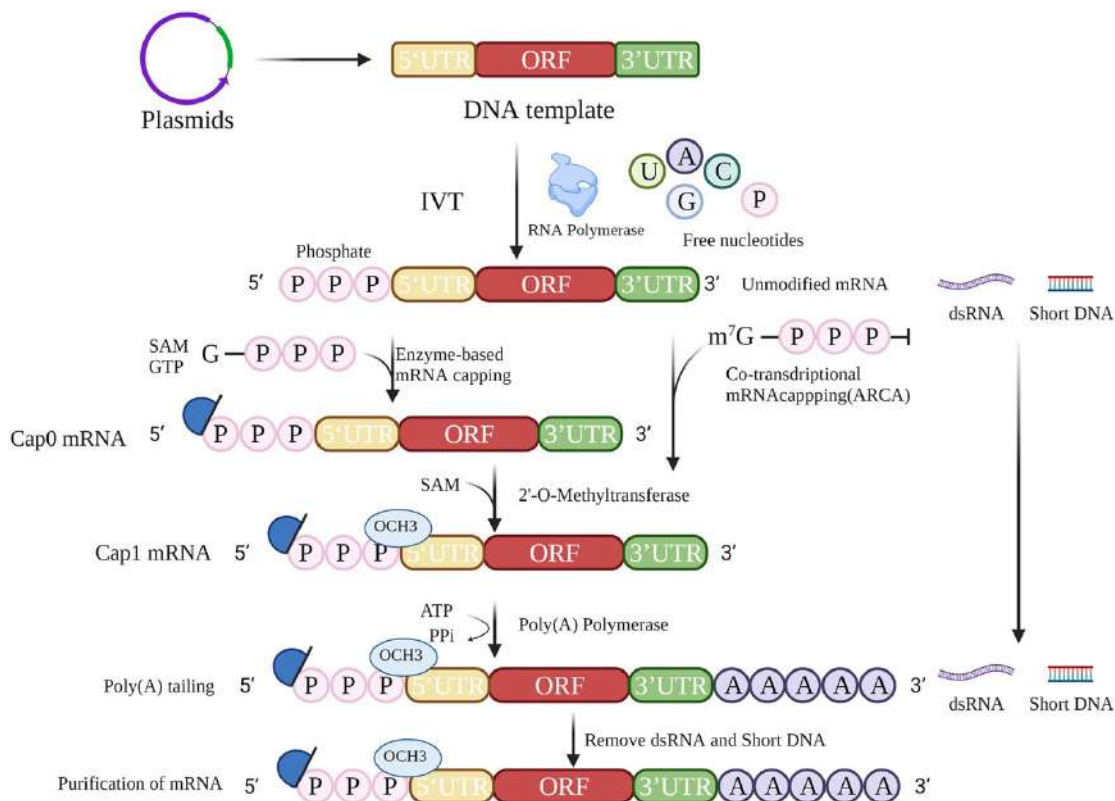
Εικόνα 4. (A) Σχηματική δομή συμβατικού μη αυτοενισχυόμενου εμβολίου mRNA. (B) Σχηματική δομή του αυτοενισχυόμενου εμβολίου mRNA (αντιγράφο), το οποίο περιέχει τα αντιγόνα που κωδικοποιούν την αλληλουχία και τις μη δομικές πρωτεΐνες που διευκολύνουν την κάλυψη και την αντιγραφή του RNA. (C) Απεικόνιση εμβολίου mRNA ενθυλακωμένου σε νανοσωματίδια για βελτιωμένη απόδοση *in vivo*. **Πηγή :** www.molecular therapy.org



Εικόνα 5: Παραγωγή πρωτεϊνών σε κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο. *GOI*: Γονίδιο ενδιαφέροντος. *nsPs*: μη δομικές πρωτεΐνες. *CTL*: κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. (Πηγή: Sandbrink *et al.*, 2020)

2iii) Στάδια παραγωγής:

Τα στάδια παραγωγής ενός mRNA είναι δυο: το πρώτο είναι το στάδιο σύνθεσης (**mRNA synthesis**). Το συνθετικό mRNA μπορεί να παραχθεί με *in vitro* μεταγραφή ενός προτύπου cDNA, συνήθως πλασμιδικού DNA (pDNA), και το επόμενο βήμα είναι ο καθαρισμός του (**mRNA purification**). Οι ακαθαρσίες από την *in vitro* μεταγραφή (IVT) συμπεριλαμβανομένου του προτύπου DNA, των ενζύμων, των NTPs (Nucleosides Triphosphates), των αλάτων, του δίκλωνου (ds) RNA και του περικομμένου mRNA μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις και να επηρεάσουν αρνητικά την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης, για αυτό τον λόγο πρέπει να απομακρυνθούν. Αυτό επιτυγχάνεται με χρωματογραφία που διαχωρίζει το mRNA ανάλογα με το μέγεθος (διαχωρίζει μεγαλύτερα ή μικρότερα τμήματα), δίνοντας ένα καθαρό προϊόν mRNA (Pascolo, 2004). Το σύνολο των παραπάνω διαδικασιών μπορεί να αποτυπωθεί στο Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Διαδικασία σύνθεσης και καθαρισμού mRNA. [ARCA: anti-reverse cap analog]. Στο πιο κοινό ARCA (anti-reverse cap analogue), πραγματοποιείται 3'-O-μεθυλίωση. Η υδροξυλομάδα (2'OH ή 3'OH) στο τμήμα 7-methylguanosine αντικαθίσταται από -OCH₃ προκειμένου να ληφθούν τα ανάλογα καλύπτρας. [SAM:S-adenosylmethionine].

2iv) Μέθοδοι Χορήγησης:

Μεταξύ των πολλών εμποδίων στη λειτουργία του, το mRNA πρέπει να διασχίσει την κυτταρική μεμβράνη για να φτάσει στο κυτταρόπλασμα, η οποία είναι ένα δυναμικό εμπόδιο στην ανεξέλεγκτη ενδοκυτταρική είσοδο μορίων διότι είναι αρνητικά φορτισμένη όπως και το mRNA, γεγονός που δυσκολεύει περισσότερο την παράδοσή του στο κυτταρόπλασμα. Η αποικοδόμηση του όμως μπορεί και να επηρεαστεί από το σχετικά μεγάλο μέγεθος του mRNA (300–5000 kDa) (Weng *et al.*, 2020)

Επίσης η ύπαρξη εξωνουκλεασών, στο δέρμα και στο αίμα, δεν επιτρέπει την επιβίωση όλων των mRNA μορίων. Ως εκ τούτου, η χορήγηση mRNA σε ικανό αριθμό κυττάρων με ταυτόχρονη επαγωγή επαρκώς υψηλών επιπέδων μετάφρασης είναι ένα από τα πιο δύσκολα προβλήματα στην κλινική χρήση των εμβολίων mRNA, καθώς απαιτεί πολύ συγκεκριμένα και αποτελεσματικά συστήματα χορήγησης mRNA (Kowalczyk *et al.* 2016). Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι παράδοσης με τον καθένα να υπερτερεί σε διαφορετικές περιπτώσεις.

Απευθείας χορήγηση γυμνού mRNA

Για χορήγηση *in vivo*, οι πιο κοινές τρόποι ένεσης για εμβόλια mRNA είναι η ενδορινική (intranasal-IN), η ενδομυϊκή (intramuscular-IM), η υποδόρια (subcutaneous-SC) και η ενδοφλέβια (intravenous-IV) χορήγηση (Chaudhary *et al.*, 2021; Hou *et al.* 2021, Zeng *et al.*,

2020). Παρά τις διαφορετικές οδούς χορήγησης, οι κοινοί στόχοι είναι τα λεμφοειδή όργανα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα (APCs).

Το 2013, οι Phua et al. Ανακάλυψαν ότι *in vivo*, το γυμνό mRNA είναι πιο αποτελεσματικό από τα νανοσωματίδια mRNA όταν χορηγείται υποδόρια. Αντίθετα, το νανοσωματίδιο mRNA αποδίδει καλύτερα όταν χορηγείται ενδορινικά και ενδοφλεβίως. Η άμεση έγχυση γυμνού mRNA χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία ή την πρόληψη μολυσματικών ασθενειών (Pardi et al, 2017). Ωστόσο, παρόλο που η έγχυση γυμνού mRNA μπορεί να προκαλέσει ανοσοαπόκριση, το λειτουργικό αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου χορήγησης είναι σχετικά αδύναμο και το γυμνό mRNA συχνά αποικοδομείται γρήγορα μετά την ένεση. Γενικά όμως, η άμεση έγχυση γυμνού mRNA είναι πρωτόγονη για να εφαρμοστεί σε ανθρώπους ασθενείς και χρησιμοποιείται συχνά ως οδός χορήγησης για την έγχυση τροποποιημένων εμβολίων mRNA με άλλα συστήματα χορήγησης για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων εμβολίων.

Η αποτελεσματικότητα της χορήγησης του γυμνού mRNA μπορεί να βελτιωθεί με τη βοήθεια μεθόδων όπως της ηλεκτροδιάτρησης, του γονιδιακού πιστολιού (gene gun), των μικροβελόνων οι άλλων τεχνικών φυσικής παράδοσης του mRNA.

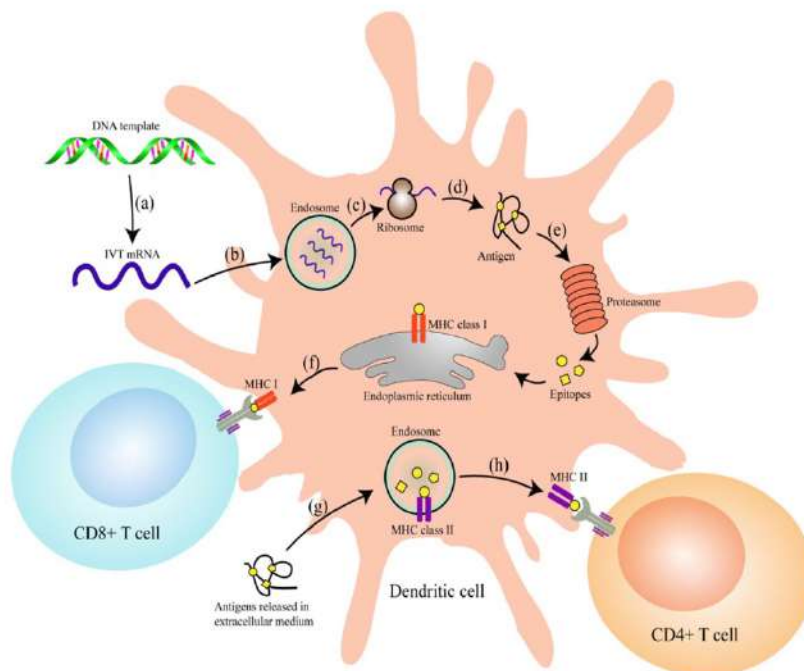
Η μέθοδος γονιδιακού πιστολιού, χρησιμοποιεί συμπιεσμένο αέριο (ήλιο) ως δύναμη επιτάχυνσης για να ωθήσει το mRNA επικαλυμμένο στην επιφάνεια των σωματιδίων χρυσού σε κύτταρα ξενιστές, είναι μια αποτελεσματική μέθοδος παροχής mRNA.

Η ηλεκτροδιάτρηση μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα παροχής mRNA χωρίς τη ζήτηση άλλων υποδοχέων λειτουργίας, γεγονός που μπορεί να μειώσει τις περιττές ανοσοαντιδράσεις (Broderick *et al.*, 2014).

Η μέθοδος γονιδιακού όπλου σπάνια χρησιμοποιείται σε μεγάλα ζώα και ανθρώπους. Οι φυσικοί τρόποι παροχής mRNA μπορεί να επηρεάσουν τη φυσιολογική δομή και δραστηριότητα των κυττάρων, προκαλώντας ακόμη και μη φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η εφαρμογή φυσικών παραδόσεων mRNA στον άνθρωπο είναι δυνητικά επικίνδυνη (Sun *et al.*, 2019).

Χρήση Ex Vivo Δενδριτικών κυττάρων

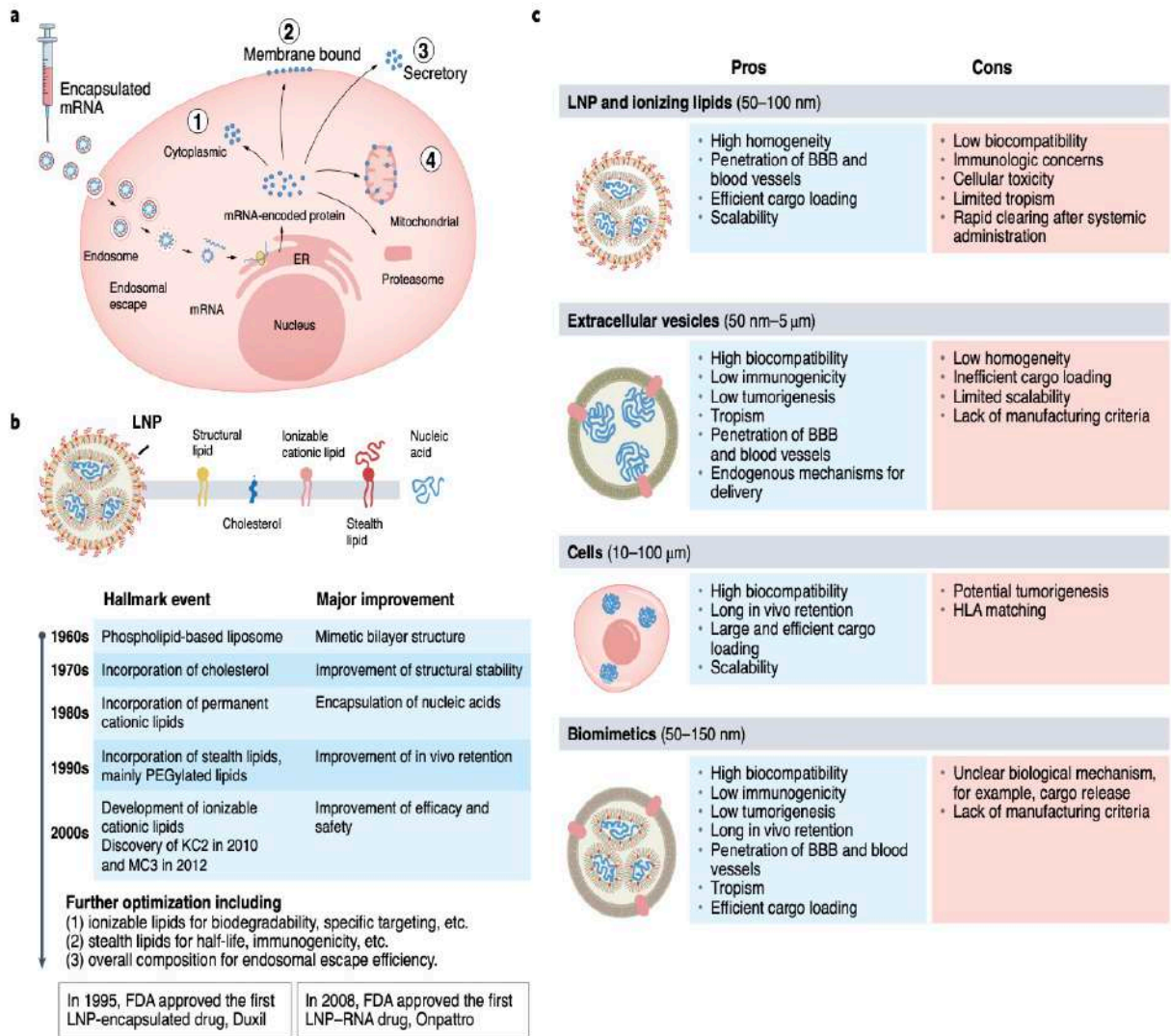
Τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells-DC) είναι υπεύθυνα για την έναρξη όλων των αντιγονικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Τα δενδριτικά κύτταρα ενδοκυτταρώνουν τα παθογόνα, τα επεξεργάζονται πρωτεολυτικά και παρουσιάζουν τα αντιγόνα που προκύπτουν στα CD8⁺ και CD4⁺ T-κύτταρα μέσω των κύριων συμπλεγμάτων ιστοσυμβατότητας (MHC) κατηγορίας I και MHC κατηγορίας II. Ως εκ τούτου, αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί *ex vivo* φόρτωση δενδριτικών κυττάρων με υποψήφιο εμβόλιο, ακολουθούμενη από επανέγχυση των δενδριτικών κυττάρων σε αυτόλογο λήπτη για να προκαλέσει ανοσοαπόκριση. Η *ex vivo* φόρτιση δενδριτικών κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω ήπιας ηλεκτροδιάτρησης (Boczkowski *et al.*, 1996) είτε με χρήση λιπιδικών φορέων (Tateshita *et al.*, 2019) (εικόνα 7). Η ηλεκτροδιάτρηση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση λόγω της υψηλής απόδοσης παράδοσης mRNA (Van Tendeloo *et al.*, 2001). Η ικανότητα των *ex vivo* DC να διεγείρουν την κυτταρική ανοσία τα καθιστά βασική επιλογή κυρίως για ανοσοθεραπεία καρκίνου (Benteyn *et al.*, 2015).



Εικόνα 7: Τα κύρια βήματα που απαιτούνται για τα εμβόλια mRNA από την παραγωγή έως τη λειτουργία. **(a)** *In vitro* μεταγραφή: το mRNA μεταγράφεται από ένα πρότυπο DNA σε ένα σύστημα ελεύθερο κυττάρων. **(b)** Κυτταρική πρόσληψη: το εμβόλιο mRNA εσωτερικεύεται από DCs και παγιδεύεται σε ενδοσωμικά κυστίδια. **(c)** Ενδοσωμική διαφυγή: Παγιδευμένο mRNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. **(d)** Μετάφραση: Οι πρωτεΐνες αντιγόνου συντίθενται χρησιμοποιώντας μεταφραστικό μηχανισμό κυττάρων ξενιστών. **(e)** Οδός επεξεργασίας επιτόπων κατηγορίας I MHC: Οι πρωτεΐνες αντιγόνου αποικοδομούνται από πρωτεασώματα στο κυτταρόπλασμα και οι παραγόμενοι επίτοποι μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να συνδεθούν με μόρια MHC κατηγορίας I. **(f)** Παρουσίαση των συμπλόκων MHC I/επιτόπου: Τα σύμπλοκα MHC I/επιτόπου παρουσιάζονται στην κυτταρική επιφάνεια, οδηγώντας στην επαγωγή της ειδικής απόκρισης CD8+ T κυττάρων του αντιγόνου. **(g)** Οδός επεξεργασίας επιτόπων κατηγορίας II MHC: Τα εξωγενή αντιγόνα απορροφώνται και αποικοδομούνται στα ενδοσώματα. Οι παραγόμενοι επίτοποι συνδέονται με μόρια MHC κατηγορίας II. **(h)** Παρουσίαση συμπλόκων MHC II/επιτόπων: Στην κυτταρική επιφάνεια παρουσιάζονται σύμπλοκα MHC II/επιτόπου, οδηγώντας στην επαγωγή ειδικής απόκρισης CD4+ T κυττάρων ειδικού αντιγόνου. (Πηγή : Lu and Sun, 2018)

Κατιονικά Λιποσώματα (Cationic Lipid-Based Delivery System)

Τα κατιονικά λιποσώματα είναι ένας κοινώς χρησιμοποιούμενος φορέας γονιδίων, όπου μπορούν να συνδυαστούν με αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα για να σχηματίσουν ηλεκτροστατικά σύμπλοκα, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα παροχής mRNA (Christensen et al. 2009). Το σύμπλοκο λιπιδίων-mRNA σχηματίζουν ένα νανοσωματίδιο 80-200 nm που ονομάζεται νανοσωματίδια λιπιδίων (LNP) (Εικόνα 8), το οποίο μπορεί να χορηγηθεί στο κυτταρόπλασμα με ενδοκυττάρωση. Το LNP είναι ένα από τα πιο προηγμένα συστήματα χορήγησης mRNA. Αυτό το σταθερό σωματίδιο αποτελείται από κατιονικά λιπίδια, φυσικά φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πολυαιθυλενογλυκόλη (PolyEthylene Glycol-PEG) (Sun et al., 2019).



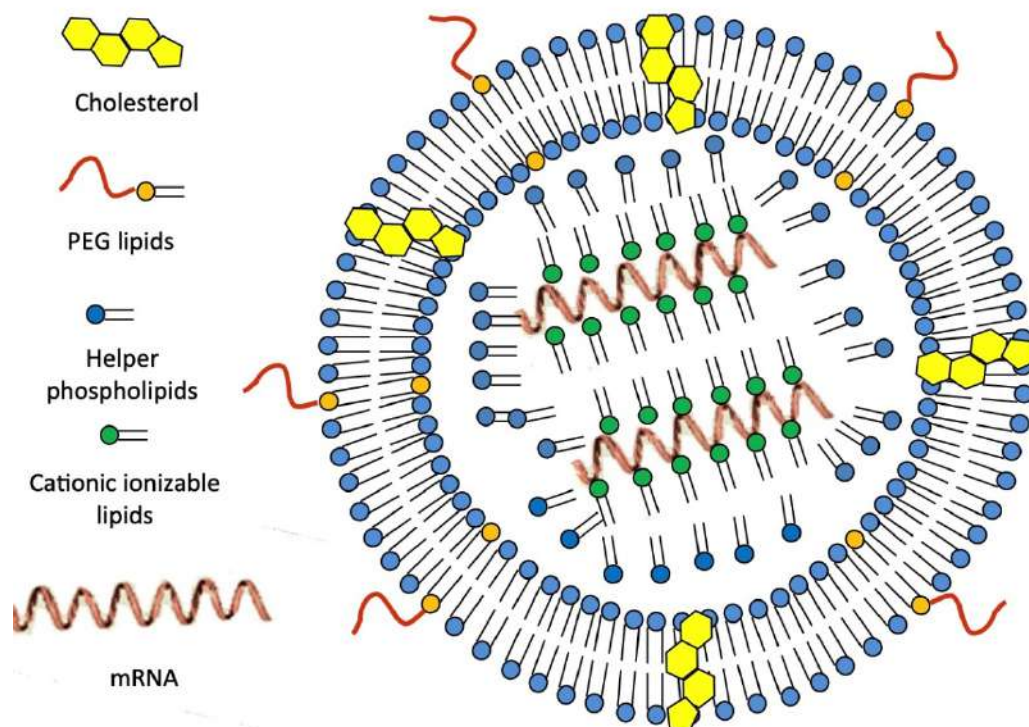
Εικόνα 8: Συστήματα χορήγησης mRNA. **a**, Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυτταρικής παροχής mRNA και της μετατροπής σε πρωτεΐνη. **b**, Ανάπτυξη χρονοδιαγράμματος και βελτίωση ορόσημο των LNPs. **c**, Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των προηγμένων μεταφορέων συμπεριλαμβανομένων των LNPs. [ER:ενδοπλασματικό δίκτυο. HLA"ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο, BBB (Blood Brain Barrier) : Αιματοεγκεφαλικός φραγμός]. (Πηγή: Rohner *et al.*2022)

Το κατιονικό λιπίδιο έχει την ικανότητα να προωθεί την αυτόνομη συσσωμάτωση των mRNAs για να σχηματίσει ένα σωματίδιο ~100 nm και να απελευθερώσει mRNAs στο κυτταρόπλασμα μέσω ιονισμού. Τα φυσικά φωσφολιπίδια υποστηρίζουν τα νανοσωματίδια για να σχηματίσουν μια δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας. Η χοληστερόλη χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής για την αύξηση της σταθερότητας του LNP και η PEG μπορεί να παρατείνει τον χρόνο ημίσειας ζωής του συμπλόκου LNP (Kauffman *et al.*, 2016).

Συνολικά τα σκευάσματα LNP αποτελούνται συνήθως από:

- Ιονιζόμενο κατιονικό λιπίδιο ή πολυμερές υλικό που φέρει τριτοταγείς ή τεταρτοταγείς αμίνες για να ενθυλακώσει το πολυανιονικό mRNA.
- ένα zwitterionic λιπίδιο (π.χ. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine [DOPE]) που μοιάζει με τα λιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη
- χοληστερόλη για τη σταθεροποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας του LNP.

- και ένα λιπίδιο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) για να προσδώσει στο νανοσωματίδιο ένα ενυδατικό στρώμα, να βελτιώσει την κολλοειδή σταθερότητα και να μειώσει την απορρόφηση πρωτεϊνών (Blanco *et al.*, 2015). (εικόνα 9)



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των συστατικών των λιπιδικών νανοσωματιδίων (LNPs)
(Πηγή : Ramachandran et al.2022)

Βιομιμητικά Εξωσώματα (Exosome Biomimetics)

Τα βιομιμητικά εξωσώματα αποτελούνται από σχεδιασμένα λιπίδια, πρωτεΐνες και RNA, τα οποία έχουν παρόμοιες δομές με λιποσώματα ή εξωσώματα και έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητάς τους, της χαμηλής ανοσογονικότητας, της χαμηλής τοξικότητας και της ικανότητάς τους να ξεπερνούν τα βιολογικά εμπόδια. Ωστόσο, τα εξωσώματα που χρησιμοποιούνται ως φορείς χορήγησης φαρμάκων έχουν σημαντικές προκλήσεις, όπως χαμηλές αποδόσεις, πολύπλοκο περιεχόμενο και κακή ομοιογένεια, που περιορίζουν την εφαρμογή τους. Τα κατασκευασμένα εξωσώματα ή βιομιμητικά εξωσώματα έχουν κατασκευαστεί μέσω ποικίλων προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση αυτών των μειονεκτημάτων

Για παράδειγμα, ένας τροποποιημένος αδενοϊός, που θα χρησιμοποιηθεί ως γονιδιακός φορέας, θα μπορούσε να αποδομηθεί ή να εξουδετερωθεί γρήγορα λόγω της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Η χρήση συμπλόκων ενδοσωματικής διαλογής που απαιτούνται για τη μεταφορά (Endosomal-sorting complexes required for transport (ESCRT) είναι μέρος της διαδικασίας ενθυλάκωσης του ιού σε νανοδομές όπου προστατεύει τους φορείς, από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και τους παραδίδει στα κύτταρα κατά μήκος της μεμβράνης πλάσματος. Το ESCRT συμμετέχει επίσης στο σχηματισμό εξωσωμάτων. Έτσι, τα εξωσώματα που παράγονται από κύτταρα μολυσμένα με ιό περιείχαν νουκλεϊκά οξέα που προέρχονται από ιούς, ικές πρωτεΐνες, ακόμη και ιούς. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ιογενούς εισβολής, τα

εξωσώματα διαδραματίζουν διάφορους ρόλους, όπως η μεταφορά του ιού στα κύτταρα-στόχους και η αλλαγή της φυσιολογίας των κυττάρων-στόχων για τη διευκόλυνση της μόλυνσης (Wang et al, 2022).

Για παράδειγμα, τα εξωσώματα από κύτταρα μολυσμένα με HCV ήταν ικανά να μεταδώσουν λοίμωξη σε αφελή (naïve) ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος (Huh7.5.1) και να δημιουργήσουν μια παραγωγική λοίμωξη. Ακόμη και με υπογονιδιωμιακά αντίγραφα, χωρίς δομικές πρωτεΐνες ιού, παρατηρήθηκε μετάδοση του HCV RNA με μεσολάβηση εξωσωμάτων. Αυτό απέδειξε ότι τα βιομιμητικά εξωσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για την παροχή πλασμιδίων, αλλά και mRNA για γονιδιακή θεραπεία (Wang et al.2022).

Λαμβάνοντας υπόψη τα μειονεκτήματα των λιπιδικών νανοσωματιδίων και λιποσωμάτων (βιοσυμβατότητα, γρήγορη αποσύνθεση) , τα βιομιμητικά εξωσώματα μπορεί να αποτελέσουν τη βάση της εξατομικευμένης νανοϊατρικής όσον αφορά το σύστημα χορήγησης φαρμάκων στο μέλλον, το οποίο χαρακτηρίζεται από χαμηλή τιμή, σταθερές φυσικές και χημικές ιδιότητες και καλή βιοσυμβατότητα. Σε σύγκριση με τα φυσικά εξωσώματα, τα βιομιμητικά εξωσώματα είναι πολύ πιο εύκολο να συντεθούν σε μεγάλη κλίμακα. Ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές βιομιμητικών εξωσωμάτων μόλις ξεκίνησαν και τα βιομιμητικά υλικά που παράγονται μέσω συνθετικών στρατηγικών δεν έχουν ακόμη χρησιμοποιηθεί για κλινικό μετασχηματισμό και οι περιορισμοί όπως η κλιμακούμενη παραγωγή, ο καθαρισμός τους (purification) και η ενθυλάκωση του επιθυμητού φορτίου-στόχου θα πρέπει να βελτιωθούν για την κλινική εφαρμογή τους Τα πλεονεκτήματα αλλά και τα μειονεκτήματα τους αναφέρονται περιληπτικά στην εικόνα 8.

