

mRNA cjepiva

Lipovčić, Adriana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:643047>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Adriana Lipovčić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

mRNA cjepiva

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

20. kolovoza 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

28. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

SAŽETAK.....	VII
1 UVOD.....	1
1.1. Cjepiva	1
1.1.1. Što je cjepivo	3
1.1.2. Vrste cjepiva.....	3
1.1.3. Nove tehnologije	5
1.2. Ribonukleinska kiselina.....	6
2. PRIKAZ ODABRANE TEME	7
2.1. Odgovor organizma na antigen.....	7
2.2. Farmakologija mRNA	8
2.3. Optimizacija stabilnosti i translacije mRNA	10
2.3.1. 5' Kapa	11
2.3.2. Poliadenilni rep.....	12
2.3.3. 5' i 3' netranslatirane regije (UTR-ovi).....	13
2.3.4. Kodirajuća sekvenca	13
2.4. Imunostimulatorna aktivnost IVT mRNA i moduliranje imunogenosti.....	15
2.5. Doprema mRNA cjepiva u stanicu	18
2.5.1. Ex vivo transfekcija dendritičkih stanica	20
2.5.2. Injektiranje ogoljene mRNA in vivo	20
2.5.3. Kompleksiranje s protaminom	21
2.5.4. Doprema na bazi kationskih lipida i polimera.....	21
2.6. mRNA kao cjepivo za infektivne bolesti	23
2.6.1. Samoreplicirajuća mRNA cjepiva	24
2.6.2. mRNA cjepiva u obliku transfektiranih dendritičkih stanica	25
2.6.3. Direktno injektiranje nereplicirajućih mRNA cjepiva	25
2.7. Pandemija SARS – CoV – 2	28
3. LITERATURNI IZVORI.....	XXXII

Sažetak