Αυτοσυναρμολογούμενα πολυμερή μικκύλια (Self-Assembled Polymeric Micelles)

Το αυτοσυναρμολογούμενο πολυμερές σύστημα χορήγησης μικκυλίων περιλαμβάνει ένα συμπολυμερές πολυαιθυλενιμίνης (Polyethyleneimine Vitamine E Succinate-PVES) τροποποιημένο σουκινικό οξύ, βιταμίνη E (VE, α -τοκοφερόλη). Η VE βρίσκεται στον κατάλογο ανενεργών ουσιών του FDA για ενδοφλέβια, από στόμα και τοπική χρήση και έχει χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα ανθρώπινου ανοσοποιητικού, ως ανοσοενισχυτικό συστατικό γαλακτωμάτων σε μια ποικιλία κτηνιατρικών εμβολίων και ως ανοσοενισχυτικό που χρησιμοποιείται στο εμβόλιο γρίπης πανδημίας H1N1 (Lodaya et al. 2019).

Το εμβόλιο PVES/mRNA χρησιμοποιήθηκε πειραματικά και αποδείχθηκε ότι ενεργοποιεί ειδικά αντιγονικά CD8⁺ T κύτταρα (κύτταρα Th1) που εκφράζουν την κυτοκίνη ανοσοαπόκρισης τύπου 1, IFN-g και CD4⁺ T κύτταρα που εκφράζουν την κυτοκίνη τύπου II, IL-4. Επίσης αξιολογήθηκε ως προς την ασφάλεια του εμβολίου mRNA με το PVES ως φορέα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν τοπικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις ή άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες στο σημείο της ένεσης κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης μετά την ανοσοποίηση (Ren et al., 2021)

Νανο-υδρογέλη (Nano Hydrogel)

Μια έξυπνα ανταποκρινόμενη υδρογέλη νανο-DNA (νανο-υδρογέλη) αναπτύχθηκε ως όχημα για την παροχή mRNA στα κύτταρα και την σταθερή έκφραση πρωτεϊνών. Έχει αναφερθεί ότι σε ένα όξινο μικροπεριβάλλον (Du et al. 2019), οι νανο-υδρογέλες μπορούν να εσωτερικευτούν από τα κύτταρα για να σχηματίσουν ένα συμπλόκο, το οποίο αποσυντίθεται σε λυσοσώματα (et al., 2019) και το mRNA στη συνέχεια απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα για να εκφράσει την κωδικοποιημένη πρωτεΐνη. Αυτά τα συστήματα δεν περιλαμβάνουν χημικούς παράγοντες, επομένως η δομή είναι βιοσυμβατή. Είναι σταθερό επειδή παραμένει άθικτο έξω από το κύτταρο και διασπάται μόνο σε χαμηλό ενδοκυτταρικό pH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι νανο-

υδρογέλες έχουν καλύτερη βιοσυμβατότητα και υψηλότερη αποτελεσματικότητα έκφρασης mRNA από τα κοινά λιποσώματα.

Οι νανο-υδρογέλες αντιπροσωπεύουν μια πολλά υποσχόμενη βιώσιμη εναλλακτική λύση για την παροχή λειτουργικών mRNAs *in vivo* λόγω της καλής βιοσυμβατότητας και σταθερότητάς τους. Από την άποψη της ασφάλειας, η κυτταροτοξικότητα των λιποσωμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των νανο-υδροπηκτωμάτων με φορτίο φαρμάκου Gluc mRNA > 3,18 μg. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ασφάλεια των νανο-υδροπηκτωμάτων για την παροχή mRNA και υποδηλώνουν ότι είναι μια υποσχόμενη εφαρμογή για μεγάλες ποσότητες mRNA (Fu et al. 2019) διότι τα τρέχοντα εμβόλια mRNA, όπως αυτά κατά του SARS-CoV-2, του VZV, του RSV και της γρίπης, συνήθως απαιτούν πολλαπλές ενέσεις.

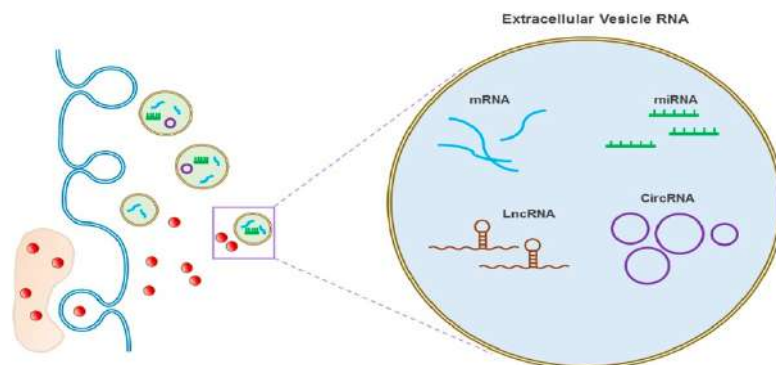
Η αντικατάσταση των συστημάτων χορήγησης νανοσωματιδίων λιπιδίων (LNP) με υδρογέλες ελεγχόμενης απελευθέρωσης έχει τη δυνατότητα να εξορθολογίσει τις διαδικασίες εμβολιασμού, παρέχοντας μια πιο βολική και αποτελεσματική στρατηγική ανοσοποίησης, μειώνοντας παράλληλα την επιβάρυνση των συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης (Zhong *et al.*, 2023).

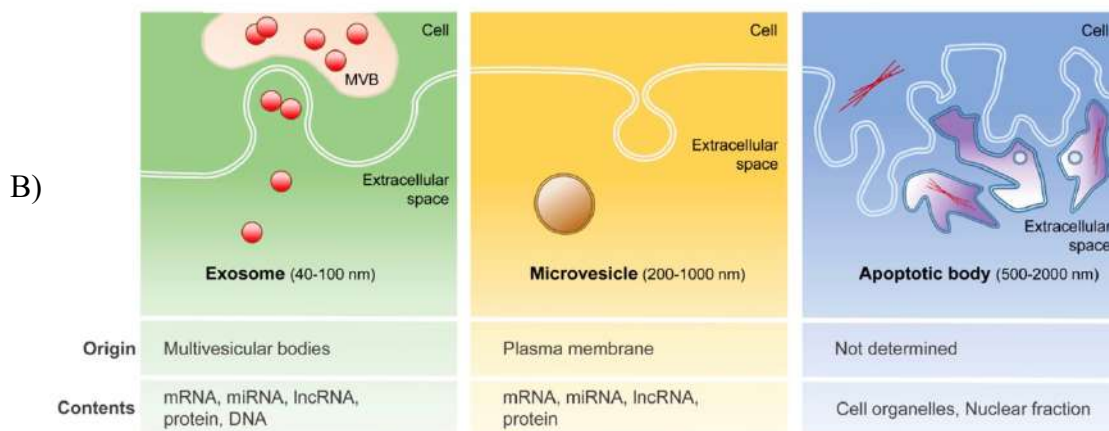
Εξωκυττάρια κυστίδια (EVs)

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles-EVs) έχουν αναδειχθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος φυσικός φορέας παροχής RNA λόγω της ανώτερης βιοσυμβατότητάς τους (εικόνα 10). Αυτές οι νανομεγέθεις δομές, που περικλείονται από διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων, απελευθερώνονται από θηλαστικά και βακτηριακά κύτταρα και περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊνικά οξέα. Τα EVs διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων παρέχοντας λειτουργικά μόρια. Τα EVs αναγνωρίζονται επίσης όλο και περισσότερο ότι έχουν άμεσο ρόλο στις παθολογικές διεργασίες, ιδίως στον καρκίνο και τον νευροεκφυλισμό. Τα EVs έχουν αποτελέσει το επίκεντρο έντονης έρευνας ως βιοδείκτες ασθενειών και προγνωστικών δεικτών, ακόμη και θεραπευτικά εργαλεία (Tian *et al.*, 2014)

Τα EVs θηλαστικών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, βάση του μεγέθους τους αλλά και τις οδούς βιογένεσής τους, σε εξωσώματα, μικροκυστίδια και αποπτωτικά σώματα (Raposo *et al.*, 2013) (εικόνα 10)

A)





Εικόνα 10: Α) Τυπική μορφή EV Β) Διαφορετικοί τύποι εξωκυτταρικών κυστιδίων (Πηγή: Kyoung et al.2017)

Τα EVs αναγνωρίζονται από το σώμα ως αυτόλογα και έτσι επιτρέπεται να κυκλοφορούν χωρίς απόρριψη από το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος. Η αποφυγή ανεπιθύμητων ανοσολογικών αντιδράσεων που προκαλούνται από EVs είναι το πεδίο που πρέπει να δοθεί ιδιαίτερο βάρος για τις μελλοντικές εφαρμογές (Robbins et al. 2014). Με καλύτερη γνώση των καθοριστικών παραγόντων EV που στοχεύουν στην πρόσληψη από άλλους ιστούς, τα EV θα μπορούσαν να κατασκευαστούν για να παρέχουν θεραπευτικούς παράγοντες (νουκλεϊνικά οξέα, πρωτεΐνες ή φάρμακα) σε έναν ιστό-στόχο. Ως εκ τούτου, θα είναι ιδιαίτερα σημαντικό να προσδιοριστούν οι παράγοντες που στοχεύουν τα εξωκυτταρικά κυστίδια σε έναν δεδομένο τύπο κυττάρου ή ιστό (Mulcahy et al. 2014).

Σύστημα χορήγησης με σύνθεση πρωταμίνης

Οι πρωταμίνες είναι μια ομάδα πολυκατιονικών πεπτιδίων που υπάρχουν στα σπερματίδια πολλών ζώων και φυτών, ουσιαστικά είναι μια αλκαλική κατιονική πρωτεΐνη με δομή που μοιάζει με ρητίνη. Ο συνδυασμός mRNA με πρωταμίνη σε διαφορετικές αναλογίες μάζας μπορεί να δώσει ηλεκτροστατικά σύνθετα σωματίδια πρωταμίνης-mRNA με διαφορετικές διαμέτρους (Kallen et al.2013). Αυτή η δομή μπορεί να προστατεύσει αποτελεσματικά το mRNA από την αποικοδόμηση από τις RNAses του ορού και το σύμπλεγμα μπορεί να προκαλέσει ισχυρή ανοσολογική αντίδραση ανοσοκυττάρων όπως DC, μονοκύτταρα, B κύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα και ουδετερόφιλα (Wide *et al.*, 2009, Kowalczyk *et al.*, 2016). Αυτό δείχνει ότι η πρωταμίνη έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο ως φορέας mRNA, αλλά και ως ανοσοποιητικός ενεργοποιητής. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα σύμπλοκα πρωταμίνης-mRNA ενισχύουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της μόλυνσης mRNA, με αποτέλεσμα ισχυρές αποκρίσεις CD4 + T κυττάρων ειδικά για αντιγόνο, CD8 + T κυττάρων και B κυττάρων σε μοντέλα ποντικών (Fotin-Mlczek *et al.*, 2011).

Το KRAS-πεπτίδιο στόχευσης ήταν το πρώτο εμβόλιο με βάση τα πεπτίδια που υποβλήθηκε σε κλινικές δοκιμές (Gjertsen et al.1996). Ένα ευρέως δοκιμασμένο εμβόλιο με βάση τα πεπτίδια, το εμβόλιο στόχευσης της τελομεράσης (GV1001), έχει παρουσιάσει ικανοποιητική ανεκτικότητα και βελτίωσε την επιβίωση των ασθενών σε μια κλινική δοκιμή φάσης I/II (Bernhardt *et al.*, 2006).

Άλλα πεπτίδια που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο λόγο είναι τα πεπτίδια που διεισδύουν στα κύτταρα (cell penetrating peptides-CPPs) τα οποία έχουν μελετηθεί για τις δυνατότητές τους ως φορείς ενδοκυτταρικής παράδοσης νουκλεϊκού οξέος. CPPs με μια επαναλαμβανόμενη με πλούσια σε αργινίνη αμφοπλευρή αλληλουχία, αναφέρθηκε ότι λειτουργεί ως φορέας mRNA σε δενδριτικά κύτταρα και προκαλεί ανοσία Τ κυττάρων *in vivo* (Udhayakumar *et al.*, 2017)

2v) Νέες τεχνολογίες βελτίωσης στόχευσης των mRNA εμβολίων:

Δεν είναι μόνο η ανάπτυξη νέων φορέων το βασικό μέλημα για τη βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων, αλλά και η βελτίωση τεχνικών οι οποίες επιτρέπουν στην αύξηση της ειδικότητάς στόχευσης ή βελτιστοποίησης στόχευσης των mRNA εμβολίων όπου θα δίνει την ικανότητα στην εφαρμογή τροποποιημένης θεραπείας σε συνδυασμό αποτελεσματικής παράδοσης.

Gene editing (CRISPR)

Η πλειοψηφία των τρεχουσών προσπαθειών επεξεργασίας γονιδίων επικεντρώνεται στη θεραπεία μονογονιδιακών διαταραχών, που προκαλούνται από επιβλαβείς αλλαγές σε ένα μόνο γονίδιο, η επέκταση των εργαλείων επεξεργασίας και χορήγησης γονιδίων καθιστά πιο εφικτή τη θεραπεία σύνθετων πολυγονιδιακών ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι αντικές θεραπείες καθώς και η επεξεργασία του επιγενώματος (Thakore, 2016).

Η επεξεργασία του γονιδιώματος μπορεί να επιτευχθεί εκφράζοντας νουκλεάσες ψευδαργύρου-δακτύλου (Zinc-finger nucleases -ZFNs), νουκλεάσες TALENs (Transcription activator-like effector nucleases -) και με το σύστημα CRISPR/CAS9) (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/cas9) (Miller *et al.*, 2007, Hockemeyer *et al.*, 2011, Mali *et al.*, 2013).

Η ανακάλυψη ενδονουκλεασών DNA καθοδηγούμενων από RNA, όπως η Cas9 που σχετίζεται με το CRISPR, το οποίο βρίσκεται στο προκαρυωτικό προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, εξόπλισε τους επιστήμονες με μια εύχρηστη και αποτελεσματική πλατφόρμα για την αλλαγή των γονιδιωματικών πληροφοριών (Sapranaukas *et al.*, 2011).

Μέχρι σήμερα, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη και καλά χαρακτηρισμένη τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων είναι το σύστημα CRISPR-Cas9, προερχόμενο από *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Τα συστήματα CRISPR-Cas9 βασίζονται στη σύζευξη βάσεων μεταξύ ενός μόνο RNA οδηγού (single guide RNA-sgRNA) και μιας αντίστοιχης θέσης στόχου DNA ακολουθούμενης από ένα ξεχωριστό μοτίβο PAM (Protospacer Adjacent Motif).

Η άμεση *in vivo* χορήγηση του spCas9 σε νοσούντα κύτταρα έχει χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για τη διόρθωση μεταλλάξεων σε γονίδια σε ζωικά μοντέλα μυϊκής δυστροφίας Duchenne (mdx) (Long *et al.* 2016), κληρονομικής τυροσυναιμίας τύπου I (fah) (Yin *et al.* 2014) και θανατηφόρου μεταβολικής ηπατικής νόσου (oct) (Yang *et al.* 2016) και για τη μείωση της χοληστερόλης αίματος σε χημειοκαταπονημένα ποντίκια με εξανθρωπισμένο ήπαρ με knockout PCSK9 (Ding *et al.*, 2014).

Όμως παρά τα θετικά αποτελέσματα, μελέτες αποκάλυψαν περιορισμούς του συστήματος CRISPR-Cas9 που σχετίζονται με την κλινική μετάφραση συμπεριλαμβανομένων: περιορισμένη ικανότητα στόχευσης DNA που οδηγούν σε επιδράσεις εκτός στόχου (Tycko *et al.* 2016), χαμηλής αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας γονιδιώματος χρησιμοποιώντας HDR (Komor

et al. 2016) και «ανταγωνιστικής» παράδοσης συστατικών CRISPR-Cas9 χρησιμοποιώντας τόσο ικές όσο και μη ικές μεθόδους (Moreno et al. 2017).

Το μεγάλο μέγεθος της εισαγωγής γονιδίων είναι ένας σοβαρός περιορισμός, οπότε είναι δύσκολο να τεθεί ολόκληρο το μήκος του γονιδίου Cas 9 μαζί με αλληλουχίες sgRNA. Μια ιογενής έκφραση μπορεί επίσης να συσχετιστεί με μη ειδική επεξεργασία γονιδιώματος από τη μακρά διάρκεια έκφρασης πρωτεϊνών επεξεργασίας γονιδιώματος στα κύτταρα (Fu et al. 2013). Ως εκ τούτου, το IVT mRNA μπορεί να είναι μια εναλλακτική επιλογή για την έκφραση πρωτεϊνών επεξεργασίας γονιδιώματος στα κύτταρα για να ξεπεραστεί αυτό το ζήτημα, καθώς το IVT mRNA εκφράζει παροδικά τις πρωτεΐνες επεξεργασίας γονιδιώματος στα κύτταρα, κάτι που είναι σαφώς ευεργετικό για τη μείωση του κινδύνου μη ειδικής επεξεργασίας γονιδιώματος.

Η ειδικότητα στόχευσης DNA του CRISPR-Cas9 μπορεί να βελτιωθεί μελετώντας καλύτερα τον σχεδιασμό και τη σύνθεση οδηγών RNA. Συγκεκριμένα, sgRNAs μικρότερα από 20 νουκλεοτίδια και που περιέχουν 5' αναντιστοιχίες έχουν δείξει λιγότερες επιδράσεις εκτός στόχου (Fu et al., 2014).

Υπάρχει μια κλινική μελέτη όπου έχει συγχωνεύσει με επιτυχία τα πεδία της θεραπευτικής mRNA και της επεξεργασίας γονιδίων CRISPR για τη θεραπεία μιας μορφής κληρονομικής αμυλοειδωσης, ATTR (Gillmore et al. 2021). Η μελέτη τεκμηρίωσε ότι μια εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση LNPs που ενθυλάκωνε ένα συνδυασμένο φορτίο Cas9 mRNA και RNA-οδηγών είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του γονιδίου της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης-στόχου και μια αξιοσημείωτη μείωση κατά >90% των κυκλοφορούντων επιπέδων μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

Γενετικός επαναπρογραμματισμός

Το 2006, οι Yamanaka και Takahashi διαπίστωσαν ότι τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα θα μπορούσαν να επαναπρογραμματιστούν σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC) μέσω της αναγκαστικής έκφρασης τεσσάρων παραγόντων μεταγραφής OCT3/4, SOX2, MYC και KLF4 (τώρα συχνά αναφέρονται ως παράγοντες Yamanaka).

Για παράδειγμα, στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου, η ενδομυοκαρδιακή ένεση ανθρώπινου αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα A (VEGF-A) που κωδικοποιεί mRNA σε ποντίκια, είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των καρδιακών προγονικών κυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα και τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και της μακροπρόθεσμης επιβίωσης (Zangi et al. 2013). Το 2021, η Moderna και η AstraZeneca πραγματοποίησαν μια κλινική δοκιμή φάσης II, στην οποία ένα γυμνό IVT mRNA που κωδικοποιεί τον VEGF-A χορηγείται σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια μέσω επικαρδιακής ένεσης και αυτή η μελέτη κατέδειξε τις θετικές δυνατότητες της θεραπείας υποκατάστασης πρωτεϊνών με κωδικοποίηση IVT mRNA.

Η θεραπεία πρωτεϊνικής υποκατάστασης είναι η πιο απλή και προφανής εφαρμογή για τα συνθετικά τροποποιημένα mRNA, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών για να αντικαταστήσουν πρωτεΐνες που είναι ανεπαρκείς ή μεταλλαγμένες, και κατά συνέπεια μη λειτουργικές, σε ορισμένες ασθένειες. Στον τομέα της θεραπείας υποκατάστασης πρωτεϊνών, τα mRNAs είναι πιο αποτελεσματικά από τα πρωτεϊνικά φάρμακα, επειδή ένα μόνο μόριο mRNA μπορεί να μεταφραστεί σε πολλά αντίγραφα πρωτεϊνών (Hajj et al., 2017).



Τα τροποποιημένα με νουκλεοσίδια mRNA έχουν εμφανίσει πιο υψηλές επιδόσεις στη θεραπεία πρωτεϊνικής υποκατάστασης λόγω της μειωμένης ανοσογονικότητάς τους και της βελτιωμένης αποτελεσματικότητας μετάφρασης, σε σύγκριση με τα μη τροποποιημένα (Kariko *et al.*, 2005).

Σε μια άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε θεραπεία πρωτεϊνικής υποκατάστασης μέσω ενδομυϊκής έγχυσης τροποποιημένου mRNA σε μοντέλο ποντικού που είχε θανατηφόρα συγγενή πνευμονική νόσο που προκλήθηκε από την απουσία επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης Β (SPB). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντικατάσταση του 25% U και C στο mRNA μείωσε την ανοσογονικότητα και το τροποποιημένο mRNA προστάτευσε το ποντίκι από αναπνευστική ανεπάρκεια (Kormann *et al.*, 2011).

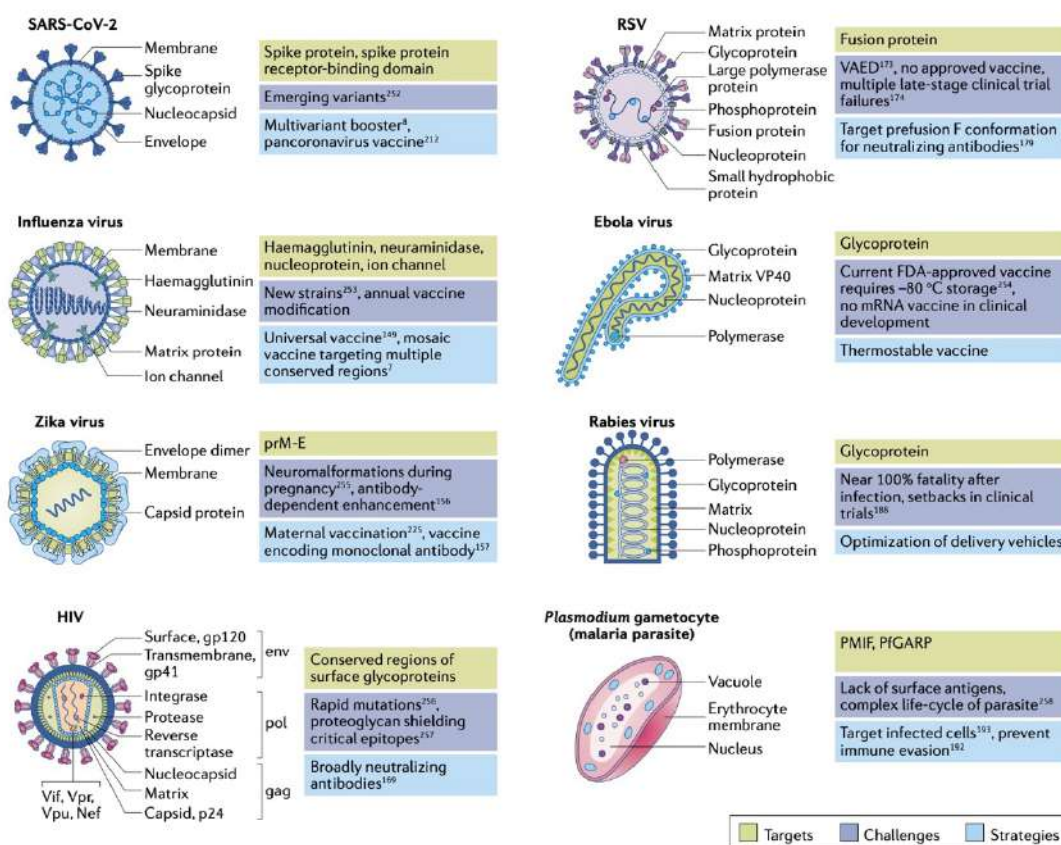
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Θεραπευτικοί στόχοι

3.i) Μεταδοτικές ασθένειες

Οι λοιμώδεις νόσοι είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, επηρεάζοντας δυσανάλογα τα παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών και τους ανθρώπους σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Στην πραγματικότητα, πέντε από τις δέκα κύριες αιτίες θανάτου σε χώρες χαμηλού εισοδήματος προκαλούνται από μολυσματικούς παράγοντες: λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού (π.χ. πνευμονία), HIV / AIDS, διαρροϊκή νόσο, ελονοσία και φυματίωση (Mathers et al. 2009).

Τα σχεδιασμένα εμβόλια με την τεχνική *in vitro* transcribed (IVT) mRNA για μολυσματικές ασθένειες είναι οι πιο πρόσφατες εφαρμογές των θεραπειών. Επί του παρόντος, ξεκινώντας από τον SARS-CoV-2, αρκετά εμβόλια mRNA κατά μολυσματικών ασθενειών όπως ο HIV (human immunodeficiency virus), ο ιός Ζίκα και η λύσσα υποβάλλονται σε κλινικές δοκιμές. Στον παρακάτω πίνακα 2 συνοψίζονται μερικές κλινικές δοκιμές για μολυσματικές ασθένειες, με τους στόχους, τρόπο δράσης αλλά και περιορισμούς για κάθε ασθένεια.



Πίνακας 2: Κοινά παθογόνα για τα οποία αναπτύσσονται εμβόλια mRNA. Αναγράφονται οι στόχοι, στρατηγικές στόχευσης και οι προκλήσεις για τις συγκεκριμένες ασθένειες. (Πηγή: Chaudhary et al. 2021).

Τα εμβόλια mRNA χρησιμοποιούν συνήθως τις επιφανειακές πρωτεΐνες για τη στόχευση ιών, για παράδειγμα η πρωτεΐνη ακίδα του SARS-CoV-2 (Wu *et al.*, 2021), πρωτεΐνη αιμοσυγκολλητίνης (Hemagglutinin-HA) ιών γρίπης (Boni, 2008), πρωτεΐνη μεμβράνης και

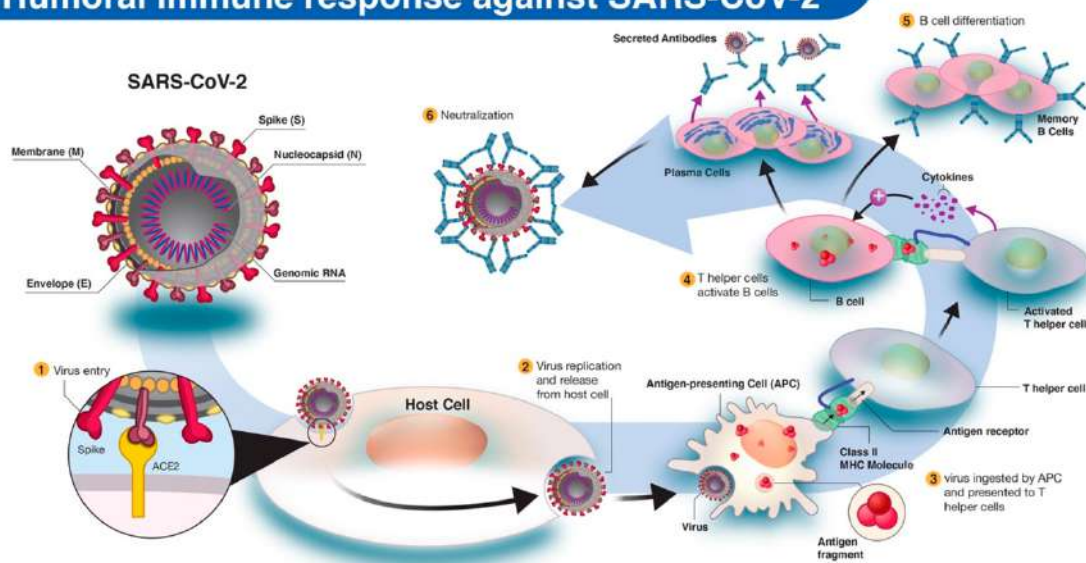
φακέλου (precursor Membrane-Envelope protein-prM-E) του ιού Zika (Panchaud et al, 2016), πρωτεΐνη σύντηξης αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (Respiratory syncytial virus-RSV)(Kirtane, et al. 2021) και επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus-HIV) (Berndsen, et al. 2020) του ιού Ebola (Jusu et al. 2018), του ιού του δάγκειου πυρετού (Dengue virus-DENV) (Zhang et al.2020) και του ιού της λύσσας (Stokes *et al.*, 2020)

Επιπλέον, μπορούν να στοχεύσουν πολύπλοκα παθογόνα όπως το *Plasmodium* χρησιμοποιώντας μη επιφανειακά αντιγόνα όπως ο μεταναστευτικός ανασταλτικός παράγοντας μακροφάγων του πλασμώδιου (*Plasmodium* macrophage migratory inhibiting factor-PMIF) ή η πλούσια σε γλουταμικό οξύ πρωτεΐνη του παθογόνου *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum* glutamic-acid-rich protein-PfGARP). Κάθε παθογόνο θέτει ένα μοναδικό σύνολο προκλήσεων, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής θνησιμότητας, των ταχέων μεταλλάξεων, της ανοσοδιαφυγής, των νέων στελεχών και παραλλαγών. Ο σκοπός όλων των ερευνητικών ομάδων είναι ανάλογα με τις προκλήσεις, τα εμβόλια mRNA που θα κατασκευαστούν να κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, διατηρημένες περιοχές αντιγόνων ή μονοκλωνικά αντισώματα όπου θα μπορούν να παραδοθούν με ασφάλεια σε υγιείς ενήλικες, παιδιά, ηλικιωμένους αλλά και έγκυες γυναίκες.

SARS-CoV-2

Η λοίμωξη SARS-CoV-2 (Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο τύπου 2 από τον Κορονοϊό-Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) στοίχισε περισσότερες από 6 εκατομμύρια θανάτους σε πάνω από 570 εκατομμύρια μολύνσεις, γεγονός που τον καθιστά έναν από τους πιο θανατηφόρους ιούς στην ιστορία. Αν και οι περισσότερες λοιμώξεις SARS-CoV-2 δεν είναι απειλητικές για τη ζωή σε νεότερους ανθρώπους χωρίς προϋπάρχουσες ιατρικές παθήσεις, μπορεί να προκαλέσει μια ανεξέλεγκτη ανοσολογική απόκριση στους πνεύμονες που καταστρέφει τα επιθήλια και τις κυψελίδες. Αυτή η βλάβη μπορεί να προκαλέσει πνευμονικό οίδημα, επικίνδυνες αυξήσεις στην αγγειακή διαπερατότητα και θάνατο (Tay *et al.*, 2020). Στην παρακάτω εικόνα 11, αναπαρίσταται ο τρόπος δράσης του SARS-CoV-2.

Humoral immune response against SARS-CoV-2

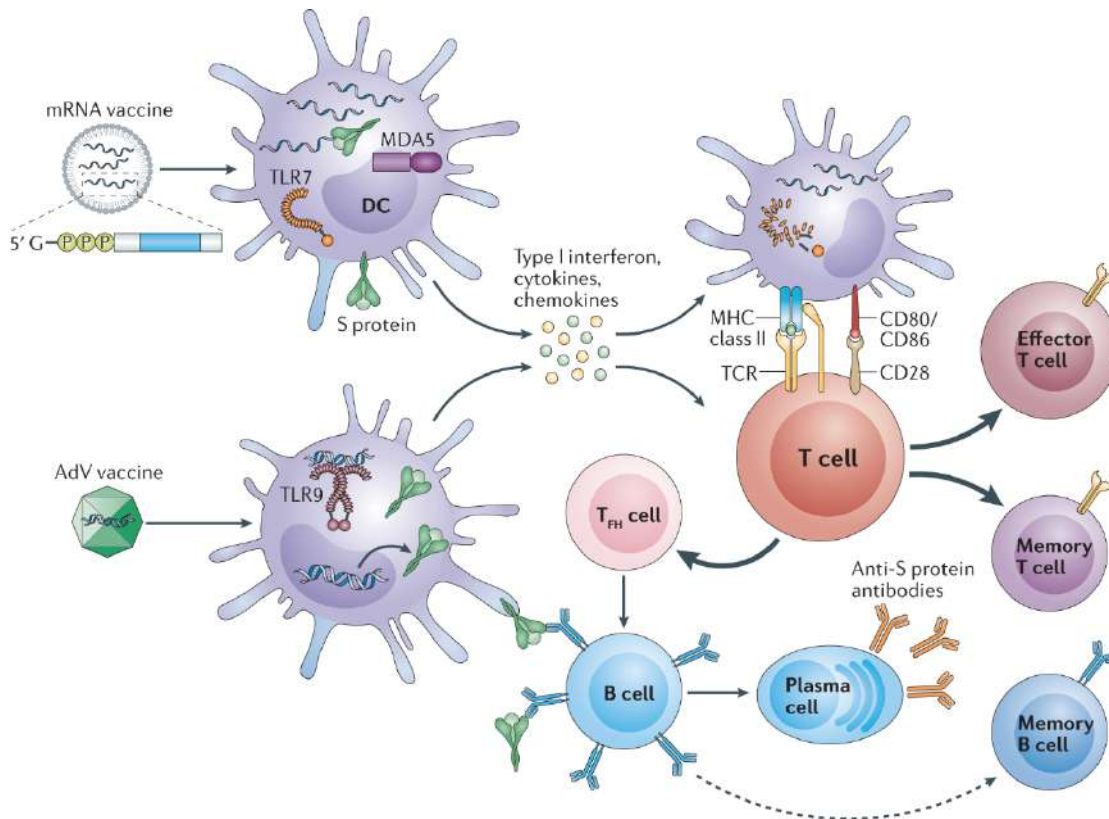


Εικόνα 11. Κυτταρικός μηχανισμός ανοσολογικής ενεργοποίησης. (1) Ο ιός SARS-CoV-2 εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακίδας του ιού και των πρωτεϊνών του μεταρρεπτικού ενζύμου 2 της αγγειοτενσίνης (Angiotensin-converting enzyme 2-ACE2) του ξενιστή. (2 και 3) Μετά την αντιγραφή και την απελευθέρωση από τα κύτταρα ξενιστές, ένα υποσύνολο ιών ενδοκυτταρώνεται και επεξεργάζεται από αντιγονοπαρουσιάζοντα κύτταρα (APCs) όπως μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα. (4) Κατακερματισμένα αντιγόνα SARS-CoV-2 θα παρουσιαστούν σε T βοηθητικά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους θα αλληλεπιδράσουν και θα ενεργοποιήσουν τα B κύτταρα. (5) Τα ενεργοποιημένα B κύτταρα θα πολλαπλασιαστούν και θα διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα ή B κύτταρα μνήμης με υποδοχείς δέσμευσης υψηλής συγγένειας για το αρχικό αντιγόνο SARS-CoV-2. Τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν τους ειδικούς υποδοχείς SARS-CoV-2 με τη μορφή αντισωμάτων IgM, IgG ή IgA. (6) Η εξουδετέρωση με μεσολάβηση αντισωμάτων συμβαίνει όταν τα ειδικά αντισώματα του SARS-CoV-2 δεσμεύονται σε ιικά αντιγόνα και αποτρέπουν την αλληλεπίδραση του ιού και την είσοδο στα κύτταρα ξενιστές. (Πηγή: Ghaffari *et al.*, 2020.)

Μια προσέγγιση για το εμβόλιο SARS-CoV-2 είναι η χρησιμοποίηση ενός διαφορετικού ιού, ενός αδενοϊού (Adenovirus-AdV) προκειμένου να κωδικοποιήσει γενετικά πρωτεΐνες που προορίζονται για την καταπολέμηση των λοιμώξεων COVID-19. Η Pfizer/BioNTech ήταν η πρώτη που έλαβε έγκριση στις 11 Δεκεμβρίου 2020, με τη Moderna να λαμβάνει έγκριση μια εβδομάδα αργότερα. Το εμβόλιο της Johnson & Johnson εγκρίθηκε στις 27 Φεβρουαρίου 2021.

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, για τα εμβόλια mRNA, το mRNA μπορεί να χρησιμεύσει τόσο ως ανοσογόνο (κωδικοποιώντας την ιική πρωτεΐνη) όσο και ως ανοσοενισχυτικό, λόγω των εγγενών ανοσοδιεγερτικών ιδιοτήτων του RNA. Κατά την είσοδο στα κύτταρα, το μονόκλωνο RNA (ssRNA) και το δίκλωνο RNA (dsRNA) αναγνωρίζονται από διάφορους ενδοσωμικούς και κυτταροπλασματικούς έμφυτους αισθητήρες που αποτελούν κρίσιμο βήμα της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης στους ιούς. Οι ενδοσωμικοί υποδοχείς τύπου Toll (TLR3 και TLR7) δεσμεύονται στο ssRNA στο ενδόσωμα, ενώ το dsRNA δεσμεύεται στα συστατικά του φλεγμονώδους σωματίου όπως οι αισθητήρες ιικού RNA, όπως MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5), RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), (Nucleotide-binding oligomerization domain 2 -NOD2) και PKR (Protein Kinase-R) δεσμεύονται στο dsRNA στο κυταρόπλασμα. Η PKR είναι κεντρικό μέρος του μονοπατιού της αντιϊκής άμυνας και όταν δεσμευτεί με dsRNA η PKR φωσφορυλιώνει το eIF2 α , αναστέλλοντας έτσι την πρωτεϊνική σύνθεση σε ιογενώς μολυσμένα κύτταρα (Lemaire *et al.*, 2008). Στην

παρακάτω εικόνα (εικ. 12) αναλύονται οι δυο μηχανισμοί των mRNA εμβολίων που είτε χρησιμοποιούν mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη S, η οποία πρωτεϊνική ακίδα (S) του SARS-CoV-2, παίζει βασικό ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης υποδοχέα και σύντηξης κυτταρικής μεμβράνης, είτε τροποποιημένο ιό (Adenovirus-AdV)



Εικόνα 12: Οι δυο μηχανισμοί εμβολίων. Το mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεϊνική ακίδα (S) του SARS-CoV-2 που ενθυλακώνεται σε νανοσωματίδια λιπιδίων ή φορείς αδενοϊού (AdV) που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη S - εισέρχονται σε δενδριτικά κύτταρα (DC) στο σημείο της ένεσης ή εντός των λεμφαδένων, με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλών επιπέδων πρωτεΐνης S. Επιπλέον, οι έμφυτοι αισθητήρες ενεργοποιούνται από την εγγενή επικουρική δραστηριότητα των εμβολίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ιντερφερόνης τύπου I και πολλαπλών προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών. Οι αισθητήρες RNA όπως ο υποδοχέας τύπου Toll 7 (TLR7) και MDA5 ενεργοποιούνται από τα εμβόλια mRNA και το TLR9 είναι ο κύριος δίκλωνος αισθητήρας DNA για το εμβόλιο AdV. Τα ενεργοποιημένα DCs που προκύπτουν, παρουσιάζουν αντιγόνο και συνδιεγερτικά μόρια σε S πρωτεΐνη-ειδικά T κύτταρα (T_{FH} -Θηλακιοδη βοηθητικά-Follicular Helper) τα οποία ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε κύτταρα για να σχηματίσουν κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα ή βοηθητικά T κύτταρα. Τα T θηλακιοδη βοηθητικά κύτταρα (T_{FH}) βοηθούν τα ειδικά, για την πρωτεΐνη S, B κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα και να προωθήσουν την παραγωγή αντισωμάτων πρωτεΐνης αντι-S υψηλής συγγένειας. Μετά τον εμβολιασμό, τα T κύτταρα μνήμης ειδικά για την πρωτεΐνη S και τα B κύτταρα αναπτύσσονται και κυκλοφορούν μαζί με αντισώματα υψηλής συγγένειας SARS-CoV-2, τα οποία μαζί βοηθούν στην πρόληψη επακόλουθης μόλυνσης με SARS-CoV-2. [TCR, υποδοχέας T κυττάρων]. (Πηγή: Teijaro και Farber. 2021)

Σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο, έχουν ωστόσο εντοπιστεί παραλλαγές του ιού. Αυτές οι παραλλαγές τείνουν να έχουν μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες ακίδας που μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας και μειωμένη απόκριση από το ανοσοποιητικό σύστημα και ως εκ τούτου και αποτελεσματικότητα από τα τρέχοντα εμβόλια. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για να επιβεβαιωθούν οι μοναδικές ιδιότητες αυτών των παραλλαγών, καθώς και η ανταπόκρισή τους στα τρέχοντα εμβόλια.

Ιός Έμπολα

Ο ιός Έμπολα (Ebola virus-EBOV) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1976 ως ο παράγοντας που ευθύνεται για σποραδικά ξεσπάσματα της νόσου του Έμπολα. Αυτός ο ιογενής αιμορραγικός πυρετός είναι θανατηφόρος στο 50-90% των ασθενών, ανάλογα με το στέλεχος. Η επιδημία Έμπολα το 2014-2016 στη Δυτική Αφρική στοίχισε περισσότερες από 11.000 ζωές (Kaner et al. 2016). Το 2019, ο FDA ενέκρινε έναν ανασυνδυασμένο ιό φυσαλιδώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus-VSV) ως βάση για την ανάπτυξη εμβολίου για τον ιό Έμπολα (rVSV-EBOV). Αν και το rVSV-EBOV είναι 97,5% αποτελεσματικό στην πρόληψη της μετάδοσης του Έμπολα σε σύγκριση με τον μη εμβολιασμό οι κλινικές δοκιμές έφεραν στο φως ορισμένες ανησυχίες για την ασφάλεια του, για παράδειγμα, οξεία αρθρίτιδα και δερματικό εξάνθημα σε υψηλές δόσεις (Agnandji *et al.*, 2016).

Ένα άλλο εμβόλιο mRNA έχει επιδείξει αποτελεσματικότητα σε ποντίκια. Πρόκειται για ένα μη τροποποιημένο, αυτοενισχυόμενο mRNA που κωδικοποιεί τη γλυκοπρωτεΐνη EBOV σε νανοσωματίδιο δενδριμερούς πολυαμιδοαμίνης. Το εμβόλιο προκάλεσε στο ποντίκια την παραγωγή αντισωμάτων IgG ειδικά για γλυκοπρωτεΐνες και ισχυρή έκφραση των IFN γ και IL-2 από CD8⁺ και CD4⁺ T κύτταρα σε δύο δοσολογικά σχήματα (δύο δόσεις 4 μ g ή μία δόση 40 μ g) τα οποία προστάτευσαν τα ποντίκια από μια θανατηφόρα πρόκληση του ιού (Chahal *et al.*, 2016).

Ιός της Γρίπης (Influenza virus)

Ο ιός της γρίπης, είναι μία από τις πιο κοινές ιογενείς λοιμώξεις σήμερα. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι ιών γρίπης, με τρεις τύπους - τύπου A, B και C - που είναι γνωστό ότι μολύνουν τον άνθρωπο. Ο τύπος A είναι ο πιο μολυσματικός από αυτούς, υπεύθυνος για ορισμένες από τις παγκόσμιες πανδημίες γρίπης. Γενικά, οι περισσότερες λοιμώξεις από τον ιό της γρίπης οδηγούν σε υψηλό πυρετό, ρινική καταρροή, πόνο στις αρθρώσεις και τους μυς, βήχα και αίσθημα εξάντλησης. Δεδομένου ότι οι λοιμώξεις είναι τόσο συχνές, υπάρχουν ετήσια εμβόλια που αναπτύσσονται για την καταπολέμηση των εξελισσόμενων ιικών στελεχών.

Όπως και με άλλα εμβόλια, τα εμβόλια mRNA διερευνώνται ως εναλλακτική προσέγγιση. Σε μία μελέτη (Brazzoli *et al.*, 2016) ένα εμβόλιο mRNA που στοχεύει την αιμοσυγκολλητίνη (hemagglutinin -HA) ενός ιού γρίπης τύπου A αναπτύχθηκε και εγχύθηκε σε ποντίκια, τόσο νεαρά όσο και ηλικιωμένα. Επιπλέον, το εμβόλιο ήταν σε θέση να αντέξει τη θερμική καταπόνηση, καθώς και να δώσει κάποια προστασία έναντι άλλων αντιγόνων, κυρίως της εξαιρετικά διατηρημένης ιικής νουκλεοπρωτεΐνης.

Ο εμβολιασμός αναφέρθηκε ότι επάγει αποτελεσματικά λειτουργικά εξουδετερωτικά αντίσωμα και ειδικά για HA CD4⁺ Th1 κύτταρα και CD8⁺ κυτταροτοξικές ανοσολογικές αποκρίσεις T κυττάρων. Οι Pardi *et al.* προκάλεσαν επιτυχώς ειδική απόκριση αντισωμάτων HA σε ποντίκια, κουνέλια και κουνάβια με ανοσοποίηση με νουκλεοσιδικό τροποποιημένο μη αναπαραγόμενο υποψήφιο εμβόλιο mRNA που κωδικοποιεί τον ιό της γρίπης πλήρους μήκους HA που διαμορφώθηκε σε LNP (Pardi *et al.*, 2018). Το τελευταίο αποτέλεσμα δείχνει ότι αυτό το συγκεκριμένο εμβόλιο mRNA θα μπορούσε να έχει χρήση για την επαγωγή ανοσίας και πέρα από τη γρίπη.

Μια παρόμοια μελέτη είχε χρησιμοποιήσει μια διαφορετική μέθοδο, το κατιονικό γαλάκτωμα ελαίου σε νερό, ως μέθοδο χορήγησης του εμβολίου mRNA (Petsch *et al.*, 2012). Σε μια άλλη

μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν εμβόλια mRNA τροποποιημένα με νανοσωματίδια λιπιδίων για τη δημιουργία γρήγορων και αυξημένων ανοσολογικών αποκρίσεων σε ποντίκια, κουνάβια και άλλα μη ανθρώπινα πρωτεύοντα (Bahl *et al.*, 2017).

Η ομάδα του Feldman ανέφεραν κλινικές δοκιμές φάσης I των δύο πρώτων μη αναπαραγόμενων (non-replicative) εμβολίων mRNA κατά των ιών της γρίπης (H10N8 και H7N9) που κωδικοποιούν αιμοσυγκολλητίνη (Hemagglutinin-HA) πλήρους μήκους αντίστοιχα από H10N8 και H7N9 με αναλογία μάζας 1:20 mRNA προς LNP (Lipid nanoparticles). Και τα δύο εμβόλια χρησιμοποίησαν φορέα LNP που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε εμβόλια mRNA κατά του ιού Zika (Feldman *et al.*, 2019).

HIV/AIDS

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας ή HIV και η σχετική του ασθένεια, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome-AIDS), χαρακτηρίζονται ως σημαντική παγκόσμια απειλή για την υγεία. Ο ιός είναι ένας τύπος ρετροϊού που μολύνει τον άνθρωπο (με περίβλημα ssRNA) που προκαλεί σημαντική κατάρρευση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο μειωμένος αριθμός T κυττάρων καθιστά το σώμα απίστευτα ευαίσθητο ακόμη και σε απλές λοιμώξεις όπως το κοινό κρυολόγημα. Έως το 2020, περίπου 38 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV(HIV.gov). Το AIDS χαρακτηρίστηκε ως επιδημία τον 20ο αιώνα λόγω του υψηλού αριθμού θανάτων και της ανεξέλεγκτης μετάδοσης του ιού, αλλά έκτοτε αρκετές θεραπευτικές επιλογές έχουν γίνει διαθέσιμες για άτομα που έχουν εκτεθεί στον ιό HIV.

Ο εμβολιασμός mRNA έχει διερευνηθεί ως στρατηγική για την παροχή προφυλακτικής ανοσίας στον ιό HIV. Η ανάπτυξη εμβολίων δεν έχει παρουσιάσει επιτυχίες ιστορικά. Το υψηλό ποσοστό μετάλλαξης και η δυσκολία της δημιουργίας μακροπρόθεσμων αντισωμάτων με υψηλή ικανότητα εξουδετέρωσης του ιού, έχουν καταστήσει δύσκολη την ανάπτυξη και δεν υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμα εμβόλια κατά του HIV για χρήση.

Ωστόσο, με τις προόδους στην τεχνολογία mRNA και την πρόσφατη αναβίωσή της ως δυναμικού θεραπευτικού, μπορεί να υπάρχουν πιθανές οδοί για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου mRNA. Το 2018, οι Leal *et al.* απέδειξαν ότι το γυμνό mRNA θα μπορούσε να ενεργοποιήσει ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα σε HIV θετικούς ασθενείς.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η πρώτη σε ανθρώπινη φάση I κλινική δοκιμή με γυμνό mRNA (in-human clinical trial with naked mRNA -iHIVARNA) που περιέχει σήματα ενεργοποίησης δενδριτικών κυττάρων (TriMix) και κωδικοποιούν μια νέα αλληλουχία ανοσογόνων HIV (HIV immunogen sequence -HTI) που μπορεί να ανακατευθύνει την ανοσία των T-κυττάρων σε άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV σε πιο ευάλωτους ιικούς στόχους. Τα αποτελέσματα έδειξαν καλή ανεκτικότητα και αυξημένη παραγωγή ειδικών για τον ιό HIV T-κυττάρων

Πιο πρόσφατα, οι Saunders *et al.* (2020) ανέπτυξαν ένα πλήρες εμβόλιο mRNA, με φορέα χορήγησης LNP, και απέδειξαν την ικανότητά του να παράγει αντισώματα σε μοντέλα πρωτεύοντων. Ο εμβολιασμός οδήγησε σε ισχυρή διέγερση του ανοσοποιητικού που είχε ως αποτέλεσμα υψηλούς τίτλους αντισωμάτων δέσμησης HIV ορού με καλή ειδικότητα δέσμησης. Οι ερευνητές επεσήμαναν την ευκολία παραγωγής και κλιμάκωσης, αλλά και τις προκλήσεις που

θα μπορούσε να προκαλέσει η απαίτηση μιας αλυσίδας ψύξης για τη σωστή φύλαξη και μεταφορά του. Η πρώτη κλινική δοκιμή στον άνθρωπο ενός εμβολίου mRNA έναντι του HIV ξεκίνησε την άνοιξη του 2021 - με επικεφαλής τη Moderna σε συνεργασία με τη Διεθνή Πρωτοβουλία Εμβολίου κατά του AIDS (IAVI) και την Scripps Research. Η δοκιμή έδειξε ότι το 97% των ληπτών ανέπτυξε την ικανότητα να παράγει ευρέως εξουδετερωτικά αντισώματα, με τις ενδείξεις ότι ανταποκρινόταν μόνο στο 30% των στελεχών του HIV στις περιοχές δοκιμής και ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα για την παρακολούθηση της ωρίμανσης των αντισωμάτων (Venkatesan, 2021).

Ιός της λύσσας (Rabies virus)

Ο ιός της λύσσας είναι μια ζωνοσογόνος μολυσματική ασθένεια που στοχεύει το κεντρικό νευρικό σύστημα. Μεταδίδεται από σιελογόνο επαφή από μολυσμένο ζώο και είναι εξαιρετικά επικίνδυνο. Από νωρίς, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό και μυρμήγκιασμα στο σημείο του δαγκώματος / γρατσουνιών και μπορούν να προχωρήσουν σε βίαιες, ανεξέλεγκτες κινήσεις, απώλεια κίνησης, σύγχυση και απώλεια συνείδησης. Ένα άλλο βασικό σύμπτωμα είναι η υδροφοβία, ο φόβος του νερού, το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως βασικό σύμπτωμα στη διάγνωση της λύσσας. Ο χρόνος εξέλιξης εξαρτάται από το πόσο μακριά πρέπει να ταξιδέψει ο ιός από το περιφερικό νευρικό σύστημα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Για πολλούς, μόλις αρχίσουν να εμφανίζονται ισχυρότερα συμπτώματα, είναι πολύ αργά για θεραπεία και ο ιός είναι γενικά θανατηφόρος σε αυτές τις καταστάσεις. (WHO, 2021)

Ωστόσο, ο εμβολιασμός μπορεί να συμβάλει στην άμβλυνση αυτού του ζητήματος, ιδίως στις ανεπτυγμένες χώρες. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, οι σημερινοί εμβολιασμοί δεν είναι σε θέση να συμβαδίσουν με τον ταχέως μεταλλασσόμενο ιό. Έτσι, διερευνάται επί του παρόντος μια νέα προσέγγιση εμβολίου με βάση το mRNA, η οποία στοχεύει ορισμένα από τα λιγότερο ταχέως μεταβαλλόμενα μέρη του ιού (Schnee et al, 2016). Όπως και το εμβόλιο mRNA του ιού του δάγκειου πυρετού, τα αναπτυσσόμενα εμβόλια mRNA κατά της λύσσας, προσπαθούν να δημιουργήσουν αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένες γλυκοπρωτεΐνες στο κέλυφος του ιού. Σε μελέτες σε ζώα, η έρευνα έχει δείξει αύξηση της ανοσολογικής ενεργοποίησης και ωρίμανσης ως απόκριση στο εμβόλιο, καθώς και ορισμένες προκαταρκτικές κλινικές δοκιμές που δείχνουν παρόμοια αποτελέσματα, με λογικά χαμηλό αριθμό παρενεργειών (Alberer et al., 2017).

Ιός Zika

Ο ιός Zika (ZIKV) είναι ένας ιός που μεταδίδεται από κουνούπια. Η λοίμωξη από τον ιό Ζίκα ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1947. Οι ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον ιό Ζίκα είναι συχνά ασυμπτωματικοί ή εμφανίζουν ήπια συμπτώματα όπως πυρετό, εξάνθημα και μυϊκό πόνο. Ωστόσο, ο Ζίκα εμφανίστηκε ως παγκόσμια κρίση υγείας κατά τη διάρκεια επιδημίας το διάστημα 2015-2016 στην Αμερική, όταν και ο ιός εντοπίστηκε να προκαλεί σοβαρές εμβρυϊκές νευροδυσπλασίες και θάνατο εμβρύων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Poland et al., 2018).

Ο ZIKV έχει συνδεθεί με σοβαρά αναπτυξιακά ελαττώματα, ιδιαίτερα στις νευρογνωστικές ικανότητες και την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Αναφορές περιστατικών έχουν δείξει συνδέσεις μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό Zika και του συνδρόμου Guillain-Barré σε ενήλικες και συγγενούς δυσπλασίας σε βρέφη.

Η ομάδα του Richner κατάφερε να παράγει ένα τροποποιημένο εμβόλιο mRNA με ενθυλακωμένα νανοσωματίδια λιπιδίων (LNP) κατά του ZIKV και παρατήρησε την επαγωγή ανοσολογικής αντίδρασης σε μοντέλα ποντικών που οδηγούσε στην εξαφάνιση του ιού (Richner et al. 2017). Πιο συγκεκριμένα, ο χορηγηθέντας κλώνος mRNA, ο οποίος κωδικοποιούσε δομικές πρωτεΐνες ZIKV, τροποποιήθηκε στις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές και είχε υποκαταστάσεις βάσης για να διευκολύνει τη μετάφραση. Τα λιπιδικά νανοσωματίδια επιλέχθηκαν ως φορείς παράδοσης λόγω της ισχυρής απόδοσής τους σε προηγούμενες δοκιμές με siRNA και χορηγήθηκαν σε ποντίκια μέσω ενδομυϊκού εμβολιασμού.

Είναι σημαντικό ότι κάποια εμβόλια που δεν είναι σχεδιασμένα με υψηλή ειδικότητά κατά του ιού Zika μπορούν να αυξήσουν τη μολυσματικότητα του ιού του δάγκειου πυρετού (Wallner και Richner, 2021). Ο ιός του δάγκειου πυρετού προέρχεται από την ίδια ιική οικογένεια με τον Zika και οι πρωτεΐνες του φακέλου τους μοιράζονται 54-59% αλληλεπικαλυπτόμενη αλληλουχία αμινοξέων (Dejnirattisai et al. 2016). Επομένως, είναι πιθανό ότι το αντιγόνο πρωτεΐνης φακέλου που κωδικοποιείται από ένα εμβόλιο Zika ωθεί την παραγωγή αντισωμάτων που είναι αντιδρούν και με την πρωτεΐνη φακέλου δάγκειου πυρετού (διασταυρούμενη αντίδραση). Σε περίπτωση επακόλουθης λοίμωξης από τον ιό του δάγκειου πυρετού, μπορεί να εμφανιστεί εξαρτώμενη από αντισώματα ενίσχυση στην οποία τα μη βέλτιστα αντισώματα αντι-Zika συνδέονται με τον ιό του δάγκειου πυρετού. Αυτή η δέσμευση ενισχύει την είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές και επιδεινώνει τα συμπτώματα του δάγκειου πυρετού.

Αρκετά εμβόλια του ιού Zika βρίσκονται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές και η Moderna βρίσκεται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές Φάσης 1 και 2 με πιθανό υποψήφιο εμβόλιο mRNA για να παραδώσει ένα τροποποιημένο mRNA prM-E που περιέχει έναν μεταλλαγμένο επίτοπο βρόχου σύντηξης στην πρωτεΐνη E (Pattnaik et al., 2020).

Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε μια προσέγγιση παθητικής ανοσοποίησης και παρέδωσε ένα mRNA που κωδικοποιεί εξουδετερωτικά μονοκλωνικά αντισώματα ZIKV-117 (mAbs) χρησιμοποιώντας νανοφορέα με βάση το σκουαλένιο (Erasmus et al., 2020).

Δάγκειος πυρετός (Dengue fever)

Ο δάγκειος πυρετός είναι μια τροπική ασθένεια που προκαλείται επίσης από έναν ιό που μεταδίδεται από κουνούπια, τον ιό του δάγκειου πυρετού (Dengue Virus-DENV). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό, πονοκέφαλο, έμετο, μυϊκούς πόνους και πόνους στις αρθρώσεις και το χαρακτηριστικό δερματικό εξάνθημα. Νωρίς στη μόλυνση, τα δερματικά εξανθήματα λευκαίνουν όταν πιέζονται και αργότερα γίνονται ένα μεγάλο κόκκινο εξάνθημα με μικρότερες λευκές περιοχές. Αυτά τα συμπτώματα χρειάζονται γενικά 3-14 ημέρες για να αναπτυχθούν (Martina et al. 2009) Επί του παρόντος, ο δάγκειος πυρετός είναι κοινός σε περισσότερες από 120 χώρες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων στη νότια / νοτιοανατολική Ασία και τη Νότια Αμερική (Gubler et al., 1998). Αφού παρατηρήθηκε αύξηση των λοιμώξεων μετά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, καταβλήθηκε αυξημένη προσπάθεια για την κατανόηση της φύσης του ιού, συμπεριλαμβανομένης της μετάδοσης και της εξέλιξης της νόσου.

Ο ιός είναι μέρος της οικογένειας των φλαβοϊών, μικρών σφαιρικών ιών με λιπιδικό περίβλημα, όπως και ο ιός Zika. Ο ιός προκαλεί έχει την ικανότητα πρόκλησης ισχυρής ανοσοαπόκρισης, καθιστώντας δύσκολο τον εντοπισμό των συγκεκριμένων συστατικών του ιού που το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να αναγνωρίσει και να στοχεύσει. Αυτή η ικανότητα

απόκρυψης από το ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνεται από τον ιό που στοχεύει τα κύτταρα Langerhans, δένδριτικά κύτταρα που παρουσιάζουν παθογόνα στο υπόλοιπο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, ο ιός του δάγκειου πυρετού είναι διαβόητος για την ύπαρξη πολλαπλών στελεχών, με κάθε στέλεχος να δικαιολογεί τη δική του αναπτυγμένη ανοσολογική απόκριση. Και οι δύο αυτοί παράγοντες έχουν καταστήσει τα συμβατικά εμβόλια αναποτελεσματικά.

Τα εμβόλια mRNA για τον ιό του δάγκειου πυρετού, που βρίσκονται στην φάση της μελέτης, έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν μερικούς από τους μη ειδικούς πρωτεϊνικούς επιτόπους για να αυξήσουν την ενεργοποίηση των CD8 T-κυττάρων και την ωρίμανση άλλων ανοσοκυττάρων για να προσδώσουν μνήμη ανοσίας. Συγκεκριμένα ένα αντιγόνο DENV, που ονομάζεται DENV1-NS, έχει σχεδιαστεί. Αυτό το αντιγόνο εμπλουτίζεται με διατηρημένους και εξαιρετικά αντιγονικούς επιτόπους του DENV1 (Roth *et al.*, 2019). Η ομάδα του Roth κατασκεύασε ένα τροποποιημένο εμβόλιο mRNA, με LNP ενθυλάκωση, που κωδικοποιεί το DENV1-NS και δοκίμασε την ανοσογονικότητα και την προστασία σε αυτά τα ανθρώπινα διαγονιδιακά ποντίκια κατηγορίας I HLA, μετά από παροδικό αποκλεισμό του υποδοχέα ιντερφερόνης-I (IFN-I). Σημαντική προστασία παρατηρήθηκε, μετά από δύο ενέσεις του εμβολίου mRNA.

Έρπητας 1 και 2 (HSV 1-2)

Η λοίμωξη HSV-1 των γεννητικών οργάνων αποκτάται από τη μετάβαση του στόματος-γεννητικών οργάνων ή των γεννητικών οργάνων και είναι συχνή, με έως και το 50% των νέων περιπτώσεων έρπητα των γεννητικών οργάνων να προκαλούνται από τον HSV-1 (Ayoub *et al.*, 2019). Ωστόσο, η λοίμωξη επανενεργοποίησης του HSV-1 είναι λιγότερο συχνή από τον HSV-2. Ως εκ τούτου, η συνολική επιβάρυνση της νόσου είναι υψηλότερη για τον HSV-2 (Looker και Garnett 2005).

Κανένα εμβόλιο έρπητα των γεννητικών οργάνων δεν έχει εγκριθεί από τον FDA παρά τα 75 χρόνια προσπάθειας. Μόνο ένας μικρός αριθμός υποψηφίων εμβολίων έχουν φτάσει σε δοκιμές φάσης 3.

Η έλλειψη ανθεκτικής ανοσίας ήταν ο βασικός περιορισμός των προηγούμενων υποψηφίων εμβολίων έρπητα των γεννητικών οργάνων (Belshe *et al.*, 2013). Το εμβόλιο του έρπητα των γεννητικών οργάνων στοχεύει τις επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες. Ένα πλεονέκτημα των εμβολίων mRNA για την έκφραση αντιγόνων γλυκοπρωτεΐνης είναι ότι όταν μεταφράζεται το mRNA, η γλυκοζυλίωση και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι πανομοιότυπες με τις πρωτεΐνες που παράγονται κατά τη διάρκεια φυσικής μόλυνσης.

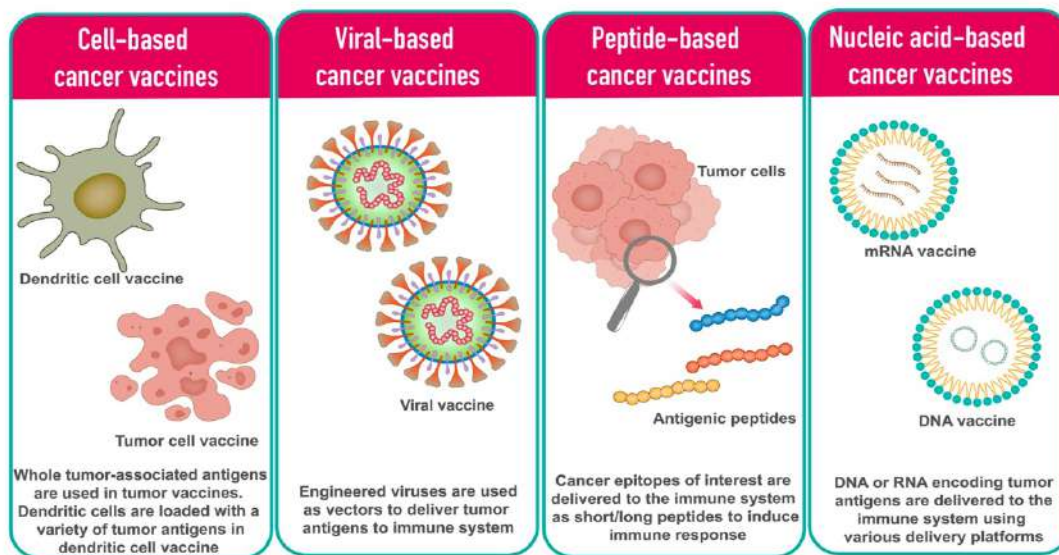
Υποψήφια εμβόλια mRNA-LNP για την πρόληψη του έρπητα των γεννητικών οργάνων HSV-2, προχωρούν σε δοκιμές φάσης 3 που στοχεύουν σε ικές γλυκοπρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την είσοδο (γλυκοπρωτεΐνες B και D - gB2/gD2) (Awasthi Sitia και Friedman, 2021).

3ii) mRNA εμβόλια και Καρκίνος

Μέχρι σήμερα οι συμβατικές κλινικές θεραπείες για όγκους περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και συνδυαστική θεραπεία. Στην ογκολογία, ο στόχος του εμβολιασμού mRNA, ανεξάρτητα από τη μέθοδο χορήγησης ή τις

κωδικοποιημένες αλληλουχίες, είναι να ενισχύσει την ανοσολογική επιτήρηση και να ενισχύσει τη δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Γενικά, οι πλατφόρμες εμβολίων κατά του καρκίνου ταξινομούνται σε εμβόλια με βάση τα κύτταρα, με βάση τα πεπτίδια, με βάση τον ιό και εμβόλια με βάση το νουκλεϊκό οξύ (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Διαφορετικοί τύποι εμβολίων κατά του καρκίνου. (Πηγή : Vishweshwaraiah and Dokholyan 2022)

Οι πρωτεΐνες-στόχοι που κωδικοποιούνται από αλληλουχίες εμβολίων mRNA που ερευνήθηκαν στον τομέα της ογκολογίας ανήκουν σε μία από τις τρεις κύριες κατηγορίες:

1) **Νεοαντιγόνα** ή μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές μορφές που εκφράζονται αποκλειστικά από τον όγκο, λόγω αλλοιώσεων του DNA, εναλλακτικής ωρίμανσης mRNA ή μετα-μεταγραφικών αλλαγών. Χαρακτηρίζονται από υψηλή και ειδική για τον όγκο ανοσογονικότητα και μπορεί να σχετίζονται με τον τύπο του όγκου ή ακόμα και να είναι εξατομικευμένα, ειδικά για τον ασθενή αντιγόνα (Xie *et al.*, 2023)

2) **Αντιγόνα σχετιζόμενα με όγκους** (tumor associated antigens-TAAs) τα οποία μπορεί να βρεθούν σε φυσιολογικό ιστό, η έκφρασή τους αποκλίνει ποσοτικά ή δομικά από τα φυσιολογικά πρότυπα, όπως MAGE-A3 (Melanoma-associated antigen-A3 -MAGE A3), NY-ESO-1 (καρκίνωμα 1 πλακωδών κυττάρων του οισοφάγου της Νέας Υόρκης - New York esophageal squamous cell carcinoma 1), τυροσινάση, TPTE (διαμεμβρανική φωσφατάση με ομολογία τανσίνης- Transmembrane phosphatase with tensin homology) και gp100 (Liu *et al.* 2017). Τα TAAs είναι μια μοναδική ομάδα αυτόλογων κυτταρικών αντιγόνων που οι καρκινικοί οροί περιέχουν αντισώματα που αντιδρούν μαζί τους.

Οι τύποι των κυτταρικών πρωτεϊνών που επάγουν αυτές τις αποκρίσεις αυτοαντισωμάτων είναι αρκετά ποικίλοι και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Soussi *et al.* 2000), ογκογονιδιακά προϊόντα όπως HER-2/neu και ras (Dissis *et al.*, 1997), πρωτεΐνες που προστατεύουν τα mRNAs από την αποικοδόμηση όπως p62 (Zhang *et al.*, 1999) και CRD-BP (Doyle *et al.*, 2000), ογκογονικά αντιγόνα (Keene 1999), αντιγόνα διαφοροποίησης όπως η

τυροσινάση και τα αντιγόνα καρκίνου των όρχεων (Stockerts et al.1998), και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η survivin (Ambrossini 1997) και η LEDGF (Daniels *et al.*, 2005).

Η ετερογένεια και η αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση των TAA σε συμπαγείς καρκίνους και υγιείς ιστούς καθιστά δύσκολη την εξεύρεση κατάλληλων στόχων για εξατομικευμένη θεραπεία, κυρίως με CAR-T κύτταρα (Chimeric Antigen Receptor-T cells).

3) Φλεγμονώδεις μεσολαβητές, είτε χημειοκίνες που απεκκρίνονται εξωκυτταρικά όπως η IL-12 (ιντερλευκίνη-12) και GM-CSF (παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), είτε εκφράζονται σε κυτταρική επιφάνεια όπως TLR4 (υποδοχέας τύπου Toll 4) (Cosentino et al. 2022). Η απομόνωση των παραπάνω πρωτεϊνών και αλληλουχιών mRNA, καθώς και η αναγνώριση των πιο ανοσογόνων νεοαντιγόνων και των αντίστοιχων αλλοιώσεων του DNA, επέτρεψε τη δημιουργία κατάλληλων προτύπων DNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή διαφόρων εμβολίων mRNA, τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορους τύπους κακοηθειών.

Η ανοσοθεραπεία όγκων στοχεύει στην ενεργοποίηση της αντικαρκινικής ανοσίας του ξενιστή, οδηγώντας σε ένα μικροπεριβάλλον καταστολής όγκων και, τελικά, επιτυγχάνοντας συρρίκνωση του όγκου και βελτιώνοντας τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

Τα εμβόλια κατά TAAs ή των ειδικών αντιγόνων όγκου (Tumour Specific Antigen-TSAs) μπορούν ειδικά να επιτεθούν και να καταστρέψουν κακοήγη καρκινικά κύτταρα με έκφραση υψηλού επιπέδου αντιγόνων και να επιτύχουν συνεχή θανάτωση όγκων μέσω της ανοσολογικής μνήμης. Επομένως, σε σύγκριση με άλλους τύπους ανοσοθεραπείας, τα εμβόλια κατά του καρκίνου θα μπορούσαν θεωρητικά να παρέχουν ειδική, ασφαλή και καλά ανεκτή θεραπεία.

Η αποτελεσματική θεραπεία αρκετών κακοηθειών με αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου (checkpoints inhibitors-CPIs) έχει προκαλέσει μια νέα επαναπροσέγγιση σχετικά με την ανοσοθεραπεία όγκων. Οι αναστολείς των ανοσολογικών σημείων ελέγχου είναι μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια των ανοσολογικών ή κακοήθων κυττάρων, απενεργοποιώντας την απενεργοποίηση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων του ξενιστή που μπορεί να προκληθεί από τα καρκινικά κύτταρα. Τέτοιοι παράγοντες (π.χ. pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab) έχουν φέρει θεαματικά αποτελέσματα για τη θεραπεία του καρκίνου από το 2010, ενισχύοντας τις πιθανότητες θεραπείας για διάφορα νεοπλάσματα, προκαλώντας διαρκείς αποκρίσεις και παρατείνοντας σημαντικά την επιβίωση του ασθενούς. Το αποτέλεσμα είναι ότι η ανοσοθεραπεία έγινε η κύρια θεραπεία για ασθενείς με μη χημειοευαίσθητα νεοπλάσματα όπως το μελάνωμα (Bagchi *et al.* 2021).

Παρά τη σημαντική ερευνητική προσπάθεια σχετικά με την ανάπτυξη εμβολίων κατά του καρκίνου, η μετάφραση τους σε αποτελεσματικές κλινικές θεραπείες παρέμεινε δύσκολη για αρκετές δεκαετίες λόγω της ποικιλομορφίας των αντιγόνων όγκου και της σχετικά χαμηλής ανοσολογικής απόκρισης που μπορεί να προκληθεί και από την επιλογή ανεπαρκώς ανοσογόνων αυτοαντιγόνων (Farhood *et al.*, 2019).

Σήμερα, πολλαπλά εμβόλια mRNA που στοχεύουν διαφορετικούς συμπαγείς όγκους όπως ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Sebastian *et al.*, 2014), ο καρκίνος του παχέος εντέρου, το αδenoκαρκίνωμα του παγκρέατος, το μελάνωμα (Sahin *et al.* 2020b), ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (ClinicalTrials.gov identifier NCT02316457), ο καρκίνος των ωοθηκών και ο γαστρεντερικός καρκίνος (Cafri *et al.*, 2020) βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές (Burriss *et al.*, 2019;; Hou *et al.*, 2021;;).

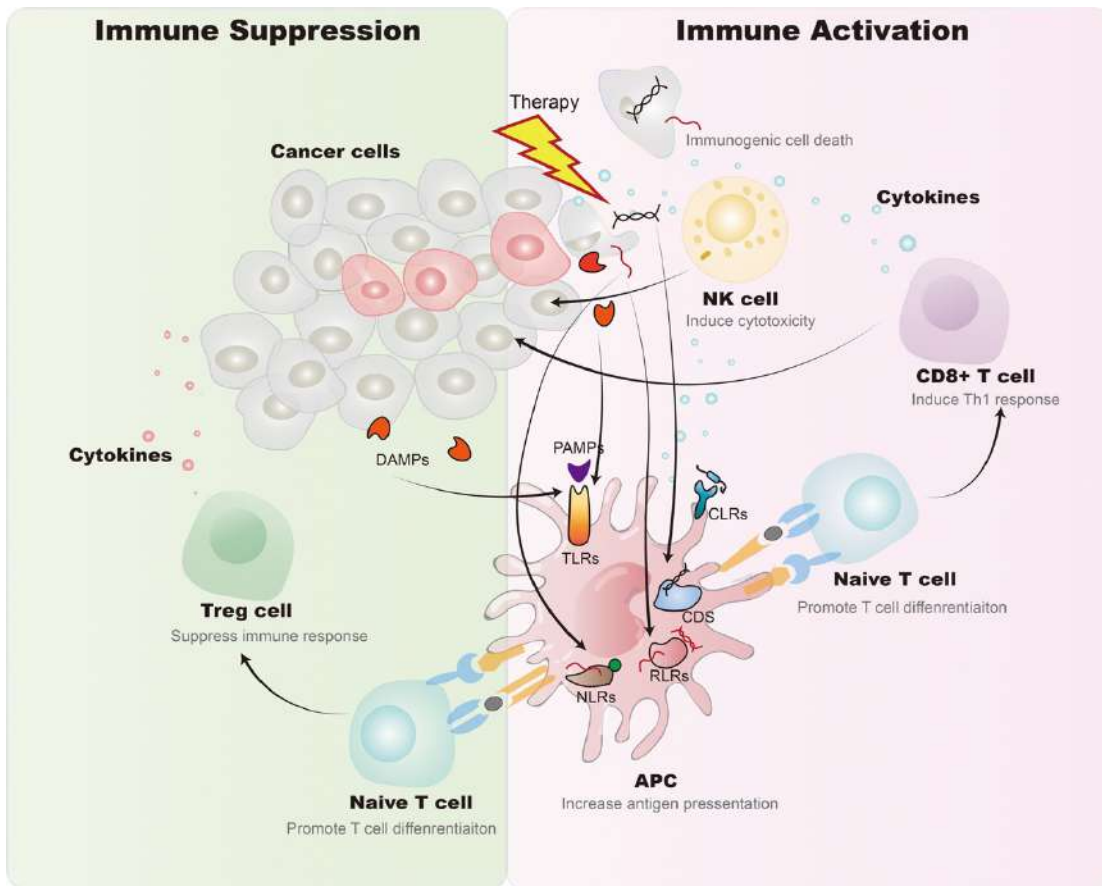
Πολλές νέες αντικαρκινικές θεραπείες έχουν επικεντρωθεί στα νεοαντιγόνα τα οποία είναι ειδικά για τον όγκο και εξαιρετικά ανοσογόνα αντιγόνα που παράγονται από γενετικές μεταλλάξεις σε καρκινικά κύτταρα και έχουν μεγάλη δυνητική αξία για το σχεδιασμό εμβολίων όγκου.

Η ερευνητική ομάδα Sahin *et al*, θεώρησε ότι είναι απαραίτητη η συνολική ανίχνευση και χαρτογράφηση σωματικών μεταλλάξεων σε μεμονωμένους όγκους, και προέβη στη δημιουργία του “mutanome” όπως ονομάστηκε με τη βοήθεια της τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generations Sequencing-NGS), το οποίο κατέστησε δυνατή και πιο προσβάσιμη την εξατομικευμένη θεραπεία εμβολιασμού (Sahin *et al*. 2017).

Γενική αρχή λειτουργίας αντικαρκινικών mRNA εμβολίων:

Συνήθως οι ανοσολογικές αποκρίσεις ενεργοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors -PRRs) που ανιχνεύουν μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns -PAMP) (Heil *et al*. 2004). Κατά την χορήγηση του εμβολίου, τα συστατικά του mRNA και του συστήματος χορήγησης θα ταυτοποιηθούν ως εξωγενείς ουσίες από μια σειρά PRRs που οδηγούν σε ενεργοποίηση υποδοχέων τύπου Toll (TLR), όπως TLR3, TLR7 και TLR8, που εκφράζονται κυρίως σε κύτταρα APC. Όσον αφορά τα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο, οι TLRs μεσολαβούν τόσο στην επιτήρηση όσο και στην ανοσολογική ανοχή στην ανοσία του όγκου. Ως εκ τούτου, η αποσαφήνιση του τρόπου αξιοποίησης της ανοσορυθμιστικής ισορροπίας χρησιμοποιώντας αγωνιστές TLR σε ανοσοθεραπείες καρκίνου είναι απαραίτητη

Το εξωγενές IVT mRNA μπορεί να αναγνωριστεί από διάφορα PRRs στην κυτταρική μεμβράνη, στα ενδοσώματα, καθώς και στο κυτταρόπλασμα και έχει ρόλο στην τόνωση της έμφυτη ανοσολογικής απόκρισης (innate immune response) (Pardi *et al*, 2020). Οι TLRs, οι οποίοι αναγνωρίζονται ως PRRs, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση των PAMP. Τα APC αναγνωρίζουν το mRNA και ενεργοποιούν τους υποδοχείς TLRs, οι οποία ανιχνεύουν τα PAMP και ξεκινούν μια έμφυτη ανοσοαπόκριση (Pardi *et al*, 2015) με προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και συνδιεγερτικά μόρια (Yin *et al*, 2021). Αυτό τελικά βοηθά στην παραγωγή προσαρμοστικών αποκρίσεων B κυττάρων και T κυττάρων (Pardi *et al*, 2015). Παρομοίως, ενεργοποιείται η ανοσολογική απόκριση από την ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία από τα παραγομενα DAMPs (damage-associated molecular patterns) (εικόνα 15).



Εικόνα 15: Γενική αναπαράσταση του τρόπου που η θεραπεία του όγκου επαναπρογραμματίζει το ανοσοποιητικό μικροπεριβάλλον του όγκου μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRRs). Τα PRRs σε κύτταρα APC διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Τυπικά, τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν DAMPs (damage-associated molecular patterns) για να προωθήσουν την διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων (Naive T-cell σε κύτταρα Treg, τα οποία ενισχύουν περαιτέρω το ανασταλτικό μικροπεριβάλλον εκκρίνοντας κυτοκίνες, όπως ο TGF-β. Ωστόσο, όταν η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία προκαλούν ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων, απελευθερώνεται ένας μεγάλος αριθμός PRRs (π.χ. DNA και RNA) καθώς και DAMPs, τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν περαιτέρω τα PRRs και να ενισχύσουν την αντικαρκινική ανοσία (Nucleotide-binding Oligomerization Domain , NOD like receptors-NLRs, Cytosolic DNA sensors-CDS, RIG-I-like receptors- RLRs). (Πηγή: Bai *et al.*2022)

Εφαρμογές LNP σε διαφορετικά είδη καρκίνου,

Το κύριο πλεονέκτημα της στρατηγικής που βασίζεται στα LNP, σε σύγκριση με το naked mRNA, είναι ότι μπορεί να παραδώσει πολλά φάρμακα ειδικά, αλλάζοντας τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους, γεγονός που αυξάνει την πρόσληψη φαρμάκων στους ιστούς του όγκου, βελτιώνει το αντικαρκινικό αποτέλεσμα και μειώνει τη μη ειδική τοξικότητα (Allen 2004 και Hussein 2005).

Το πρώτο αντικαρκινικό εμβόλιο που χρησιμοποιεί τους παραπάνω μηχανισμούς δράσης και πηρέ έγκριση από τον FDA, ήταν το PROVENGE (Sipuleucel-T), όπου τον Απρίλιο του 2010 εγκρίθηκε για τη θεραπεία ασθενών με ασυμπτωματικό ή ελάχιστα συμπτωματικό μεταστατικό καρκίνο του προστάτη ανθεκτικό στην προστατεκτομή (minimally symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer -mCRPC) και ήταν το πρώτο θεραπευτικό εμβόλιο μια αυτόλογη κυτταρική ανοσοθεραπεία.

Το Sipuleucel-T είναι εάν εμβόλιο με LNP φορέα μετάδοσης, όπου σχεδιάστηκε για να διεγείρει μια ανοσολογική απόκριση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη στοχεύοντας τη φωσφατάση του προστατικού οξέος (PAP), ένα αντιγόνο ιστού που εκφράζεται από καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Quintero *et al.*, 2009). Η θεραπευτική προσέγγιση ήταν να δημιουργηθούν ειδικά T κύτταρα ειδικά για το PAP ικανά να αναγνωρίσουν και να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη που εκφράζουν το PAP. Μετά από ριζική προστατεκτομή, η κύρια εναπομείνασα πηγή PAP στο σώμα είναι ο καρκινικός ιστός του προστάτη.

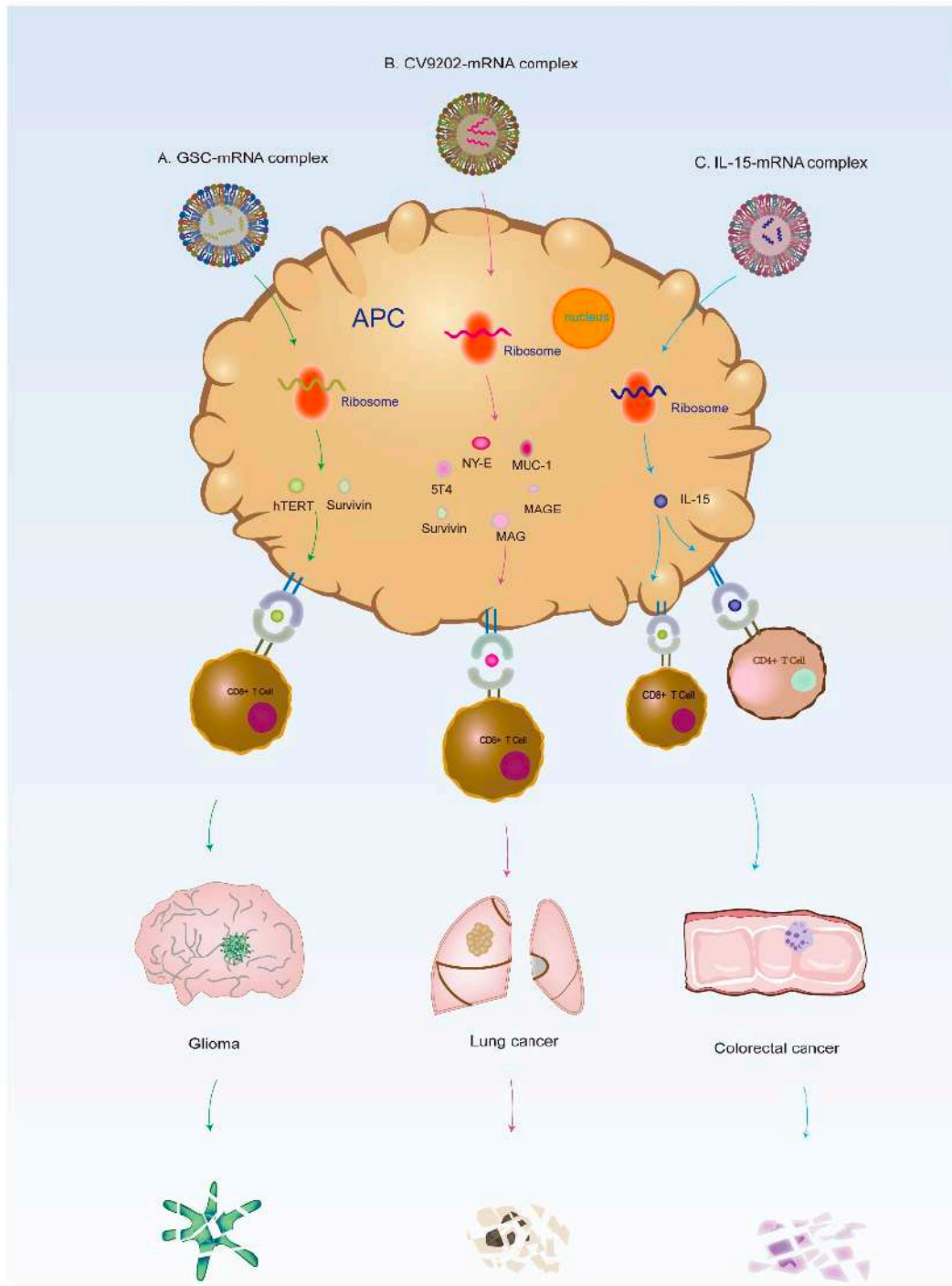
Το ανοσογόνο του εμβολίου PAP, το PA2024, είναι μια πρωτεΐνη σύντηξης που συνδυάζει ανασυνδυασμένο PAP με ανασυνδυασμένο παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-GM-CSF). Η πρωτεΐνη σύντηξης PAP-GM-CSF συνδέεται με αυτόλογα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (*peripheral blood mononuclear cell*-PBMC) που λαμβάνονται με λευκαφαίρεση, δηλαδή την αφαίρεση των λευκών κυττάρων από το αίμα (leukapheresis). Το GM-CSF χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνο (APC) εντός του αυτόλογου προϊόντος PBMC (Markowicz *et al.*, 1990).

Τα ενεργοποιημένα APC είναι ικανά να ενεργοποιούν και να επάγουν την αντιγραφή των ειδικών για PAP ανοσοποιητικών T κυττάρων με την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να σκοτώνουν τα PAP-θετικά καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Τρεις ημέρες μετά τη λευκαφαίρεση και μετά από 40 ώρες επώασης, τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η πρωτεΐνη σύντηξης, αποστέλλονται στο χώρο φροντίδας του ασθενούς και εγχύονται στον ασθενή ως προϊόν Sipuleucel-T. Τα ενεργοποιημένα APC διευκολύνουν τόσο την *ex vivo* παραγωγή των T κυττάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας όσο και την *in vivo* παραγωγή μετά τη χορήγηση.

Μετά την έγχυση της πρώτης δόσης, παρατηρείται ανιχνεύσιμη αύξηση των δεικτών ενεργοποίησης APC και T-κυττάρων στα PBMC των ασθενών που έλαβαν θεραπεία και αύξηση της *ex vivo* παραγωγής κυτοκινών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (Martin *et al.*, 2011).

Τα πολύ καλά αποτελέσματα του Sipuleucel-T οδήγησε το National Comprehensive Cancer Network να εκδώσει οδηγία να συμπεριλαμβάνεται το sipuleucel-T στις επιλογές θεραπείας για άνδρες με mCRPC χωρίς ή με ελάχιστα συμπτώματα (National Comprehensive Cancer Network, 2011)

Αντικαρκινικοί μηχανισμοί εμβολίων mRNA με βάση τα LNP έχουν επίσης αναπτυχθεί στην θεραπεία κατά του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC) και του γλοιώματος. Στην εικόνα 16 συνοψίζονται οι προαναφερθέντες μηχανισμοί.



Εικόνα 16: Μηχανισμοί εμβολίων mRNA κατά των καρκίνου του πνεύμονα, του κολορθηκού (CRC) και του γλιώματος. **(Α)** Βλαστοκύτταρα γλιώματος (GSC): Αυτόλογα δενδρική κύτταρα που μεταγγίζονται με αυτόλογο GSC-mRNA χρησιμοποιούνται για την πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης έναντι της GSC των ασθενών. Το GSC-mRNA μπορεί να μεταφράσει το hTERT (Telomerase reverse transcriptase) και την survivin για να προκαλέσει την ανοσολογική απόκριση. **(Β)** Καρκίνος του πνεύμονα: Το CV9202 είναι μια ανοσοθεραπεία καρκίνου με mRNAs βελτιστοποιημένης αλληλουχίας, που κωδικοποιούν διαφορετικά αντιγόνα καρκίνου σε ελεύθερη και συμπλοκοποιημένη μορφή με το CLpP. Το ClpP (caseinolytic protease proteolytic subunit) είναι ένας ιδιαίτερος στόχος καθώς τόσο η αναστολή όσο και η υπερενεργοποίηση του σκοτώνουν κακοήγη κύτταρα, μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Αυτό διευκολύνει την έκφραση του αντιγόνου και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, προσδίδοντας ουσιαστικά αυτοεπικουρική δράση και στη συνέχεια προκαλώντας μια προσαρμοστική κυτταρική και χυμική ανοσοαπόκριση. **(C)** CRC: Αφού το σύμπλοκο CLpP/mRNA εισέλθει στο σώμα, το CLpP μπορεί να

παραδώσει την IL-15-mRNA σε κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (APCs) και στη συνέχεια τα APC θα μεταφράσουν την πρωτεΐνη IL-15 και θα την απελευθερώσουν, προκαλώντας κυτταρική ανοσοαπόκριση και προωθώντας τον κυτταρικό θάνατο του CRC (Πηγή: Huang *et al.*, 2022).

Καρκίνος του Πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος και η κύρια αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non-small cell lung cancer - NSCLC) είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του πνεύμονα, με περίπου το 40% των ασθενών να έχουν μεταστατική νόσο σταδίου IV όταν διαγνωστούν (Socinski *et al.* 2007).

Το τυπικό σχήμα χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής για τον καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνει φάρμακα με βάση την πλατίνα (όπως καρβοπλατίνη και σισπλατίνη) (Molina *et al.* 2008). Ωστόσο, η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα προκαλεί παρενέργειες που μειώνουν τη μέγιστη ανεκτή δόση, συμπεριλαμβανομένης της εντερικής βλάβης, της αναιμίας, της νεφροτοξικότητας, της καρδιοτοξικότητας και της περιφερικής νευροπάθειας, καθώς και άλλα συμπτώματα όπως ναυτία, ανησυχία και κόπωση (Yau *et al.*, 2007).

Επί του παρόντος, μόνο λίγες προκλινικές μελέτες για εμβόλια mRNA με βάση το LNP είναι διαθέσιμες για τον καρκίνο του πνεύμονα. Σε μια κλινική μελέτη Φάσης Ib, η ομάδα του Parachristofilou (2019) κατέδειξαν ότι το BI1361849, ένα ανοσοθεραπευτικό που περιελάμβανε πέντε αντιγόνα κωδικοποιημένα από το αντιγόνο-specific (CV9202), σε συνδυασμό με τοπική ακτινοθεραπεία με ή χωρίς πεμετρεξίδη, ήταν καλά ανεκτό με λίγες παρενέργειες και μπορούσε να προκαλέσει στοχευμένη ανοσολογική απόκριση σε ασθενείς με NSCLC σταδίου IV. Μετά τον εμβολιασμό, τα λειτουργικά CD4⁺ και/ή CD8⁺ T κύτταρα, στο 40% των ασθενών αυξήθηκαν τουλάχιστον δύο φορές περισσότερο από ό,τι πριν από τη θεραπεία σε σύγκριση με την αρχική τιμή.

Παρομοίως, σε μια κλινική μελέτη φάσης I/IIa, οι Sebastian *et al.* (2019) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανοσοθεραπεία αντιγόνου-specific (CV9201) ήταν καλά ανεκτή και είχε ενισχύσει την ανοσολογική απόκριση σε ασθενείς με NSCLC σταδίου III/IV. Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του mRNA εμβολίου (BI 1361849) σε συνδυασμό με αναστολέα σημείων ελέγχου, αντι-CTLA-4 (tremilimumab) και αντι-PD-L1 (duvalumab) στη θεραπεία του NSCLC, αξιολογήθηκαν σε μια συνεχιζόμενη μελέτη φάσης I/II (NCT03164772) (Khan *et al.* 2021). Αυτές οι μελέτες τόνισαν τη σημασία της ανοσοθεραπείας με βάση το mRNA σε συνδυασμό με αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου στη θεραπεία του NSCLC. Γενικά η συγχρόνηση εμβολίων mRNA και αναστολέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου έχει γίνει μια ενδιαφέρουσα μελλοντική θεραπευτική στρατηγική (Barbier *et al.*, 2022)

Καρκίνος Παχέος Εντέρου

Στις ημέρες μας, οι περισσότεροι ασθενείς σταδίου I ή II CRC (ColoRectal Cancer) αντιμετωπίζονται χειρουργικά, ενώ ο συνδυασμός χειρουργικής επέμβασης με χημειοθεραπεία θεωρείται η τυπική θεραπεία για ασθενείς με CRC σταδίου III, με τη συστηματική χημειοθεραπεία ή συνδυασμό στοχευμένων βιολογικών παραγόντων να προτιμώνται συχνά για ασθενείς με μεταστατικό CRC (Papamichael *et al.*, 2015)

Τα εμβόλια mRNA που βασίζονται στα LNP, παρουσιάζουν μοναδικά πλεονεκτήματα για τη θεραπεία της CRC. Οι Lei et al. (2020) καθιέρωσαν ένα σύστημα χορήγησης νανοφορέων στη βάση συμπλόκων λιποσώματος /πρωταμίνης (cationic liposomes protamine complex -CLPP) για την παροχή mRNA που κωδικοποιεί την IL-15 για τη γονιδιακή θεραπεία καρκίνου του παχέος εντέρου. Η μιτοχονδριακή πυρηνική πεπτιδάση (CLpP) παίζει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της ποιότητας των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών αποδομώντας τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το IVT-IL-15 mRNA θα μπορούσε να εισαχθεί αποτελεσματικά και με ασφάλεια σε κύτταρα της κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου CT26 μέσω του συστήματος χορήγησης CLPP. Η τοπική εφαρμογή του φαρμάκου, όπως και η συστηματική χορήγηση του συμπλέγματος CLpP/mIL-15 έδειξε ότι το σύστημα CLPP θα μπορούσε να παραδώσει το mRNA κωδικοποίησης IL-15 σε κύτταρα C26 με υψηλή αποτελεσματικότητα, ενώ προκάλεσε επιτυχώς διέγερση λεμφοκυττάρων και προκάλεσε αντικαρκινική κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*

Η τοπική ή συστηματική χορήγηση του συμπλόκου CLpP/mIL-15 είχε προφανή ανασταλτική επίδραση σε μια ποικιλία μοντέλων ποντικών C26 CRC, με ποσοστά αναστολής 70%, 55% και 69% στο μοντέλο κοιλιακής μετάστασης CT26, στο μοντέλο υποδόριας μετάστασης και στο μοντέλο πνευμονικής μετάστασης, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι η δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων διεγέρθηκε σε σημαντικό επίπεδο και ο πληθυσμός των CD8⁺ T κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά, ήταν ένα πολύ ενθαρρυντικό αποτέλεσμα. Αυτά τα δεδομένα απέδειξαν ότι το σύμπλεγμα CLpP/mIL-15 είχε υψηλό θεραπευτικό δυναμικό στην ανοσογονιδιακή θεραπεία της CRC, υποδεικνύοντας ότι το CLPP είναι ιδανικό για την παροχή mRNA και το σύμπλεγμα CLpP/mIL-15 είναι πολλά υποσχόμενο για την ανοσολογική γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου (Lei et al., 2020).

Επίσης, ένα άλλο πειραματικό εμβόλιο mRNA μονής αλυσίδας (σύντηξη των υπομονάδων IL-12p40 και IL12p35 που κωδικοποιεί την IL-12), IFN- α , GM-CSF και IL-15-sushi (σύντηξη της IL-15 στον τομέα “sushi” του υποδοχέα IL-15), κατάφερε να ξεπεράσει την αντίσταση στη θεραπεία με αντι-PD-1 σε μοντέλο ποντικού αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου, προκαλώντας συρρίκνωση του όγκου και παρατείνοντας την επιβίωση των ποντικών που έλαβαν θεραπεία (Tucci et al., 2019).

Γλοιοβλάστωμα

Το γλοίωμα είναι ένας από τους πιο κακοήθεις συμπαγείς όγκους, αντιπροσωπεύοντας την πλειοψηφία των πρωτοπαθών κακοήθων όγκων του εγκεφάλου. Σε σύγκριση με άλλους τύπους όγκων, το γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma-GBM) έχει ποσοστό επιβίωσης 5 ετών μόνο 6,8% και η διάμεση συνολική επιβίωση είναι συχνά < 1 έτος (Ostrom et al. 2019).

Οι τυποποιημένες θεραπευτικές προσεγγίσεις για GBM περιλαμβάνουν κυρίως χειρουργική εκτομή, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας, η γονιδιακή θεραπεία και η ανοσοθεραπεία έχουν σταδιακά βελτιωθεί κλινικά σε ασθενείς. Ωστόσο, το γλοιοβλάστωμα μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική δυσλειτουργία και ανοσοκαταστολή, οδηγώντας σε ένα εξαιρετικά ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον όγκου και αντοχή στη θεραπεία (Foks et al., 2016).

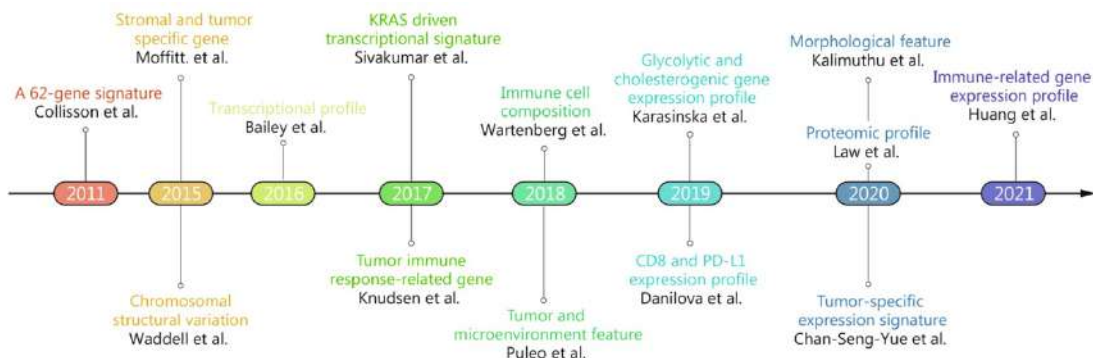
Παρότι η εφαρμογή των mRNA εμβολίων δεν είχε ωριμάσει ακόμα στον πεδίο διόρθωσης ιστών, οι Vik-Mo *et al.* (2013) απομόνωσαν επιτυχώς ιστούς βιοψίας όγκου εγκεφάλου και προετοίμασε ένα μονοκύτταρικο διάλυμα. Συγκεκριμένα, αυτόλογα βλαστοκύτταρα γλοιώματος (glioma stem cells-GSCs) ενισχύθηκαν σε σφαίρες όγκου (tumour spheres) *in vitro* και το GSC-mRNA ενισχύθηκε και μεταγγίστηκε σε αυτόλογα DC προερχόμενα από μονοκύτταρα. Αυτόλογα DCs που μεταγγίστηκαν με αυτόλογα GSC-mRNA χρησιμοποιήθηκαν για να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση στα GSC του ασθενούς. Σε σύγκριση με τα σωματικά νευρικά προγονικά κύτταρα, τα GSCs είχαν αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης και υψηλή έκφραση survinin, ενός αναστολέα της πρωτεϊνικής απόπτωσης.

Καρκίνος Παγκρέατος

Το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (PDAC), ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του παγκρέατος, είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου. Παρά τις σύγχρονες θεραπείες, μόνο περίπου το 12% των ανθρώπων που διαγιγνώσκονται με αυτόν τον καρκίνο θα είναι ζωντανόι πέντε χρόνια μετά τη θεραπεία. Ο καρκίνος του παγκρέατος χαρακτηρίζεται συνήθως από πολύπλοκο ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον, χαμηλό φορτίο μετάλλαξης και κακή διήθηση T κυττάρων (Morrison *et al.*, 2018).

Οι ανοσοθεραπείες, έχουν φέρει επανάσταση στη θεραπεία πολλών τύπων όγκων. Αλλά μέχρι σήμερα, έχουν αποδειχθεί αναποτελεσματικές στο PDAC. Ένας από τους κύριους λόγους είναι η μεγάλη ποικιλομορφία των συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Η ικανότητα παραγωγής νεοαντιγόνων - πρωτεΐνες που μπορούν να στοχεύσουν αποτελεσματικά από το ανοσοποιητικό σύστημα- από τα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος δεν ήταν σαφές (Siegel *et al.*, 2023)

Έχουν εντοπιστεί διάφοροι υπότυποι καρκίνου του παγκρέατος, που ορίζονται με βάση διαφορετικές παραμέτρους, προσεγγίσεις και προοπτικές. Πολλαπλοί ανοσολογικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του προφίλ γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με το ανοσοποιητικό σύστημα και της σύνθεσης των ανοσοκυττάρων, χρησιμοποιούνται για την ομαδοποίηση ανοσολογικών υποτύπων καρκίνου του παγκρέατος. Η εικόνα 17 παρουσιάζει χρονολογικά την σειρά τυποποίησης. Οι ανοσολογικοί υπότυποι υποδεικνύουν την ανοσολογική κατάσταση στους παγκρεατικούς όγκους και το μικροπεριβάλλον τους και έτσι αποτελούν ακριβείς βιοδείκτες για την επιλογή μιας κατάλληλης συνδυασμένης θεραπείας.

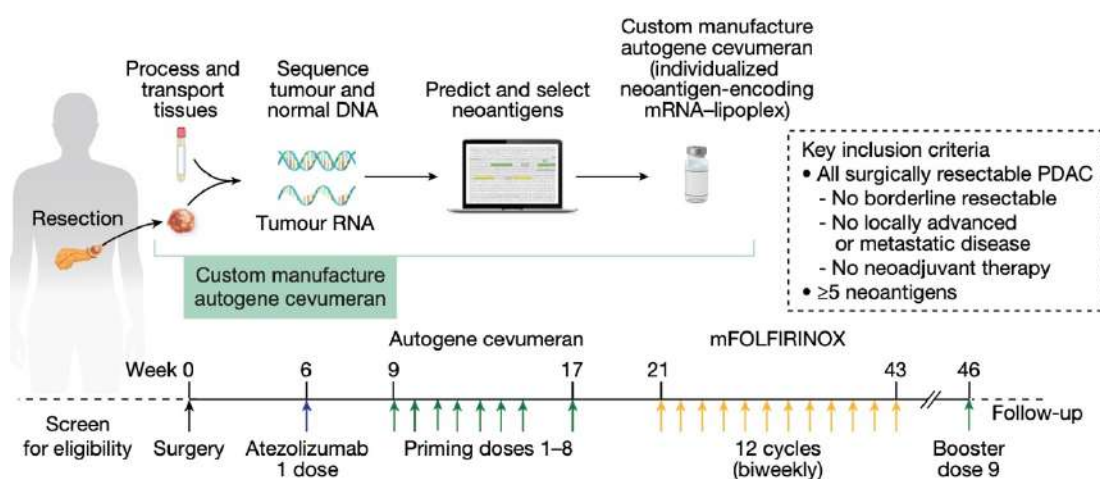


Εικόνα 17: Χρονοδιάγραμμα της τυποποίησης του καρκίνου του παγκρέατος με τις ξεχωριστές προσεγγίσεις ταξινόμησης και τις αντίστοιχες πηγές. **Πηγή:** Huang et al(b). 2022.

Η ομάδα του Huang ανέφερε ότι τα ADAM9, MET, TPX2, EFNB2, WNT7A και TMOD3 ήταν αποτελεσματικά αντιγόνα του εμβολίου mRNA κατά του καρκίνου του παγκρέατος και ότι οι ασθενείς με δύο ανοσοποιητικούς υποτύπους IS4 και IS5 όγκους ήταν κατάλληλοι για εμβολιασμό. Τα αντικαρκινικά εμβόλια CV9103 και CV9104 μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη (Huang *et al.*, (b)2021).

Η ερευνητική ομάδα του Balachandran από το Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) έχει αναπτύξει μια εξατομικευμένη προσέγγιση εμβολίου mRNA για τη θεραπεία του καρκίνου του παγκρέατος. Σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ατομικά τροποποιημένη χημειοθεραπεία (modified fluorouracil leucovorin irinotecan oxaliplatin-mFOLFIRINOX), συμπληρωματικά με το μονοκλωνικό αντίσωμα Atezolizumab (Rohas *et al.*, 2023). Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε το εξατομικευμένο εμβόλιο νεοαντιγόνου (Autogene cevumeran). Είναι ένα εξατομικευμένο αντικαρκινικό εμβόλιο που στοχεύει τα μοναδικά νεοαντιγόνα κάθε ασθενούς (εξατομικευμένη ανοσοθεραπεία ειδικά για το νεοαντιγόνο, individualized neoantigen-specific immunotherapy- iNeST), βασισμένο σε νανοσωματίδια mRNA-lipoplex ουριδίνης, το οποίο εμβόλιο νεοαντιγόνου mRNA δημιουργήθηκε σε πραγματικό χρόνο από χειρουργικά αφαιρεθέντες όγκους PDAC. Το εμβόλιο επήγαγε *de novo* T-κύτταρα ειδικού νεοαντιγόνου σε 8 από τους 16 ασθενείς, με τους μισούς να στοχεύουν περισσότερα από ένα νεοαντιγόνα εμβολίου. Χρησιμοποιώντας μια νέα υπολογιστική μαθηματική στρατηγική για την παρακολούθηση κλώνων T κυττάρων (*CloneTrack*).

Η *CloneTrack* είναι μια νέα μαθηματική και ανοσολογική μέθοδος που χρησιμοποιεί την αλληλούχιση του υποδοχέα T κυττάρων (TCRs) από δείγματα περιφερικού αίματος, πριν και μετά τη θεραπεία για τον εντοπισμό της μεταβολής του πληθυσμού τους. Με την χρήση *CloneTrack*, διαπιστώθηκε ότι τα ενεργοποιημένα με εμβόλιο T κύτταρα αποτελούσαν έως και το 10% όλων των T κυττάρων του αίματος, και αυξήθηκαν εκ νέου με αναμνηστικό εμβόλιο το οποίο περιλάμβανε πολυλειτουργικά (polyfunctional), πολυκλωνικά, ειδικά- νεοαντιγόνα CD8⁺ T κύτταρα (εικόνα 18).



Εικόνα 18: Χρονοδιάγραμμα παραγωγής εξατομικευμένου εμβολίου νεοαντιγόνου mRNA (Πηγή: Rohas *et al.*2023).

Η παραπάνω μελέτη έδειξε ότι τα εμβόλια νεοαντιγόνου mRNA μπορούν να εξατομικευτούν σε 9 εβδομάδες και να ενσωματωθούν πλήρως σε μια τυπική κλινική ροή εργασίας ακόμη και μετά από σύνθετη ογκολογική χειρουργική επέμβαση.

Μελάνωμα

Το μελάνωμα είναι η πιο επιθετική και απειλητική μορφή καρκίνου του δέρματος, διότι μπορεί να προκαλέσει γρήγορα μεταστάσεις και είναι δυνητικά θανατηφόρο. Εάν όμως αναγνωριστεί έγκαιρα και η ασθένεια δεν έχει προχωρήσει, οι πιθανότητες να αποκατασταθεί ακόμη και πλήρως η υγεία του ασθενούς είναι πολύ καλές

Η συχνότητα εμφάνισης κακοήθους μελανώματος αυξάνεται παγκοσμίως, με αποτέλεσμα ένα σημαντικό κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα. Από σπάνιος καρκίνος πριν από έναν αιώνα, ο μέσος κίνδυνος για μελάνωμα κατά τη διάρκεια της ζωής έχει φτάσει τώρα το 1 στους 50 σε πολλούς δυτικούς πληθυσμούς.

Τον Ιούλιο του 2023, η Moderna ανακοίνωσε την έναρξη μιας δοκιμής φάσης 3 του εξατομικευμένου εμβολίου τους κατά του μελανώματος, mRNA-4157 (επίσης γνωστό ως V940), με pembrolizumab (Keytruda), ως συνδυαστική θεραπεία για ασθενείς υψηλού κινδύνου που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση για την επικουρική θεραπεία ασθενών με μελάνωμα υψηλού κινδύνου (Carvalho, 2023).

Το mRNA-4157 / V940 είναι ένα νέο ερευνητικό mRNA με βάση εξατομικευμένο εμβόλιο καρκίνου που αποτελείται από ένα μόνο συνθετικό mRNA που κωδικοποιεί έως και 34 νεοαντιγόνα. Το εμβόλιο λειτουργεί διεγείροντας μια ανοσολογική απόκριση μέσω της δημιουργίας ειδικών αποκρίσεων Τ κυττάρων με βάση τη μοναδική μεταλλαγμένη υπογραφή του όγκου ενός ασθενούς. Ο συνδυασμός mRNA-4157/V940 με pembrolizumab μπορεί δυνητικά να παράγει ένα πρόσθετο όφελος και να ενισχύσει την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με τη μεσολάβηση των Τ κυττάρων.

Άλλοι Τύποι Καρκίνου

Έχουν εμφανιστεί αρκετές μελέτες που χρησιμοποιούν τα LNPs και σε άλλους όγκους, όπως το χολαγγειοκαρκίνωμα. Το 2021 αναπτυχθήκαν τα CD247, FCGR1A και TRRAP, πιθανά αντιγόνα εμβολίων mRNA κατά του χολαγγειοκαρκινώματος, ειδικά για ασθενείς με όγκους ανοσολογικών υποτύπων 2 (IS2), παρέχοντας μια θεωρητική βάση για την ανάπτυξη εμβολίων mRNA κατά του χολαγγειοκαρκινώματος και τον εντοπισμό κατάλληλων στόχων εμβολιασμού (Huang et al. (a)2021), ενώ εμβόλια mRNA με σύνθεση πρωταμίνης έχουν αξιολογηθεί σε διάφορες κλινικές δοκιμές με τη μορφή εμβολίων RNActive (Papachristofoulou et al., 2019, και Sahin et al., 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Συζήτηση και Συμπεράσματα

4 i) Χρήση της τεχνογνωσίας των mRNA εμβολίων σε γονιδιακές παθήσεις και χρόνιες δόσεις

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, των τελευταίων ετών από τα εμβόλια mRNA, έχουν καταφέρει να αφυπνίσουν πολλές ερευνητικές ομάδες και να δηλώσουν σθεναρά την παρουσία τους ως θεραπευτικές προσεγγίσεις, όχι μόνο στις μολυσματικές νόσους, αλλά και σε γονιδιακές παθήσεις. Η πρώτη ένδειξη για τη δυνατότητα στοχευμένης επεξεργασίας γονιδίων για τη θεραπεία μιας γενετικής διαταραχής στους ανθρώπους προήλθε από τη μελέτη της ομάδας του Gillmore (Gillmore et al. 2021). Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη διερεύνηση της πιθανής επέκτασης των θεραπειών CRISPR mRNA στο τεράστιο πεδίο των γενετικών ηπατικών διαταραχών. Η αναμενόμενη βελτίωση σε τομείς όπως στα συστήματα χορήγησης και ιστοειδικότητας μπορεί να επιτρέψει εφαρμογές σε άλλα συμπαγή όργανα, όπως η καρδιά, τα νεφρά και το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η ικανότητα επεξεργασίας ενός ζεύγους βάσης μπορεί να είναι ιδανικά κατάλληλη για τη θεραπεία σπάνιων γενετικών ασθενειών.

Αυτό που αποτελεί κρίσιμη προϋπόθεση για τη εφαρμογή της αρχής των mRNA εμβολίων των μολυσματικών νόσων σε μοντέλα γονιδιακών παθήσεων είναι η ικανότητα επαναλαμβανόμενης χορήγησης mRNA ειδικά και αποτελεσματικά, διατηρώντας παράλληλα υψηλές αποδόσεις πρωτεϊνών. Αυτό υπογραμμίζεται έντονα από τις θεραπείες ενζυμικής υποκατάστασης, οι οποίες βασίζονται σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η αιμορροφιλία Α και Β, διαταραχές του αίματος που προκαλούνται από την έλλειψη πρωτεϊνών πήξης, αντιμετωπίζονται συνήθως με συστηματική ένεση ανασυνδυασμένων μορφών είτε του παράγοντα VIII ή παράγοντα IX, αντίστοιχα, 3-7 φορές την εβδομάδα (Cafuir *et al.*, 2017). Η θεραπεία απαιτεί συχνές χορηγήσεις λόγω του σχετικά μικρού χρόνου ημίσειας ζωής των πρωτεϊνών ~12 ωρών.

Σε μια εναλλακτική προσέγγιση, τα κλινικά αποτελέσματα από γονιδιακή θεραπεία με βάση το DNA για αιμορροφιλία χρησιμοποιώντας φορείς AAV έδειξαν αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης τα πρώτα 2 χρόνια, μετά τα οποία σταθεροποιήθηκαν. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η αναπλήρωση θα ήταν απαραίτητη μετά από 5-7 χρόνια λόγω της ανοσολογικής απόρριψης των ιικών φορέων. Σε σύγκριση με τα πρωτεϊνικά φάρμακα, η πραγματική προστιθέμενη αξία των θεραπευτικών mRNA είναι η ικανότητα σύνθεσης υψηλών επιπέδων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών η οποία θα μπορέσει να επιτρέψει την άμεση στόχευση μεταβολικών νοσημάτων όπως το σύνδρομο Crigler-Najjar (Moderna Announcement, 2021), μεθυλομαλονική οξυαιμία (methylmalonic acidemia) (An *et al.* 2017), προπιονική οξυαιμία (pro-pionic acidemia) (Jiang, *et al.* 2020) και Κυστική Ίνωση (Robinson *et al.*, 2018) τα οποία είναι τεχνικά δύσκολο να αντιμετωπιστούν με πρωτεΐνες .

Το κύριο μέλημα με τη χρόνια δοσολογία είναι πώς να διατηρηθεί η ισχυρή παραγωγή πρωτεϊνών με κάθε δόση που χορηγείται για πολλά χρόνια. Οι περισσότερες χρόνιες πρωτεϊνικές θεραπείες χάνουν την αποτελεσματικότητά τους με την προοδευτική αύξηση των αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ή του φορέα χορήγησης. Σε μελέτες χορήγησης σε ποντίκια mRNA συσκευασμένων σε PEGylated LNP, παρατηρήθηκε ελάχιστη έως καθόλου μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης μετά από 3-6 μήνες χρόνιας θεραπείας (An *et al.*, 2019).

Κυστική Ίνωση

Η κυστική ίνωση (CF) είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του ρυθμιστή διαμεμβρανικής της κυστικής ίνωσης (CF transmembrane conductance regulator-CFTR). Το CFTR γονίδιο κωδικοποιεί ένα κανάλι χλωρίου ρυθμιζόμενο από τον μηχανισμό ενεργοποίησης του κυκλικού AMP (cyclic AMP-cAMP), που βρίσκεται στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων που καταλύουν τη διέλευση μικρών ιόντων μέσω της μεμβράνης. Η δυσλειτουργία αυτού του μηχανισμού προκαλεί βλάβη της ομοιόστασης των αλάτων και των υγρών που οδηγεί σε πολυοργανικές δυσλειτουργίες και τελικά θνησιμότητα από αναπνευστική ανεπάρκεια.

Για περισσότερες από επτά δεκαετίες, οι θεραπείες για την κυστική ίνωση περιορίζονταν στη θεραπεία των συμπτωμάτων και όχι στην αντιμετώπιση της προέλευσης της νόσου, δηλαδή του τροποποιημένου γονιδίου CFTR. Περισσότερες από 20 κλινικές δοκιμές επιχειρήθηκαν χωρίς την επίτευξη αποτελεσματικής θεραπείας. Μόνο περιορισμένα κλινικά οφέλη παρατηρήθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της σταθεροποίησης της πνευμονικής λειτουργίας σε ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον εννέα δόσεις CFTR cDNA που παραδόθηκαν από κατιονικά λιποσώματα σε περίοδο 12 μηνών (Alton *et al.*, 2015).

Η χαμηλή έκφραση CFTR mRNA λόγω διάσπασης mRNA (μη νοηματική μεσολαβούμενη αποσύνθεση, nonsense mediated decay- NMD) είναι ένα σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη μιας θεραπείας για κυστική ίνωση που προκαλείται από τη μετάλλαξη W1282X στο γονίδιο CFTR. Γενικά, η διαδικασία NMD αποτρέπει τη συσσώρευση δυνητικά επιβλαβών κολοβωμένων πρωτεϊνών που μεταφράζονται από κωδικόνιο πρόωρου τερματισμού (premature termination codon -PTC) που περιέχει mRNA. Ωστόσο, όταν η NMD μειώνει την έκφραση μιας μεταλλαγμένης πρωτεΐνης CFTR που έχει μερική δραστηριότητα, επιδεινώνει τον φαινότυπο, έτσι οι ασθενείς ομόζυγοι για τη μετάλλαξη CFTR- W1282X ή διπλή ετεροζυγωτία στο CFTR- W1282X με άλλη μετάλλαξη που προκαλεί CF, έχουν φτωχά κλινικά συμπεράσματα.

Η έγκριση διορθωτών CFTR που ενισχύουν τη μετα-μεταφραστική διαδικασία CFTR και ενισχυτές που βελτιώνουν το άνοιγμα του καναλιού CFTR, έφερε όφελος στην πλειοψηφία των ασθενών με CFTR (Keating *et al.*, 2018). Ωστόσο, αυτές οι θεραπευτικές επιλογές δεν είναι αποτελεσματικές έναντι της κυστικής ίνωσης που προκαλείται από το CFTR-W1282X, λόγω της χαμηλής έκφρασης του CFTR-W1282X mRNA.

Ο τερματισμός της μετάφρασης επιλεκτικά στα PTC είναι μια πιθανή στρατηγική θεραπείας. Μια προσέγγιση για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης που προκαλείται από αυτή τη μετάλλαξη, περιλαμβάνει ενώσεις ανάγνωσης (readthrough compounds-RTC) που αυξάνουν το επίπεδο της πρωτεΐνης πλήρους μήκους μειώνοντας την επίδραση του ριβοσώματος στο ανώριμο PTC (εικόνα 19) (Lentini *et al.*, 2014).

Το *Gentamicin* είναι ένας τύπος RTC που μπορεί να αυξήσει την πρωτεΐνη CFTR πλήρους μήκους *in vitro*, αλλά η κλινική αποτελεσματικότητά του για διάφορες μη νοηματικές (nonsense) μεταλλάξεις της Κυστικής Ίνωσης περιορίζεται από τη NMD (Linde *et al.* 2007). Επίσης, το *Ataluren* είναι ένας μη αμινογλυκοσιδικός RTC με πολύ καλό προφίλ ασφάλειας, αλλά δεν βελτίωσε τον εξαναγκασμένο εκπνεόμενο όγκο (forced expiratory volume-FEV) σε ασθενείς με κυστική ίνωση με διάφορες nonsense μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένου του W1282X, σε κλινικές δοκιμές (Zainal *et al.*, 2017).

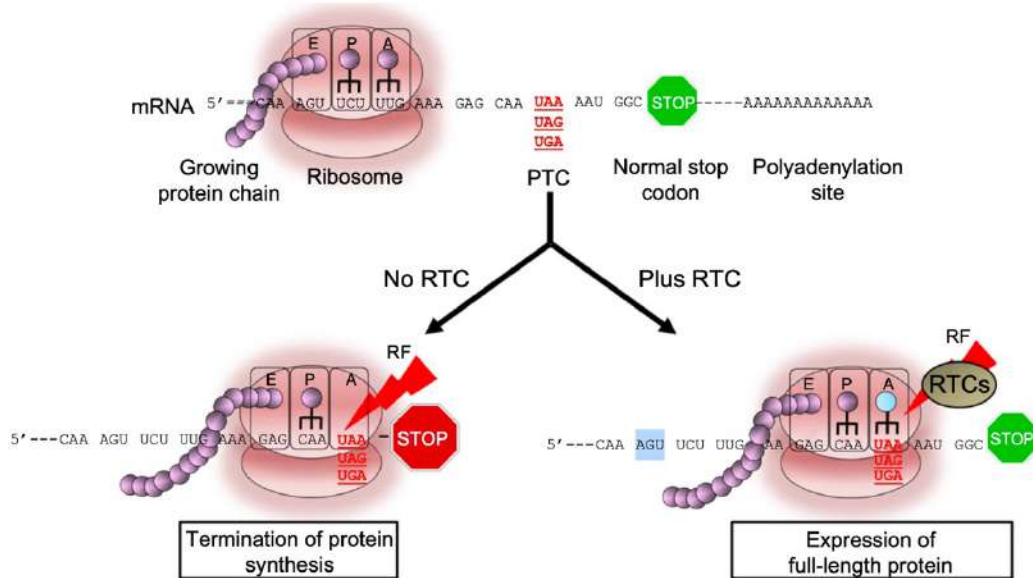
Η αποτελεσματικότητα των RTC μπορεί να αυξηθεί *in vivo* με την απενεργοποίηση σημαντικών συστατικών της οδού NMD (Keeling et al. 2013). Τα τροποποιημένα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASOs) μπορούν σταθερά να υβριδοποιηθούν σε συμπληρωματικά RNA χωρίς να προκαλέσουν την αποικοδόμηση τους από την RNase-H (Khnorowa and Watts, 2017). Τέτοια ASOs είναι αποτελεσματικά εργαλεία για μπλοκάρισμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός RNA και των πρωτεϊνών δέσμευσής του και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αλλάξουν την επεξεργασία ή τη μετάφραση mRNA *in vitro* και *in vivo* (Kole et al., 2012). Χρησιμοποιώντας αυτή τους την ιδιότητα χρησιμοποιείται ένα ASO σχεδιασμένο για να προκαλέσει την παράλειψη του εξονίου 23 που περιέχει PTC, προάγει την έκφραση μιας μερικώς ενεργού παραλλαγής CFTR που στερείται των αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το παραλειπόμενο εξόνιο, καταφέρνοντας έτσι να υπερσκελίσει τον μηχανισμό NMD στην CF- W1282X (Oren et al., 2021).

Μυϊκή δυστροφία Duchene

Η αταλουρένη (*Ataluren*) έχει επίσης εμφανίσει επιτυχή θεραπευτική δράση στη μυϊκή δυστροφία Duchenne που προκαλείται από μη νοσηματικές μεταλλάξεις. Η μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) είναι μια σοβαρή φυλοσύνδετη υπολειπόμενη ασθένεια. Εκδηλώνεται στην πρώιμη παιδική ηλικία με μυϊκή αδυναμία, εμφάνιση του κίνησης (σημάδι) Gowers (συγκεκριμένη κίνηση που χρησιμοποιεί το παιδί για να σηκωθεί), αδεξιότητα και δυσκολία να ανέβει σκάλες. Η νόσος είναι προοδευτική, μέχρι την απώλεια της περιπατητικής ικανότητας στην πρώιμη εφηβεία και άλλες απειλητικές για τη ζωή επιπλοκές όπως η καρδιακή και αναπνευστική ανεπάρκεια.

Η αναπνευστική λειτουργία σε ασθενείς με DMD, συνήθως επηρεάζεται με την αύξηση της ηλικίας και της ανάπτυξης μέχρι λίγο πριν ο ασθενής χάσει την αναπνευστική κίνηση. Μετά την επίτευξη μιας κορυφής, οι τιμές αναγκαστικής ζωτικής χωρητικότητας (forced vital capacity-FVC) αρχίζουν να μειώνονται με την πάροδο του χρόνου λόγω της μείωσης της μυϊκής μάζας των πνευμόνων (Birnkranz et al., 2018).

Αποκαθιστώντας την παραγωγή δυστροφίνης, η θεραπεία με αταλουρένη βοηθά στη διατήρηση της μυϊκής μάζας και στην παράταση της λειτουργίας σε ασθενείς με DMD (PTC Therapeutics, 2018). Η εικόνα 19 περιγράφει τον τρόπο δράσης των RTC.



Εικόνα 19: Δραστικότητα ανάγνωσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα με τη χρήση RTCs. (Πηγή: Namgoong and Bertoni, 2016)

Αγγειογένεση και Καρδιακή Ανεπάρκεια

Η θεραπευτική αγγειογένεση με VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας-vascular endothelial growth factor) έχει μελετηθεί εδώ και δεκαετίες πειραματικά και κλινικά. Ως πρωτεϊνική θεραπεία, η χρησιμότητα του VEGF έχει περιοριστεί από τον σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης (<30 λεπτά). Ως γονιδιακή θεραπεία, η μακροχρόνια έκφραση του VEGF τείνει να προκαλεί τοξικότητα από την υπερβολική διαπερατότητα των αγγείων (Gaffney *et al.*, 2007).

Όπως πολλοί παρακρινείς παράγοντες, ο VEGF δεν δρα συστηματικά, αλλά εκκρίνεται με παλμικό τρόπο τοπικά για να φτάσει στα κύτταρα-στόχους με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ακολουθούμενο από ταχεία αποικοδόμηση. Μια δεκαετής μελέτη έδειξε ισχυρή, παροδική έκφραση του VEGF για αρκετές ημέρες χρησιμοποιώντας χημικά τροποποιημένο mRNA σε μοντέλα ποντικών, μεγάλα ζώα και μια πρώτη κλινική μελέτη στον άνθρωπο (Carlsson *et al.*, 2018).

Η παροδική φύση της έκφρασης του mRNA περιορίζει φυσικά την τοξικότητα της χρόνιας έκφρασης του VEGF. Μια δοκιμή φάσης 2α ολοκληρώθηκε πρόσφατα σε καρδιακούς ασθενείς που υποβάλλονται σε εγχείρηση ανοικτής καρδιάς, με άμεσες ενδοκαρδιακές ενέσεις VEGF mRNA σε περιοχές με υποδιάχυση, γεγονός που αποδεικνύει σαφώς την ασφάλεια της διαδικασίας (Collén *et al.*, 2022). Η μελέτη υπογραμμίζει τη δυνητική αξία μιας νέας κατηγορίας φαρμάκων mRNA παρακρινικού παράγοντα για την επισκευή οργάνων γενικά, μερικές από αυτές περιγράφονται στον Πίνακά 3.

Organ of interest	Type of therapy	Disease	mRNA cargo	Delivery frequency
Liver	ERT (endocrine)	Hemophilia A ^a	Factor VIII	Chronic injection
		Hemophilia B ^a	Factor IX	
		Crigler-Najjar syndrome ^a	UGT1A1	
	ERT (intracrine)	Methylmalonic acidemia ^{a,b}	MMUT	Chronic injection
		Propionic acidemia ^{a,b}	PCCA/PCCB	
		OTC deficiency ^b	OTC	
Glycogen storage disease type 1A ^b		Glucose-6 phosphatase		
Gene editing (intracrine)	Transthyretin amyloidosis ^{a,b}	Cas9/TTR	Single injection	
	Hereditary angioedema ^b	Cas9/KLKB1		
Lungs	ERT (intracrine)	Cystic fibrosis ^{a,b}	CFTR	Chronic injection
Heart	Regenerative (paracrine)	Heart failure ^{a,b}	VEGF-A	Single injection
	Antibody (intracrine)	Heart failure ^a	Anti-PLN intrabody	Single injection
Cancer	Immuno-oncology (intra- or endocrine)	Solid tumors ^b	IL-23, IL-36, OX40L IFN-2b, GM-CSF, IL-15 IL-7, CLDN6, IL-12, IL-2	Single injection
	Antibody (endocrine)	Breast cancer ^b	Anti-HER2, CD40L, CD70, caTLR4	Chronic injection
		Solid tumors ^b	Anti-CLDN18.2	
Autoimmunity	Immune tolerization (endocrine)	Autoimmune disorders ^b	HSA-IL2m	Single injection
		Autoimmune encephalomyelitis ^a	MOG ₃₅₋₅₅	Chronic injection
Multiple tissues	ERT (intra- or endocrine)	Fabry disease ^a	α -Gal A	Chronic injection
	Gene editing (intracrine)	Hereditary angioedema ^b	Cas9/KLKB1	Single injection

Πίνακας 3: Περίληψη διαφορετικών κατηγοριών πιθανών θεραπειών mRNA. ERT=enzyme replacement therapy; UGT1A1=UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1; MMUT=methylmalonyl-CoA mutase; PCCA=propionyl-CoA carboxylase- α ; PCCB=propionyl-CoA carboxylase- β ; OTC=ornithine transcarbamylase; TTR=transthyretin; KLKB1=kallikrein B1; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; VEGF, vascular endothelial growth factor; PLN=phospholamban; IL, interleukin; OX40L= tumor necrosis factor superfamily member 4 (TNFSF4); IFN, interferon; GM-CSF=granulocyte-macrophage colony stimulating factor; CLDN=claudin; HER2=ERB-B2 receptor tyrosine kinase 2; caTLR4=constitutively active Toll-like receptor 4; HSA, human serum albumin; IL2m, interleukin-2-mutein fusion protein; MOG33-55=myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide; α -Gal A, α -galactosidase-A.

4ii) Περιορισμοί των mRNA εμβολίων

Ένα μεγάλο εμπόδιο για την επίτευξη της ανοσολογικής θεραπείας είναι η ανοσολογική διαφυγή η οποία μπορεί να εξακολουθεί να συμβαίνει και μετά την χορήγηση της θεραπείας. Όπως φαίνεται από δεδομένα κλινικών δοκιμών του mRNA-4157 / V940, το 50% και το 64% των ασθενών με μελάνωμα, ακόμη και υπό τον ισχυρό συνδυασμό ipilimumab και nivolumab, θα εμφανίσουν εξέλιξη της νόσου σε 1 και 5 χρόνια μετά την έναρξη της θεραπείας, αντίστοιχα (Larkin *et al.*, 2019)

Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των θεραπειών του καρκίνου του παγκρέατος και μελανώματος εξετάζεται η συνδυαστική χρήση και άλλων συνδυαστικών θεραπειών όπως μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στον παρακάτω Πίνακα 4, συνοψίζονται ανάλογες συνδυαστικές κλινικές μελέτες mRNA εμβολίων.

Trial phase	Target antigen	Cancer type	Combination	Vaccine route of administration	Sponsor	
Lipid nanoparticle formulation						
NCT03948763	1	mRNA-5671 (KRAS gene driver mutations)	Non-small-cell lung, pancreatic, and colorectal neoplasms	With pembrolizumab	Intramuscular	Merck Sharp & Dohme
NCT03313778	1	mRNA-4157 (personalised cancer vaccine encoding several neoantigens)	Solid tumours (resected)	With pembrolizumab	Intramuscular	Moderna
NCT03897881	2	mRNA-4157 (personalised cancer vaccine encoding 20 different mutated neopeptides)	Melanoma	With pembrolizumab	Intramuscular	Moderna
NCT04573140	1	Formulation with pp65 LAMP and tumour mRNA	Glioblastoma	None	Intravenous	University of Florida (Gainesville, FL, USA)
Lipoplex formulation						
NCT02410733	1	BNT111 (NY-ESO-1 [CTAG1A], tyrosinase, MAGE-A3, and TPTE)	Melanoma	None	Intravenous	BioNTech
NCT04526899	2	BNT111 (NY-ESO-1, tyrosinase, MAGE-A3, and TPTE)	Melanoma	With cemiplimab	Intravenous	BioNTech
NCT04382898	1/2	BNT112 (PAP, PSA, and three undisclosed antigens)	Prostate	With cemiplimab	Intravenous	BioNTech
NCT04534205	2	BNT113 (HPV16 E6 and E7 oncoproteins)	Head and neck squamous cell carcinoma	With pembrolizumab	Intravenous	BioNTech
NCT03418480	1/2	BNT113 (HPV16 E6 and E7 oncoproteins)	HPV16-positive solid tumours	With anti-CD40 antibodies	Intravenous	University of Southampton (Southampton, UK)
NCT05142189	1	BNT116 (non-small-cell lung cancer tumour-associated antigens)	Non-small-cell lung cancer	With cemiplimab plus docetaxel	Intravenous	BioNTech
NCT04486378	2	BNT122 (personalised cancer vaccine encoding individual tumour mutations)	Colorectal	None	Intravenous	BioNTech
NCT02316457	1	BNT-114 plus BNT-122 (personalised set of pre-manufactured non-mutated shared tumour-associated antigens plus a personalised cancer vaccine encoding individual tumour mutations)	Triple-negative breast cancer	None	Intravenous	BioNTech
NCT04163094	1	BNT115 (ovarian cancer tumour-associated antigens)	Ovarian	With carboplatin plus paclitaxel	Intravenous	University Medical Center Groningen (Groningen, Netherlands)
NCT04161755	1	BNT122 (personalised cancer vaccine encoding individual tumour mutations)	Pancreatic	With oxaliplatin, irinotecan, fluorouracil, leucovorin, and atezolizumab	Intravenous	Memorial Sloan Kettering Cancer Center (New York, NY, USA)
NCT03815058	2	BNT122 (personalised cancer vaccine encoding individual tumour mutations)	Advanced melanoma	With pembrolizumab	Intravenous	Genentech
NCT03289962	1	BNT122 (personalised cancer vaccine encoding individual tumour mutations)	Solid tumours	With atezolizumab	Intravenous	Genentech
NCT04503278	1/2	CARVac (CLDN6)	Solid tumours	With chimeric antigen receptor therapy	Intravenous	BioNTech and Gene Therapies

Trials with recruitment status "not yet recruiting," "recruiting," and "active, not recruiting" were found on ClinicalTrials.gov with the search terms "cancer" and "RNA, vaccine" on Feb 7, 2022, and through a PubMed search (see Search strategy and selection criteria panel). HPV=human papillomavirus.

Πίνακας 4 : Τρέχουσες κλινικές μελέτες mRNA εμβολίων συνδυαστικά με διάφορα σχήματα όπως μονοκλωνικά αντισώματα για την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκίνου (Πηγή : Lorentzen *et al.* 2022).

Αν και τα εμβόλια mRNA με χρήση φορέα LNP έχουν βελτιωθεί σε μεγάλο βαθμό σε εντυπωσιακά σύντομο χρονικό διάστημα, η τεχνολογία τους δεν έχει τελειοποιηθεί ακόμα. Η πιθανότητα παρενεργειών λόγω της ακαθαρσίας των λιπιδικών νανοσωματιδίων μπορεί τελικά να τις καταστήσουν εντελώς αναποτελεσματικές. Για παράδειγμα, ένα πρόβλημα που παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή του εμβολίου για την COVID-19 ήταν ένας μικρός αριθμός αλλεργικών αντιδράσεων στην πολυαιθυλενογλυκόλη (Polyethylene glycol-PEG) που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση των λιπιδικών νανοσωματιδίων του εμβολίου Pfizer-BioNTech (Sellaturay *et al.* 2021).

Η αντικατάσταση του PEG με άλλα βιοσυμβατά σταθεροποιητικά πολυμερή, όπως η πολύ-N-βινυλοπυρρολιδόνη (Polyvinylpyrrolidone-PVP) και το πολύ-N-2-υδροξυπροπυλο μεθακρυλαμίδιο (poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide PHPMA) θα μπορούσε να μειώσει αυτές τις ανεπιθύμητες ενέργειες, αν και απαιτούνται πολύ περισσότερες προκλινικές και κλινικές δοκιμές για να επιβεβαιωθούν τα ανοσογόνα προφίλ αυτών των πολυμερών (Hoang *et al.* 2020)

Η χρήση υδρογελών (hydrogels), όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, μπορεί να εφαρμοστεί ως νέα εναλλακτική, κάνοντας χρήση της ιδιότητας της μηχανικής τους που επιτρέπει

τη στοχευμένη παροχή mRNA σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς. Επιπλέον, οι υδρογέλες μπορούν να επιτύχουν σταδιακή ή παρατεταμένη απελευθέρωση, επιτρέποντας ενδεχομένως την ανοσοποίηση μετά από μια μοναδική χορήγηση, η οποία θα μπορούσε να δώσει λύση στις περιπτώσεις, όπου μέχρι πρότινος, η θεραπεία απαιτούσε πολλαπλές χορηγήσεις του εκάστοτε εμβολίου (Zhong *et al.* 2023).

Μια άλλη πιθανή στρατηγική για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων mRNA θα ήταν να αυξηθεί η στόχευση των δενδριτικών κυττάρων μέσω επιφανειακής σύζευξης συγκεκριμένων συνδέσεων. Η χρήση των υποδοχέων μαννόζης ή λιπιδίων που προκαλούν υδρόφοβη αλληλεπίδραση στην επιφάνεια των νανοφορέων λιπιδίων θα τους επέτρεπε να στοχεύουν αποτελεσματικότερα τα κύτταρα τελεστές και να δημιουργούν ανοσία (Phua, 2015).

Οι υποδοχείς μαννόζης είναι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς μακροφάγων και έχει αποδειχθεί ότι οι υποδοχείς μαννόζης των DCs όχι μόνο χρησιμεύουν ως υποδοχείς πρόσληψης, αλλά επίσης μεσολαβούν στη διασταυρούμενη παρουσίαση διαλυτών από τέτοια αντίγονα και δείχνουν ότι είναι λιγότερο αποκωδομητικά και ιδιαίτερα δεσμευτικά για την μεταφορά mRNA νανοσωματίδιων (Ghaemmaghani *et al.*, 2008).

4 iii) Ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων χορήγησης

Μια πολλά υποσχόμενη μελλοντική κατεύθυνση για τα εμβόλια mRNA θα μπορούσε να είναι οι εφαρμογές χορήγησης από το στόμα. Πολλές ασθένειες σε περιοχές κακής υγιεινής στις αναπτυσσόμενες χώρες προκαλούνται από εντεροτοξίνες ή εντεροπαθογόνα όπως το *Vibrio cholera*, το *Escherichia coli*, η *Salmonella* και το *Shigella*.

Αυτά τα παθογόνα προκαλούν μόλυνση κατά τη διέλευση των φραγμών του βλεννογόνου και η πρόκληση του σχηματισμού ενός ανοσολογικά ισχυρού φραγμού του βλεννογόνου θα αποτρέψει τη μόλυνση. Τα τρέχοντα εμβόλια κάνουν χρήση υποδόριας ή ενδομυϊκής ένεσης η οποία προκαλεί ισχυρή χυμική και κυτταρική ανοσία, αλλά δεν δημιουργεί παρόμοια ανοσία στις επιφάνειες του βλεννογόνου.

Ωστόσο, τα εμβόλια που χορηγούνται από το στόμα αναγκαστικά διέρχονται από το πεπτικό σύστημα και μπορούν να προσδώσουν ανοσία σε αυτές τις επιφάνειες, επιτρέποντας την προφυλακτική θεραπεία έναντι αυτών των συγκεκριμένων τοξινών. Η από του στόματος χορήγηση έχει αποδειχθεί με επιτυχία και έχει χρησιμοποιηθεί για εμβόλια με ζώντα εξασθενημένα εμβόλια κατά του ανθρώπινου ροταϊού και η από του στόματος χορήγηση εμβολίων mRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει παρόμοιους μηχανισμούς (Vesicari 2012).

4 iv) Μελλοντικές θεραπείες λοιμώξεων: Ιός της Ηπατίτιδας -C (HCV)

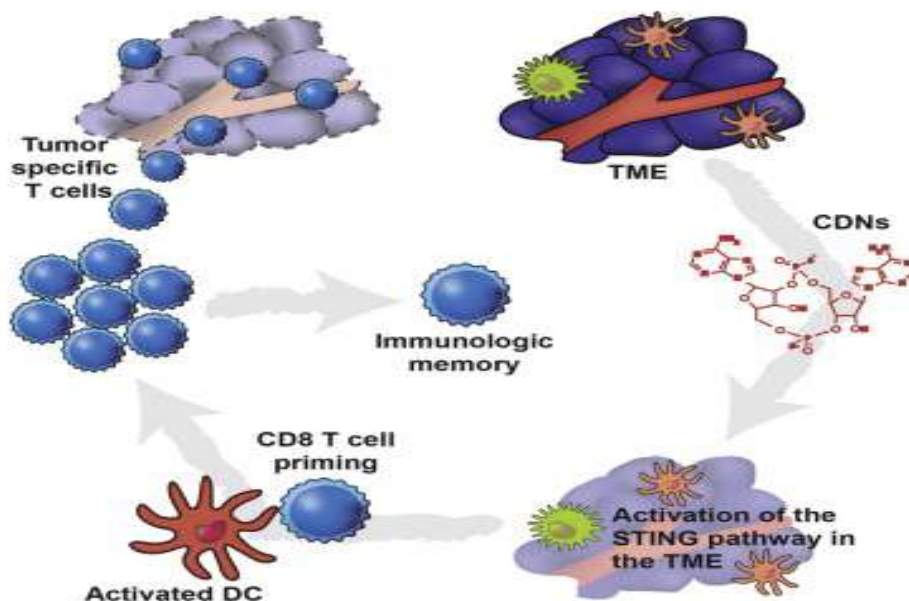
Η χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) θα μπορούσε να ελεγχθεί και να θεραπευτεί με αντιϊκές θεραπείες άμεσης δράσης. Ωστόσο, δεν έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικά εμβόλια HCV, γεγονός που εμπόδισε τον παγκόσμιο έλεγχο της επιδημίας και την εξάλειψη του HCV. Επιπλέον, η πιθανή αντίσταση στις αντιϊκές θεραπείες άμεσης δράσης προέκυψε ταυτόχρονα με την ανάπτυξη και εφαρμογή μεγάλης κλίμακας. Ως εκ τούτου, η επιτυχία των εμβολίων mRNA έναντι διαφορετικών τύπων ιών παρέχει μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού εμβολίου HCV.

Λίγες προκλινικές ή κλινικές δοκιμές που χρησιμοποιούν εμβόλια με βάση το mRNA κατά του HCV έχουν αναφερθεί. Οι Sharifnia *et al.* (2019) ανέφεραν για πρώτη φορά τη δημιουργία ενός IVT mRNA που κωδικοποιεί τη βασική πρωτεΐνη του HCV. Η επιτυχής έκφραση της βασικής πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε DCs που προέρχονται από μονοκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει τη δυνατότητα δημιουργίας ενός εμβολίου με βάση το RNA κατά του HCV.

4 v) Νέες προσεγγίσεις για την θεραπεία του Καρκίνου

Θεραπευτικά εμβόλια κατά του καρκίνου έχουν αναπτυχθεί εδώ και δεκαετίες. Ωστόσο, το κλινικό αποτέλεσμα εξακολουθεί να μην είναι το αναμενόμενο. Η ανάπτυξη εμβολίων mRNA φέρνει τα εμβόλια κατά του καρκίνου σε μια νέα γενιά, κυρίως λόγω της ικανότητας να προκαλούν ισχυρές αποκρίσεις T κυττάρων. Τα εμβόλια mRNA κατά του καρκίνου εξακολουθούν να βασίζονται στην ανακάλυψη πιο ειδικών και ανοσογόνων αντιγόνων όγκων. Η ταυτοποίηση των νεοαντιγόνων θα βοηθήσει τους ερευνητές να αναπτύξουν πιο αποτελεσματικά μεμονωμένα εμβόλια κατά του καρκίνου. Η επαγωγή των IFN τύπου I διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση ισχυρής απόκρισης T κυττάρων με εμβόλια mRNA, και είναι ένα πεδίο που έχει απορροφήσει μεγάλο κομμάτι της έρευνας διότι θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την ανακάλυψη ορισμένων συστημάτων χορήγησης όπως για παράδειγμα το STING (stimulator of interferon genes) σύστημα ενεργοποίησης.

Ο αγωνιστής STING αναγνωρίζεται ως ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο για τη θεραπεία του καρκίνου και τη θεραπεία κατά των ιών λόγω των πλεονεκτημάτων του που προκαλούν την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (IFN-I) και προφλεγμονωδών παραγόντων και παίζει κρίσιμο ρόλο στον έμφυτο ανοσοποιητικό φραγμό στο ανθρώπινο σώμα. Κυκλικά δινουκλεοτίδια (Cyclic dinucleotides-CDNs) χρησιμοποιούνται ως συνθετικός αγωνιστής STING που επί του παρόντος υποβάλλονται ακόμα σε κλινικές δοκιμές με ένεση ενός φαρμάκου ή συνδυασμό με αντίσωμα PD-1 / PD-L1 (Programmed cell death protein-1) για τη θεραπεία διαφόρων κακοηθών όγκων (εικόνα 19). Ωστόσο, η κακή στόχευση των κυττάρων, η ταχεία κάθαρση και η χαμηλής απόδοσης μεταφορά κυτοσόλης εμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή του αγωνιστή STING. Ως εκ τούτου, η ενίσχυση της αποτελεσματικότητας χορήγησης των αγωνιστών STING παραμένει επείγουσα πρόκληση (Chunying Li *et al.*, 2021).



Εικόνα 19: Η ενδογενής ενεργοποίηση της οδού STING εντός του όγκου προκαλεί στιγμιαία προετοιμασία των T κυττάρων που παράγουν συνθετικά κυκλικά διουκλεοτίδια (CDNs) που ενεργοποιούν στο ποντίκι και όλα τα ανθρώπινα αλληλόμορφα το μονοπάτι STING ως θεραπευτικό. (TME=Tumour Microenvironment) (Πηγή: Corrales *et al.* 2015)

4 vi) Ανάπτυξη υπολογιστικών μοντέλων και δικτύων

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα σημεία, από τα μεγαλύτερα εμπόδια στον σχεδιασμό ενός εμβολίου είναι ο σχεδιασμός του mRNA λόγω της ποικιλομορφίας των πιθανών στόχων. Αυτό έχει δημιουργήσει την ανάγκη ανάπτυξης ψηφιακών μοντέλων σχεδιασμού. Για παράδειγμα, η πρωτεϊνική ακίδα του SARS-CoV-2 έχει 1.273 αμινοξέα και επομένως μπορεί να κωδικοποιηθεί από περίπου $2,4 \times 10^{632}$ αλληλουχίες mRNA. Αυτό θέτει μια υπολογιστική πρόκληση και αποκλείει την απαρίθμηση, η οποία θα χρειαζόταν 10^{616} δισεκατομμύρια χρόνια για την πρωτεΐνη ακίδα.

Πολλά πακέτα δευτερογενούς δομής RNA που βασίζονται σε δυναμικό προγραμματισμό μπορούν να προβλέψουν δευτερογενείς δομές αλληλουχιών mRNA με σχετικά υψηλή ακρίβεια. Ωστόσο, τα πακέτα δευτερογενούς δομής RNA είναι αρκετά εξιδανικευμένα και η αποσύνθεση του mRNA μπορεί να εξαρτάται από κάτι περισσότερο από τη δευτερογενή δομή, αλλά και από το σημειακό ή/και το συνολικό πλαίσιο των αλληλουχιών mRNA (Lorentz *et al.*, 2011).

Μια κατηγορία προσέγγισης είναι η μοντελοποίηση, βάσει δεδομένων, που έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία σε πολλούς τομείς. Απαραίτητη όμως είναι η βελτίωση των αρχιτεκτονικών βαθιάς μάθησης (*deep learning*) που είναι άμεσα συνδεδεμένη με την πρόοδο στην οικοδόμηση καλύτερων εργαλείων βιοπληροφορικής. Στον τομέα της επεξεργασίας φυσικής γλώσσας, αρχιτεκτονικές βαθιάς μάθησης βασισμένες στην αυτο-προσοχή (*self-attention*), έχουν αναπτυχθεί όπως για παράδειγμα οι αναπαραστάσεις αμφίδρομων κωδικοποιητών (*bidirectional encoder representations from transformer- BERT*) (Devlin *et al.*, 2018).

Παρομοίως έχει βελτιωθεί και η επεξεργασία της γονιδιωματικής (Schreiber *et al.* 2019) και της υπολογιστικής βιολογίας. Αυτό επέτρεψε στους ερευνητές να χρησιμοποιήσουν επαναλαμβανόμενα νευρωνικά δίκτυα όπως το Recurrent Neural Network / Long Short Term

Memory / Gated Recurrent Unit για να προβλέψουν αποτελεσματικά τη λειτουργία, την προέλευση και τις ιδιότητες των αλληλουχιών DNA / RNA δημιουργώντας νευρωνικά δίκτυα σε μεγάλα σύνολα δεδομένων (Oubounyt *et al.*, 2019).

Το **RNAdeg-former** είναι ένα μοντέλο νευρωνικού δικτύου από την «OpenVaccine challenge» της Eterna community, που χρησιμοποιεί συνέλιξη και αυτο- παρακολούθηση για να συλλάβει τόσο τοπικές όσο και συνολικές αλληλουχίες, οι οποίες επιτρέπουν στο μοντέλο να επιτύχει υψηλή ακρίβεια και να παρέχει ερμηνευσιμότητα στην πρόβλεψη ιδιοτήτων αποικοδόμησης αλληλουχιών mRNA (Wayment *et al.* 2022). Έτσι κατάφεραν να αναπτύξουν μια πλατφόρμα βαθιάς μάθησης, εύκολα προσβάσιμη, βασισμένη σε συνέλιξη και μετασχηματισμού για την πρόβλεψη της αποσύνθεσης του mRNA και των ημίσειας ζωής του.

Γενικά, τα εργαλεία τεχνητής νοημοσύνης (AI) βελτιστοποιούν τις επιθυμητές αλληλουχίες γονιδίων που βρίσκονται στα εμβόλια mRNA και θα μπορούσε να βοηθήσει στη δημιουργία στόχευσης με μεγαλύτερη ισχύ και σταθερότητα που μελλοντικά θα αναπτυχθούν στη φαρμακοβιομηχανία.

Ένα τέτοιο εργαλείο είναι και το **LinearDesign** το οποίο χρειάζεται μόλις λίγα λεπτά για να εκτελεστεί σε υπολογιστή και ήδη χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη *in vivo* ανοσογονικότητας, πρωτεϊνική έκφραση των σχεδιασμένων mRNAs και δομική σταθερότητα των μορίων (Zhang *et al.* 2023).

Το πρόγραμμα αυτό αναπτύχθηκε από επιστήμονες στο τμήμα της Καλιφόρνιας της **Baidu Research**, μιας εταιρείας τεχνητής νοημοσύνης με έδρα το Πεκίνο, το λογισμικό του δανείζεται τεχνικές από την υπολογιστική γλωσσολογία για να σχεδιάσει αλληλουχίες mRNA με σχήματα και δομές πιο περίπλοκες από αυτές που χρησιμοποιούνται στα τρέχοντα εμβόλια. Ουσιαστικά το σχεδιαστικό αυτό πρόγραμμα προσπαθεί να διατηρήσει το mRNA άθικτο σε όλο το μήκος του, σχεδιαστικά το αναδιπλώνει και μοιάζει περισσότερο με ένα δίκλωνο DNA το οποίο είναι πιο συμπαγείς.

Αυτό επιτρέπει στο γενετικό υλικό να παραμείνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το συνηθισμένο με αποτέλεσμα περισσότερα αντιγόνα παράγονται από τον μηχανισμό παραγωγής πρωτεϊνών στο σώμα αυτού του ατόμου. Αυτό, με τη σειρά του, οδηγεί σε αύξηση των προστατευτικών αντισωμάτων, αφήνοντας θεωρητικά ανοσοποιημένα άτομα καλύτερα εξοπλισμένα για να αποκρούσουν μολυσματικές ασθένειες.

Επιπλέον, η ενισχυμένη δομική πολυπλοκότητα του mRNA προσφέρει βελτιωμένη προστασία έναντι της αποσύνθεσης του εμβολίου. Κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, τα εμβόλια με βάση το mRNA κατά του κορονοϊού SARS-CoV-2 έπρεπε να μεταφερθούν και να διατηρηθούν σε θερμοκρασίες κάτω των -15 °C για να διατηρήσουν τη σταθερότητά τους. Αυτό περιόρισε τη διανομή τους σε φτωχές σε πόρους περιοχές του κόσμου που δεν έχουν πρόσβαση σε εγκαταστάσεις αποθήκευσης εξαιρετικά ψυχρών υλικών. Ένα πιο ανθεκτικό προϊόν, βελτιστοποιημένο από AI, θα μπορούσε να εξαλείψει την ανάγκη για εξοπλισμό ψυχρής αλυσίδας για το χειρισμό τέτοιων εφαρμογών.

Το *Linear design* έχει αποδείξει, στο πεδίο του SARS-Cov 2, ότι συνεισφέρει σε μεγάλο επίπεδο στο να ξεπεραστούν τα βασικά προβλήματα σχεδιασμού και απόδοσης πετυχαίνοντας συμπαγής δομή σε διάλυμα, χημική σταθερότητα, κυτταρική πρωτεϊνική έκφραση, και *in vivo* ανοσογονικότητα (Zhang *et al.*, 2023).

Τα πλεονεκτήματα από τέτοια σχεδιαστικά μοντέλα, έχουν ήδη αρχίσει να επηρεάζουν και την ανάπτυξη mRNA εμβολίων κατά διαφόρων μορφών καρκίνου. Σε προηγούμενο σημείο έχει αναφερθεί μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση για την επιτυχημένη εφαρμογή εξατομικευμένου mRNA εμβολίου κατά του παγκρεατικού καρκίνου χρησιμοποιώντας συμπληρωματικά λογισμικό σχεδιασμού νεοαντιγόνων (autogene cenvumeran) συνοδευόμενο με μονοκλωνικό αντίσωμα (Atezolizumab) (Rojas *et al.*, 2023).

Τα εξατομικευμένα εμβόλια mRNA σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες, θα πρέπει χρησιμοποιηθεί ως νέα προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου. Τα εξατομικευμένα εμβόλια mRNA κατά του καρκίνου βρίσκονται ακόμα σε διάφορες προκλινικές και κλινικές φάσεις. Αυτός όμως ο τύπος εμβολίου εξακολουθεί να είναι πολύ δαπανηρός για να χρησιμοποιηθεί ευρέως και εξ ορισμού δεν μπορεί να παρασκευαστεί σε μεγάλες παρτίδες.

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και παγκόσμια εφαρμογή των mRNA εμβολίων

Όλες οι προηγούμενες αναφορές αποδεικνύουν την συνεισφορά της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη των mRNA εμβολίων, με αφορμή κυρίως την πανδημία που προκάλεσε ο COVID-19. Το θέμα όμως που έχει κυρίως προκύψει είναι κατά το ποσό η γνώση που κερδήθηκε από τους παγκοσμίους οικονομικούς πόρους είναι απόλυτα ελεύθερα διαθέσιμη σε όλη την επιστημονική κοινότητα ή η χρήση του διπλώματος ευρεσιτεχνίας, από την κάθε φαρμακοβιομηχανία, θα περιορίσει την επιτυχημένη εφαρμογή σε όλους τους τομείς.

Ακόμα, τα εμβόλια που αναπτύχθηκαν δεν έχουν καταφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα παγκοσμίως, διότι ο κορονοϊός εξακολουθεί μην έχει αντιμετωπιστεί ανάλογα σε φτωχότερα έθνη που δεν μπορούν να αντέξουν οικονομικά ένα πρόγραμμα εμβολιασμού (Krishtel και Malrani, 2021). Ίσως η επερχόμενη ανάπτυξη σε σταθερότερα δομικά mRNA εμβόλια, θα επιτρέψει την διευρυμένη χρήση τους σε χώρες που δεν έχουν τις κατάλληλες υποδομές φύλαξης και διανομής για τα ήδη υπάρχοντα mRNA εμβόλια.

Μελλοντικές Προκλήσεις

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα στάδια από τον αρχικό σχεδιασμό, παραγωγή και εφαρμογή των mRNA εμβολίων θα πρέπει να βελτιωθούν ή να γίνει διαφορετική προσέγγιση σε μερικούς τομείς.

Ένα τέτοιο πεδίο είναι ο σχεδιασμός και ο καθαρισμός του φορτίου mRNA για την ενίσχυση της διάρκειας και του μεγέθους της παραγωγής πρωτεϊνών *in vivo*. Αυτές οι προσεγγίσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν πρόοδο στο σχεδιασμό της πρωτογενούς χημικής δομής του mRNA, νέες μορφές κυκλικού και αυτοενισχυόμενου mRNA και βελτιωμένες στρατηγικές καθαρισμού.

Επίσης, βελτιώσεις στα συστήματα ενθυλάκωσης mRNA για την ενίσχυση της παράδοσης φορτίου mRNA, συμπεριλαμβανομένων ιονιζόμενων LNPs, εξωκυτταρικών κυστιδίων με βάση

τα κύτταρα, και με την χρήση της ανερχόμενης βιοϊατροτεχνολογίας, θα πρέπει να ερευνηθούν σε μεγαλύτερο βαθμό.

Οι προσεγγίσεις για τη στόχευση θεραπευτικών mRNA σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως διαδερμικούς καθετήρες για παράδοση στην καρδιά, το πάγκρεας και τα νεφρά, και τη μηχανική συστημάτων συσκευασίας με ειδικά για τον κάθε τύπο ιστού είναι ένας τομέας που αναπτύσσεται τελευταία.

Τέλος, η συνδιαστική χορήγηση εμβολίων mRNA και αναστολέων ανοσολογικών σημείων ελέγχου (Check Point Inhibition-CPI) έχει γίνει μια ενδιαφέρουσα μελλοντική θεραπευτική στρατηγική (Barbier *et al.*, 2022)

4 vii) Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, τα mRNA εμβόλια έχουν δείξει ότι θα είναι ένα μεγάλο, και ίσως το βασικό, κεφάλαιο στα επόμενα χρόνια ως προς την πρόληψη/αντιμετώπιση λοιμώξεων αλλά και θεραπεία γονιδιακών παθήσεων και συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Το σημαντικό όφελος από τις έρευνες για την καταπολέμηση του COVID-19, ήταν η τεράστια γνώση που αποκτήθηκε σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα για την προσπέλαση όλων των περιορισμών των εμβολίων αυτών. Η ανάγκη για άμεσα αποτελέσματα οδήγησε στην συνεργασία πολλών διαφορετικών ειδικοτήτων έτσι ώστε είτε να αναβαθμιστούν ή να αναπτυχθούν νέοι φορείς χορήγησης που θα βελτιώσουν την αποδοτικότητα και την στόχευση, είτε να συνδράμουν με νέα υπολογιστικά μοντέλα που έχουν προκύψει από την τεχνολογική εξέλιξη, έτσι ώστε να περιορίσουν το κόστος και τον χρόνο του σχεδιασμού, αλλά και της σταθεροποίησης ενός εμβολίου.

Τα ερευνητικά αποτελέσματα τα τελευταία τρία χρόνια είναι θεαματικά και δικαίως δημιουργούν τρομερές προσδοκίες για την εξέλιξη των mRNA εμβολίων. Το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας, πιστεύει ότι στο πολύ άμεσο μέλλον θα έχουμε τρομερές εξελίξεις στον χειρισμό, στην σταθερότητα, στη διεύρυνση του πεδίου εφαρμογής αλλά και της αποτελεσματικότητας των εμβολίων mRNA.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbasi J. COVID-19 and mRNA vaccines—First large test for a new approach. *JAMA*. **2020**;324(12):1125–1127.
- Agnandji, S. T. et al. Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1647–1660 (2016).
- Alberer 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* **390** (10101) (2017) 1511–1520,
- Allen TM. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Sci (New York NY)* (2004) **303**(5665):1818–22. doi: 10.1126/science.1095833
- Alton, E.W.F.W.; Armstrong, D.K.; Ashby, D.; Bayfield, K.J.; Bilton, D.; Bloomfield, E.V.; Boyd, A.C.; Brand, J.; Buchan, R.; Calcedo, R.; et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med.* **2015**, *3*, 684–691.
- American Association for Cancer Research. mRNA Vaccine Slows Melanoma Recurrence. *Cancer Discov* (**2023**) *13* (6): 1278
- An, D. et al. Systemic messenger RNA therapy as a treatment for methylmalonic acidemia. *Cell Rep.* **21**, 3548–3558 (2017).
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med* **1997**;3:917–992
- An, D. et al. Long-term efficacy and safety of mRNA therapy in two murine models of methylmalonic acidemia. *EBioMedicine* **45**, 519–528 (2019).
- Asrani, K.H.; Farelli, J.D.; Stahley, M.R.; Miller, R.L.; Cheng, C.J.; Subramanian, R.R.; Brown, J.M. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. *RNA Biol.* **2018**
- Awasthi Sita , and. Friedman H. An mRNA vaccine to prevent genital herpes. *Translational Research* Volume 242. **2021**. 56-65
- Au, W.Y.; Cheung, P.P.-H. Effectiveness of heterologous and homologous COVID-19 vaccine regimens: Living systematic review with network meta-analysis. *BMJ* **2022**, 377
- Ayoub HH, Chemaitelly H, Abu-Raddad LJ. Characterizing the transitioning epidemiology of herpes simplex virus type 1 in the USA: model-based predictions. *BMC Med* **2019**;17:57.
- Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 403–416.
- Barbier, A.J.; Jiang, A.Y.; Zhang, P.; Wooster, R.; Anderson, D.G. The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40*, 840–854
- Bagchi, S.; Yuan, R.; Engleman, E.G. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Ann. Rev. Pathol.* **2021**, *16*, 223–249.
- Bahl et al., Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses, *Mol. Ther.* **25** (6) (2017) 1316–1327
- Bai L., Wenqian Li, Weijia Zheng, Dongsheng Xu, Naifei Chen, Jiuwei Cui. Promising targets based on pattern recognition receptors for cancer immunotherapy. *Pharmacological Research.* 159 (2020)
- Beissert, T. et al. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. *Mol. Ther.* **28**, 119–128 (2020)
- Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med* 2012;366:34–43
- Benteyn D, Heirman C, Bonchill A, Thielemans K, Breckpot K. mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14:161–76.
- Berndsen, Z. T. et al. Visualization of the HIV-1 Env glycan shield across scales. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 28014–28025 (2020).
- Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Meo M, et al. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study. *Br J Cancer.* **2006**;95(11):1474–82.
- Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* **17**(4), 347–361 (2018).



Blanco, E., Shen, H., and Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951

Blass E and Ott PA. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Clin Oncol* **2021**; **18**: 215-229.

Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* **1996**; **184**:465–72.

Boni, M. F. Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* **26**, C8–C14 (2008).

Brazzoli et al., Induction of Broad-Based Immunity and Protective Efficacy by Self-amplifying mRNA Vaccines Encoding Influenza Virus Hemagglutinin, *J. Virol.* **90** (1) (2016) 332–344,

Brenner, S., Jacob, F. & Meselson, M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190**, 576–581 (1961).

Broderick E, K.; Humeau, L.M. Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **2014**, **14**, 195–204.

Burris, H.A., Patel, M.R., Cho, D.C., Clarke, J.M., Gutierrez, M., Zaks, T.Z., Frederick, J., Hopson, K., Mody, K., Binanti-Berube, A., Robert-Tissot, C., Goldstein, B., Breton, B., Sun, J., Zhong, S., Pruitt, S.K., Keating, K., Meehan, R.S., Gainor, J.F., A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **37**, 2523 .**2019**

Carralot J-P, Weide B, Schoor O, Probst J, Scheel B, Teufel R, et al. Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas. *Genet Vaccines Ther* **2005**; **3**:6;

Carlsson, L. et al. Biocompatible, purified VEGF-A mRNA improves cardiac function after intracardiac injection 1 week post-myocardial infarction in swine. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **9**, 330–346 (**2018**).

Carvalho Thiago. Personalized anti-cancer vaccine combining mRNA and immunotherapy tested in melanoma trial. *Nature Medicine.* **2023**

Cafri, G., Gartner, J.J., Zaks, T., Hopson, K., Levin, N., Paria, B.C., Parkhurst, M.R., Yossef, R., Lowery, F.J., Jafferji, M.S., Prickett, T.D., Goff, S.L., McGowan, C.T., Seitter, S., Shindorf, M.L., Parikh, A., Chatani, P.D., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J. Clin. Invest.* **130**, 5976–5988. **2020**

Cafuir, L. A. & Kempton, C. L. Current and emerging factor VIII replacement products for hemophilia A. *Therapeutic Adv. Hematol.* **8**, 303–313 (**2017**)

Chahal, J. S. et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, E5250 (**2016**).

Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discovery*. volume 20, pages817–838(**2021**)

Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* (**2011**) **17**(11):3520–6.

Chen X, Chen T, Ren L, Chen G, Gao X, Li G, et al. Triplex DNA Nanoswitch for pH-Sensitive Release of Multiple Cancer Drugs. *ACS Nano* (**2019**) **13** (6):7333–44.

Christensen,D.;Agger,E.M.;Andreasen,L.V.;Kirby,D.J.;Andersen,P.;Perrie,Y.Liposome-basedcationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future. *J. Liposome Res.* **2009**, **19**, 2–11

Chunying Li, Yifan Zhang, Yilin Wan, Jingle Wang, Jing Lin, Zhiming Li, Peng Huang. STING-activating drug delivery systems: Design strategies and biomedical applications. volume 32,issue 5. May **2021**, Pages 1615-1625

Corrales et.al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Reports* **11**, 1018–1030, May 19, **2015**

Costales, M. G., Childs-Disney, J. L., Haniff, H. S., & Disney, M. D. (2020). How we think about targeting RNA with small molecules. *Journal of Medicinal Chemistry* **63**, 8880–8900.

Collén, A. et al. VEGF-A mRNA for regenerative treatment of heart failure. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 79–80 (2022).



Creusot, R.J.; Chang, P.; Healey, D.G.; Tcherepanova, I.Y.; Nicolette, C.A.; Fathman, C.G. A short pulse of IL-4 delivered by DCs electroporated with modified mRNA can both prevent and treat autoimmune diabetes in NOD mice. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 2112–2120.

Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *J Biol Chem* 2006; 281:1857-67; PMID:16257956; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509121200>.

Cui, J.; Chen, M.; Zhang, L.; Huang, S.; Xiao, F.; Zou, L. Circular RNAs: Biomarkers of Cancer. *Cancer Innov.* **2022**, *1*, 197–206

Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot ML, Yamada B, Heeb MJ, Sheets SM, Wu X, Casiano CA. Antinuclear autoantibodies in PCa: Immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* **2005**;62:14–26.

De Beuckelaer, A.; Grooten, J.; De Koker, S. Type I Interferons Modulate CD8 + T Cell Immunity to mRNA Vaccines. *Trends Mol. Med.* **2017**, *23*, 216–226.

Dejinrattisai, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat. Immunol.* **17**, 1102–1108 (2016).

Devlin J, Chang M-W, Lee K, et al. BERT: pre-training of deep bidirectional transformers for language understanding. *CoRR*. [abs/1810.04805](https://arxiv.org/abs/1810.04805) **2018**.

Dhillon, S. (2020). Risdipam: First approval. *Drugs* **80**, 1853–1858.

Diebold, S.S.; Kaisho, T.; Hemmi, H.; Akira, S.; Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **2004**, *303*, 1529–1531.

Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res.* **2014**;115:488–92

Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Menard S, Cheever MA. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* **1997**;15:3363–7.

Doerfler W., Weber S., Naumann A. Inheritable epigenetic response towards foreign DNA entry by mammalian host cells: a guardian of genomic stability. *Invited Review, Epigenetics.* 2018; **13**:1141–1153.

Doyle GA, Bourdeaux-Heller JM, Coulthard S, Meisner LF, Ross J. Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA binding protein. *Cancer Res* **2000**;60:2756–2759

Du Y, Peng P, Li T. DNA Logic Operations in Living Cells Utilizing Lysosome-Recognizing Framework Nucleic Acid Nanodevices for Subcellular Imaging. *ACS Nano* (2019) **13**(5):5778–84.

Erasmus, J. H. et al. Intramuscular delivery of replicon RNA encoding ZIKV-117 human monoclonal antibody protects against Zika virus. *Infect. Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **18**, 402–414 (2020).

Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8 Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Immunotherapy: A Review. *J Cell Physiol* (2019) **234**(6):8509–21

Feldman, R.A.; Fuhr, R.; Smolenov, I.V.; Ribeiro, A.M.; Panther, L.; Watson, M.; Senn, J.J.; Smith, M.; Almarsson, Ö.; Pujar, H.S.; 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**, *37*, 3326–3334

Foks AC, Engelbertsen D, Kuperwaser F, Al-berts-Grill N, Gonen A, Witzum JL, Lederer J, Jarolim P, DeKruyff RH, Freeman GJ and Lichtman AH. Blockade of Tim-1 and Tim-4 enhances atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2016**; *36*: 456-465.

Fotin-Mlecsek, M.; Duchardt, K.M.; Lorenz, C.; Pfeiffer, R.; Ojčić-Zrna, S.; Probst, J.; Kallen, K.-J. Messenger RNA-Based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity. *J. Immunother.* **2011**, *34*, 1–15

Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* **31**(9):822–826.

Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol.* **2014**;32: 279–84

Fu X, Chen T, Song Y, Feng C, Chen H, Zhang Q, et al. mRNA Delivery by a pH-Responsive DNA Nano-Hydrogel. *Small (Weinheim An Der Bergstrasse, Germany)* **(2021)**17(29)



Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol.* (2009) 21:242–53.

Furuishi Yasuhiro Discovery of m⁷G-cap in eukaryotic mRNAs. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 91 (2015) [Vol. 91.] pages 394–408 .

Gao Minsong, Qingyi Zhang , Xin-Hua Feng Jianzhao Liu. Synthetic modified messenger RNA for therapeutic applications. *Acta Biomaterialia* 131 (2021) 1–15.

Garcia,A.B.;Siu,E.;Sun,T.;Exler,V.;Brito,L.;Hekele,A.;Otten,G.;Augustijn,K.;Janse,C.J.;Ulmer,J.B.; et al. Neutralization of the Plasmodium-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection. *Nat. Commun.* 2018, 9, 2714.

Gaffney, M. M., Hynes, S. O., Barry, F. & O'Brien, T. Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* 152, 175–188 (2007).

Geall, A.J.; Verma, A.; Otten, G.R.; Shaw, C.A.; Hekele, A.; Banerjee, K.; Cu, Y.; Beard, C.W.; Brito, L.A.; Krucker, T.; et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 14604–14609

Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcarcel, J., & Hentze, M. W. (2021). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nature Reviews. Genetics* 22, 185–198.

Ghaemmaghami A, F. Shakib, L. Martinez-Pomares, and C. Yang, “The role of Mannose receptor in allergen recognition by human dendritic cells (DC),” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 121, no. 2, p. S11, 2008.

Ghaffari, R. Meurant, and A. Ardakani, “COVID-19 Serological Tests: How Well Do They Actually Perform?,” *Diagnostics* 2020, Vol. 10, Page 453, vol. 10, no. 7, p. 453, Jul. 2020,

Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, Saeterdal I, Gedde-Dahl T, Stokke KT, et al. Ex vivo ras peptide vaccination in patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase I/II study. *Int J Cancer.* 1996;65(4):450–3.

Gillmore, J. D. et al. CRISPR–Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 385, 493–502 (2021).

Goldman Bruce. “How do the new COVID-19 vaccines works” Published on December 22, 2020 . SCOPE

Goss, D.J.; Kleiman, F.E. Poly(A) binding proteins: Are they all created equal? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2013, 4, 167–179.

Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *J Biol Chem* 2006; 281:1857-67; PMID:16257956; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509121200>

Gubler D. J, “Dengue and dengue hemorrhagic fever,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, no. 3. American Society for Microbiology, pp. 480–496, Jul. 01, 1998

Hajj K.A, K.A. Whitehead, Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery, *Nat. Rev. Mater.* 2 (10) (2017) 17.

Heil, F.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Kirschning, C.; Akira, S.; Lipford, G.; Wagner, H.; Bauer, S. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* 2004, 303, 1526–1529.

Heiser, A.; Coleman, D.; Dannull, J.; Yancey, D.; Maurice, M.A.; Lallas, C.D.; Dahm, P.; Niedzwiecki, D.; Gilboa, E.; Vieweg, J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Investig.* 2002, 109, 409–417.

Hoang T.T. Thi, E. H. Pilkington, D. H. Nguyen, J. S. Lee, K. D. Park, and N. P. Truong, “The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/polym12020298.

Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassidy JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 29(8):731–734

Hou X., Zaks T., Langer R. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* 6: 1078–1094. 2021

Hu Z, Leet DE, Allesoe RL, Oliveira G, Li S, Luoma AM, Liu J, Forman J, Huang T, Iorgulescu JB, Holden R, Sarkizova S, Gohil SH, Redd RA, Sun J, Elagina L, Giobbie-Hurder A, Zhang W, Peter L, Cianra Z, Rodig S, Olive O, Shetty K, Pyrdol J, Uduman M, Lee PC, Bachireddy P, Buchbinder EI, Yoon CH, Neuberger D, Pentelute BL, Hacohen N, Livak KJ, Shukla SA, Olsen LR, Barouch DH, Wucherpennig KW, Fritsch EF,



Keskin DB, Wu CJ and Ott PA. Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma. *Nat Med* **2021**; 27: 515-525

Huang X (a) Tang T, Zhang G, Liang T. Identification of tumor antigens and immune subtypes of cholangiocarcinoma for mRNA vaccine development. *Mol Cancer* (2021) 20(1):50.

Huang X, (b)Zhang G, Tang T, Liang T. Identification of tumor antigens and immune subtypes of pancreatic adenocarcinoma for mRNA vaccine development. *Mol Cancer* (2021) 20(1):44.

Huang T, Lushan Peng, Yingying Hag, Dan Wang, Xiaoyun He, Junpu Wang and Chunlin Ou. Lipid nanoparticle-based mRNA vaccines in cancers: Current advances and future prospects. *Front. Immunol.* 13:922301(2022).

Huang (b) et al. Personalized pancreatic cancer therapy: from the perspective of mRNA vaccine. *Military Medical Research* (2022) 9:53

Hussain S, Plückthun A, Allen TM, Zangemeister-Wittke U. Antitumor activity of an epithelial cell adhesion molecule targeted nanovesicular drug delivery system. *Mol Cancer Ther* (2007) 6(11):3019–27.

Jiang, L. et al. Dual mRNA therapy restores metabolic function in long-term studies in mice with propionic acidemia. *Nat. Commun.* **11**, 5339 (2020).

Jusu, M. O. et al. Rapid establishment of a cold chain capacity of -60°C or colder for the STRIVE Ebola vaccine trial during the Ebola outbreak in Sierra Leone. *J. Infect. Dis.* **217**, S48–S55 (2018).

Kallen, K.-J.; Heidenreich, R.; Schnee, M.; Petsch, B.; Schlake, T.; Thess, A.; Baumhof, P.; Scheel, B.; Koch, S.D.; Fotin-Mlczek, M. A novel, disruptive vaccination technology. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, 9, 2263–2276.

Kaner, J. & Schaack, S. Understanding Ebola: the 2014 epidemic. *Glob. Heal.* **12**, 53 (2016).

Kauffman, K.J.; Webber, M.J.; Anderson, D.G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J. Control. Release* **2016**, 240, 227–234.

Karikó, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, E. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity* **2005**, 23, 165–175.

Keating, D. et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. *N. Engl. J. Med* 379, 1612–1620 (2018)

Keeling, K. M. et al. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay enhances in vivo nonsense suppression. *PLoS One* 8, e60478 (2013).

Keene JD. Why is Hu where? Shuttling of early response gene messenger RNA subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**;96:5–7.

Khan P, Siddiqui JA, Lakshmanan I, Ganti AK, Salgia R, Jain M, et al. RNA-Based therapies: A cog in the wheel of lung cancer defense. *Mol Cancer* (2021) 20(1):54. doi: 10.1186/s12943-021-01338-2

Khvorova, A. & Watts, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 35, 238–248 (2017).

Kirtane, A. R. et al. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nat. Nanotechnol.* **16**, 369–384 (2021).

Kole, R., Krainer, A. R. & Altman, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 125–140 (2012).

Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell.* 2016;168:1–17

Kormann, M.S.; Hasenpusch, G.; Aneja, M.K.; Nica, G.; Flemmer, A.W.; Herber-Jonat, S.; Huppmann, M.; Mays, L.E.; Illenyi, M.; Schams, A.; et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29, 154–157

Kowalczyk, A.; Doener, F.; Zanzinger, K.; Noth, J.; Baumhof, P.; Fotin-Mlczek, M.; Heidenreich, R. Self-adjuvanted mRNA vaccines induce local innate immune responses that lead to a potent and boostable adaptive immunity. *Vaccine* **2016**, 34, 3882–3893

Kowalski, P.S.; Rudra, A.; Miao, L.; Anderson, D.G. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol. Ther.* **2019**, 27, 710–728.

Krishtel P, Malpani R. Suspend intellectual property rights for covid-19 vaccines. *BMJ.* **2021**;373:n1344.



Kwon H, Kim M, Seo Y, Moon YS, Lee HJ, Lee K, et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials* **2018**;156:172–93

Kyoung Mi Kim, Kotb Abdelmohsen, Maja Mustapic, Dimitrios Kapogiannis, Myriam Gorospe. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **2017** July ; 8(4)

Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Rutkowski, P.; Lao, C.D.; Cowey, C.L.; Schadendorf, D.; Wagstaff, J.; Dummer, R.; et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1535–1546.

Leal et al., Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection, *AIDS* 32 (17) (**2018**).

Lemaire Peter, Eric Anderson, Jeffrey Lary, James L. Cole . Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *Viruses*. **2012** Nov; 4(11)

Lentini, L. et al. Toward a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay. *Mol. Pharm.* 11, 653–664 (**2014**).

Lei S, Zhang X, Men K, Gao Y, Yang X, Wu S, et al. Efficient colorectal cancer gene therapy with IL-15 mRNA nanoformulation. *Mol Pharm* (**2020**) 17 (9):3378–91.

Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito J-Y, Verrier B. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response. *Trends Mol Med* (**2020**); 26(3):311–23.

Linde, L. et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J. Clin. Investig* 117, 683–692 (**2007**).

Liu, C.C.; Yang, H.; Zhang, R.; Zhao, J.J.; Hao, D.J. Tumour-associated antigens and their anti-cancer applications. *Eur. J. Cancer Care* (**2017**), *26*, e12446.

Liu, C.; Zhou, Q.; Li, Y.; Garner, L.V.; Watkins, S.P.; Carter, L.J.; Smoot, J.; Gregg, A.C.; Daniels, A.D.; Jervey, S.; et al. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Central Sci.* **2020**,

Lodaya RN, Kanitkar AP, Friedrich K, Henson D, Yamagata R, Nuti S, et al. Formulation Design, Optimization and In Vivo Evaluations of an a-Tocopherol-Containing Self-Emulsified Adjuvant System Using Inactivated Influenza Vaccine. *J Controlled Release* (2019) 316:12–21.

Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. **2016**;351:400–3.

Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect* **2005**;81:103–7

Lorentzen Cathrine, John B Haanen, Özcan Met, Inge Marie Svane. Clinical advances and ongoing trials of mRNA vaccines for cancer treatment. Vol 23 October **2022**

Lorenz R, Bernhart SH, Siederdisen CHZ, et al. Viennarna package 2.0. *Algorithm Mol Biol* **2011**

Lu Tan and Xun Sun. Recent advances in mRNA vaccine delivery. *Nano Research* **2018**, 11(10): 5338–5354

Lundstrom, K. Self-Replicating RNA Viruses for RNA Therapeutics. *Molecules* **2018**, 23

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121):823–826 (**2013**)

Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* **1990**

Martin A, S.; Paoletti, E.; Moss, B. Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 9322–9329.

Martin A. Cheever and Celestia S. Higano. PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clin Cancer Res*; 17(11) June 1, **2011**

Martina B.E.E., P. Koraka, A.D.M.E. Osterhaus, Dengue virus pathogenesis: An integrated view, *Clin. Microbiol. Rev.* 22 (4) (**2009**) 564–581,



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**;27(4):757–72

Mathers C.D, T. Boerma, D. Ma Fat, Global and regional causes of death, *Br. Med. Bull.* 92 (1) (**2009**)

Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet* **4**: 499-510, **2009**.

Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee Y-L, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ (**2007**) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 25(7):778–785.

Mizumoto K, K. Kagaya, G. Chowell, Effect of a wet market on coronavirus disease (COVID-19) transmission dynamics in China, 2019–2020, *Int. J. Infect. Dis.* 97 (Aug. **2020**)

Moderna and the Institute for Life Changing Medicines. Developing an mRNA therapeutic for ultra- rare disease, Crigler–Najjar syndrome type 1 (**2021**).

Mohibi, S., Chen, X., & Zhang, J. (**2019**). Cancer the'RBP'eutics-RNA-binding proteins as therapeutic targets for cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 203, 107390.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proc* (**2008**) 83(5):584–94. doi: 10.1016/S0025-6196(11)60735-0

Moreno AM, Mali P. Therapeutic genome engineering via CRISPR-Cas systems. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* **2017**:

Morrison AH, Byrne KT, Vonderheide RH. Immunotherapy and prevention of pancreatic cancer. *Trends Cancer.* **2018**;4(6):418–28.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* Aug **4.2014**

Munroe D, Jacobson A. mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* **1990**; 10:3441-55; PMID:1972543

Mugridge, J.S.; Collier, J.; Gross, J.D. Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'-3' mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, 25, 1077–1085.

Namgoong John Hyun and Bertoni Carmen. Clinical potential of ataluren in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease* **2016**:6 37–48

National Comprehensive Cancer Network..Clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer v.2.2011. [cited 2011 Apr 28]. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

Neumeister MW, Winters JN. Neuroma. *Clinics Plast Surg* (**2020**) 47 (2):279–83. doi: 10.1016/j.cps.2019.12.008

Oubounyt M, Louadi Z, Tayara H, *et al.* Deepromoter: robust promoter predictor using deep learning. *Front Genet* **2019**;10

Oladimeji O, Akinyelu J, Singh M. Co-Polymer Functionalised Gold Nanoparticles Show Efficient Mitochondrial Targeted Drug Delivery in Cervical Carcinoma Cells. *J Biomed Nanotechnol* (**2020**) 16(6):853–66

Oren, Y. S. *et al.* Antisense oligonucleotide splicing modulation as a novel Cystic Fibrosis therapeutic approach for the W1282X nonsense mutation. *J Cyst Fibros.* (**2021**).

Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C and Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol* **2019**; 21: v1-v100.

Papachristofilou A, Hipp MM, Klinkhardt U, *et al.* Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer* **2019**; 7: 38.

Papamichael D, Audisio RA, Glimelius B, de Gramont A, Glynne-Jones R, Haller D, *et al.* Treatment of colorectal cancer in older patients: International society of geriatric oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* (**2015**) 26(3):463–76.

Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **2004**; 11:121-7; PMID:14749774; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb724>.



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 Controlled Release* (2015) 217:345–51.

Pardi, N.; Hogan, M.J.; Pelc, R.S.; Muramatsu, H.; Andersen, H.; DeMaso, C.R.; Dowd, K.A.; Sutherland, L.L.; Scearce, R.M.; Parks, R.; et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* 2017, 543, 248–251.

Pardi, N.; Parkhouse, K.; Kirkpatrick, E.; McMahon, M.; Zost, S.J.; Mui, B.L.; Tam, Y.K.; Karikó, K.; Barbosa, C.J.; Madden, T.D.; et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3361

Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent Advances in mRNA Vaccine Technology. *Curr Opin Immunol* (2020) 65:14–20.

Park, R. Zhao, J.A. West, A. Yabuuchi, H.G. Huo, T.A. Ince, P.H. Lerou, M.W. Lensch, G.Q. Daley, Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors, *Nature* 451 (7175) (2008) 141-U1.

Pascolo S. Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol Med* 2006; 127:23-40; PMID:16988444.

Pascolo S. The messenger's great message for vaccination. *Expert Rev Vaccines* 2015;14(2):153–6.

Pasquinelli AE, Dahlberg JE, Lund E. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. *RNA* 1995; 1:957-67; PMID:8548660.

Pattnaik, B. R. Sahoo, and A. K. Pattnaik, "Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges," *Vaccines*, vol. 8, no. 2, May 2020, doi: 10.3390/vaccines8020266.

Panchaud, A., Stojanov, M., Ammerdorffer, A., Vouga, M. & Baud, D. Emerging role of Zika virus in adverse fetal and neonatal outcomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 659–694 (2016).

Petsch, B.; Schnee, M.; Vogel, A.B.; Lange, E.; Hoffmann, B.; Voss, D.; Schlake, T.; Thess, A.; Kallen, K.-J.; Stitz, L.; et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat. Biotechnol.* 2012, 30, 1210–1216.

Phua, K.K.L.; Leong, K.W.; Nair, S.K. Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *J. Control. Release* 2013, 166, 227–233.

Phua, K.K.L Towards Targeted Delivery Systems: Ligand Conjugation Strategies for mRNA Nanoparticle Tumor Vaccines, *J. Immunol. Res.* 2015 (2015),

Pillay NS, Daniels A, Singh M. Folate-Targeted Transgenic Activity of Dendrimer Functionalized Selenium Nanoparticles In Vitro. *Int J Mol Sci* (2020) 21(19):7177

Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 2603–2615.

Poland, G. A. et al. Development of vaccines against Zika virus. *Lancet Infect. Dis.* 18, e211–e219 (2018).

Pollard C, De Koker S, Saelens X, Vanham G, Grooten J. Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines. *Trends Mol Med* 2013;19(12):705–13.

PTC Therapeutics International Ltd. Summary of product characteristics, Translarna. European Medicines Agency, 2018.

Quintero IB, Araujo CL, Pulkka AE, Wirkkala RS, Herrala AM, Eskelinen EL, et al. Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Res* 2007;67:6549–54.

Ramachandran Sivakumar. Soumya Ranjan Satapathy. Tathagata Dutta. *Pharmaceutical Medicine* (2022) 36:11–20

Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *J. Cell Biol.* 2013, 200, 373–383.

Ren J, Cao Y, Li L, Wang X, Lu H, Yang J, et al. Self-Assembled Polymeric Micelle as a Novel mRNA Delivery Carrier. *J Controlled Release* (2021) 338:537–47.

Richner et al., Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection, *Cell* 168 (6) (2017) 1114–1125.e10,

Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14:195–208



Robinson, E. et al. Lipid nanoparticle-delivered chemically modified mRNA restores chloride secretion in cystic fibrosis. *Mol. Ther.* **26**, 2034–2046 (2018).

Rohas et al. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature*. Volume 618. **2023**

Roers, A.; Hiller, B.; Hornung, V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity* **2016**, *44*, 739–754

Rohner Eduarde , Ran Yang, Kylie S. Foo, Alexander Goedel & Kenneth R. Chien. Unlocking the promise of mRNA therapeutics. *Nature Biotechnology*. Volume 40. November **2022**. 1586–1600

Roth et al., A modified mRNA vaccine targeting immunodominant NS epitopes protects against dengue virus infection in HLA class I transgenic mice *Front. Immunol.* vol. 10, no. JUN (2019) 1–14,

Sahin, U.; Kariko, K.; Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics—Developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759–780.

Sahin, U.; Derhovanessian, E.; Miller, M.; Kloke, B.-P.; Simon, P.; Löwer, M.; Bukur, V.; Tadmor, A.D.; Luxemburger, U.; Schrörs, B.; et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **2017**, *547*, 222–226.

Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* **2020**; 585: 107–12.

Sahin, U., et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* **595**, 572–577. **2021**

Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **2011**;39:9275–82.

Saunders K.O., N. Pardi, R. Parks, S. Santra, Z. Mu, L. Sutherland, R. Scarce, M. Barr, A. Eaton, G. Hernandez, D. Goodman, M.J. Hogan, I. Tombacz, D.N. Gordon, R.W. Rountree, Y. Wang, M.G. Lewis, T.C. Pierson, C. Barbosa, Y. Tam, X. Shen, G. Ferrari, G.D. Tomaras, D.C. Montefiori, D. Weissman, B.F. Haynes, Lipid Nanoparticle Encapsulated Nucleoside-Modified mRNA Vaccines Elicit Polyfunctional HIV-1 Antibodies Comparable to Proteins in Non-human primates, bioRxiv: the Preprint Server For Biology, **2020**.

Schreiber J, Singh R. Machine learning for profile prediction in genomics. *Curr Opin Chem Biol* **2021**; 65:35–41

Schlake, T.; Thess, A.; Fotin-Mleczek, M.; Kallen, K.-J. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1319–1330.

Schnee 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.* **10** (6) (2016) 1–20

Sebastian, M., Papachristofilou, A., Weiss, C., Fruh, M., Cathomas, R., Hilbe, W., Wehler, T., Rippin, G., Koch, S.D., Scheel, B., Fotin-Mleczek, M., Heidenreich, R., Kallen, K.J., Gnad-Vogt, U., Zippelius, A., Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **14**, 748. **2014**.

Sebastian M, Schröder A, Scheel B, Hong HS, Muth A, von Boehmer L, et al. A phase I/IIa study of the mRNA-based cancer immunotherapy CV9201 in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* **2019** 68(5):799–812.

Sellaturay, S. Nasser, S. Islam, P. Gurugama, and P. W. Ewan, “Polyethylene glycol (PEG) is a cause of anaphylaxis to the Pfizer/BioNTech mRNA COVID-19 vaccine,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 51, no. 6, Jun. **2021**, doi: 10.1111/cea.13874.

Shan Y, Luo T, Peng C, Sheng R, Cao A, Cao X, et al. Gene Delivery Using Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles as Nonviral Vectors. *Biomaterials* (2012) 33(10):3025–35.

Sharifnia Z, Bandehpour M, Kazemi B, Zarghami N. Design and development of modified mRNA encoding core antigen of hepatitis C virus: a possible application in vaccine production. *Iran. Biomed. J* **2019**. 23:57–67

Shuqin Xu, Kunpeng Yang, Rose Li and Lu Zhang. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6582; doi:10.3390/ijms21186582

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. & Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J. Clin.* **73**, 17–48 (2023).

Socinski MA, Crowell R, Hensing TE, Langer CJ, Lilenbaum R, Sandler AB, et al. Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* (2007) 132(3 Suppl):277s–89s. doi: 10.1378/chest.07-1381



Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer. *Cancer Res* **2000**;60:1777–1788.

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**; 7:1486-95; PMID:11680853.

Stockert E, Jager E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ. A survey of humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med* **1998**;187:1349–1354.

Stokes A, J. Pion, O. Binazon, B. Laffont, M. Bigras, G. Dubois, K. Blouin, J.K. Young, M.A. Ringenberg, N. Ben Abdeljelil, J. Haruna, L.-A. Rodriguez, Non- clinical safety assessment of repeated administration and biodistribution of a novel rabies self-amplifying mRNA vaccine in rats, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2020) 113.

Suknuntha, K.; Tao, L.; Brok-Volchanskaya, V.; D'Souza, S.S.; Kumar, A.; Slukvin, I. Optimization of Synthetic mRNA for Highly Efficient Translation and its Application in the Generation of Endothelial and Hematopoietic Cells from Human and Primate Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **2018**, *14*, 525–534.

Sun,X.;Zeng,L.;Huang,Y.Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. *J. Gene Med.* **2019**, *21*, e3089.

Takahashi K., S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* **126** (4) (2006) 663–676.

Tateshita N, Miura N, Tanaka H, Masuda T, Ohtsuki S, Tange K, et al. Development of a lipoplex-type mRNA carrier composed of an ionizable lipid with a vitamin E scaffold and the KALA peptide for use as an ex vivo dendritic cell-based cancer vaccine. *J Control Release.* 2019;310:36–46.

Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 363–374 (2020).

Teijaro1 John R. and Donna L. Farbe. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nature Reviews. Immunology.* volume 21. April **2021**

Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods.* **2016**;13:127–37

Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, Wei J, Nie G. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials.* **2014**; 35:2383–2390

Tucci, M.; Passarelli, A.; Mannavola, F.; Felici, C.; Stucci, L.S.; Cives, M.; Silvestris, F. Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1148

Tycko J, Myer VE, Hsu PD. Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Mol Cell.* **2016**;63:355–70

Udhayakumar, V.K., De Beuckelaer, A., McCaffrey, J., McCrudden, C.M., Kirschman, J.L., Vanover, D., Van Hoecke, L., Roose, K., Deswarte, K., De Geest, B.G., et al. (2017). Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1601412.

Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* **2001**;98:49–56.

Venkatesan, “Preliminary phase I results from an HIV vaccine candidate trial,” *The Lancet Microbe*, vol. 2, no. 3, Mar. **2021**, doi: 10.1016/S2666-5247(21)00042-2.

Venkatesan S, Gershowitz A, Moss B. Modification of the 5' end of mRNA. Association of RNA triphosphatase with the RNA guanylyltransferase-RNA (guanine-7-methyltransferase complex from vaccinia virus. *J Biol Chem* **1980**; 255:903-8; PMID:6243301

Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S.C.; Dewitte, H. Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today* **2019**, *28*, 100766.

Vesikari T, Rotavirus vaccination: a concise review, *Clin. Microbiol. Infect.* **18** (Oct. **2012**)

Vik-Mo EO, Nyakas M, Mikkelsen BV, Moe MC, Due-Tønnesen P, Suso EM, et al. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* **2013** *62*(9):1499–509. doi: 10.1007/s00262-013-1453-3.

Vishweshwaraiah YL and Dokholyan NV (2022) mRNA vaccines for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**:1029069.



Wayment-Steele HK, Kladwang W, Watkins AM, *et al.* Deep learning models for predicting RNA degradation via dual crowdsourcing. *Nat Mach Intell* **2022**.

Wang Xudong, Xian Zhao, Youxiu Zhong, Jiuheng Shen, and Wenlin An. Biomimetic Exosomes: A New Generation of Drug Delivery System. *Front Bioeng Biotechnol.* **2022**

Weng Y, Li C, Yang T, Hu Bo, Zhang M, Guo S, *et al.* The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol Adv* **2020**;40:107534.

Weide, B.; Pascolo, S.; Scheel, B.; Derhovanessian, E.; Pflugfelder, A.; Eigentler, T.K.; Pawelec, G.; Hoerr, I.; Rammensee, H.-G.; Garbe, C. Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. *J. Immunother.* **2009**, *32*, 498–507.

Wolff, J.; Malone, R.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **1990**, *247*, 1465–1468.

Wollner, C. J. & Richner, J. M. mRNA vaccines against flaviviruses. *Vaccines* **9**, 1–13 (2021).

Wu, K. *et al.* Preliminary analysis of safety and immunogenicity of a SARS-CoV-2 variant vaccine booster. *medRxiv* . **2021**

Xie, N.; Shen, G.; Gao, W.; Huang, Z.; Huang, C.; Fu, L. Neoantigens: Promising targets for cancer therapy. *Signal Transduct. Target Ther.* **2023**, *8*, 9.

Xu, S.; Yang, K.; Li, R.; Zhang, L. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**,

Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, *et al.* A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol.* 2016;34:334–8

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am J Med Sci* (2007) 334(2):115–24

Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol.* 2014;32:551–3

Yin Y, Li X, Ma H, Zhang J, Yu D, Zhao R, *et al.* Transforming RNA Nanovaccines From Polyethylenimine Functionalized Graphene Oxide Hydrogel for Durable Cancer Immunotherapy. *Nano Lett* (2021) 21 (5):2224–31.

Yu, A. M., Jian, C., Yu, A. H., & Tu, M. J. (2019). RNA therapy: Are we using the right molecules? *Pharmacology & Therapeutics* 196, 91–104.

Yu, A. M., Batra, N., Tu, M. J., & Sweeney, C. (2020a). Novel approaches for efficient in vivo fermentation production of noncoding RNAs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, 1927–1937.

Yu, A. M., Choi, Y. H., & Tu, M. J. (2020b). RNA drugs and RNA targets for small molecules: Principles, Progress, and challenges. *Pharmacological Reviews* 72, 862–898.

Zainal Abidin, N., Haq, I. J., Gardner, A. I. & Brodlie, M. Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin. Pharmacother.* 18, 1363–1371 (2017).

Zangi L., K.O. Lui, A. von Gise, Q. Ma, W. Ebina, L.M. Ptaszek, D. Spater, H.S. Xu, M. Tabebordbar, R. Gorbatov, B. Sena, M. Nahrendorf, D.M. Briscoe, R.A. Li, A.J. Wagers, D.J. Rossi, W.T. Pu, K.R. Chien, Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction, *Nat. Biotechnol.* 31 (10) (2013) 898.

Zeng C, Zhang C, Walker PG, Dong Y. Formulation and delivery technologies for mRNA vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2020; **2**: 1–40.

Zeng, C. *et al.* Leveraging mRNA sequences and nanoparticles to deliver SARS-CoV-2 antigens in vivo. *Adv. Mater.* 32, 2004452 (2020).

Zhang JY, Chan EKL, Peng XX, Tan EM. A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Med* **1999**;189:1101–1110

Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front Immunol.* **2019**;10:594

Zhang M, J. Sun, M. Li, X. Jin, Modified mRNA-LNP Vaccines Confer Protection against Experimental DENV-2 Infection in Mice, *Mol. Therapy-Methods Clin. Dev.* 18 (2020) 702–712.



Zhang He, Liang Zhang, Ang Lin, Congcong, Ziyu L, Kaibo Liu, Boxiang Liu, Xiaopin Ma, Fanfan Zhao, Huiling Jiang, Chunxiu Chen, Haifa Shen, Hangwen Li, David H. Matheww, Yujian Zhang, Liang Huang. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *Nature* (2023)

Zhong,R.;Talebian,S.;Mendes,B.B.;Wallace,G.;Langer,R.;Conde,J.;Shi,J.Hydrogels for RNA Delivery. *Nat. Mater.* **2023**, 22,818–831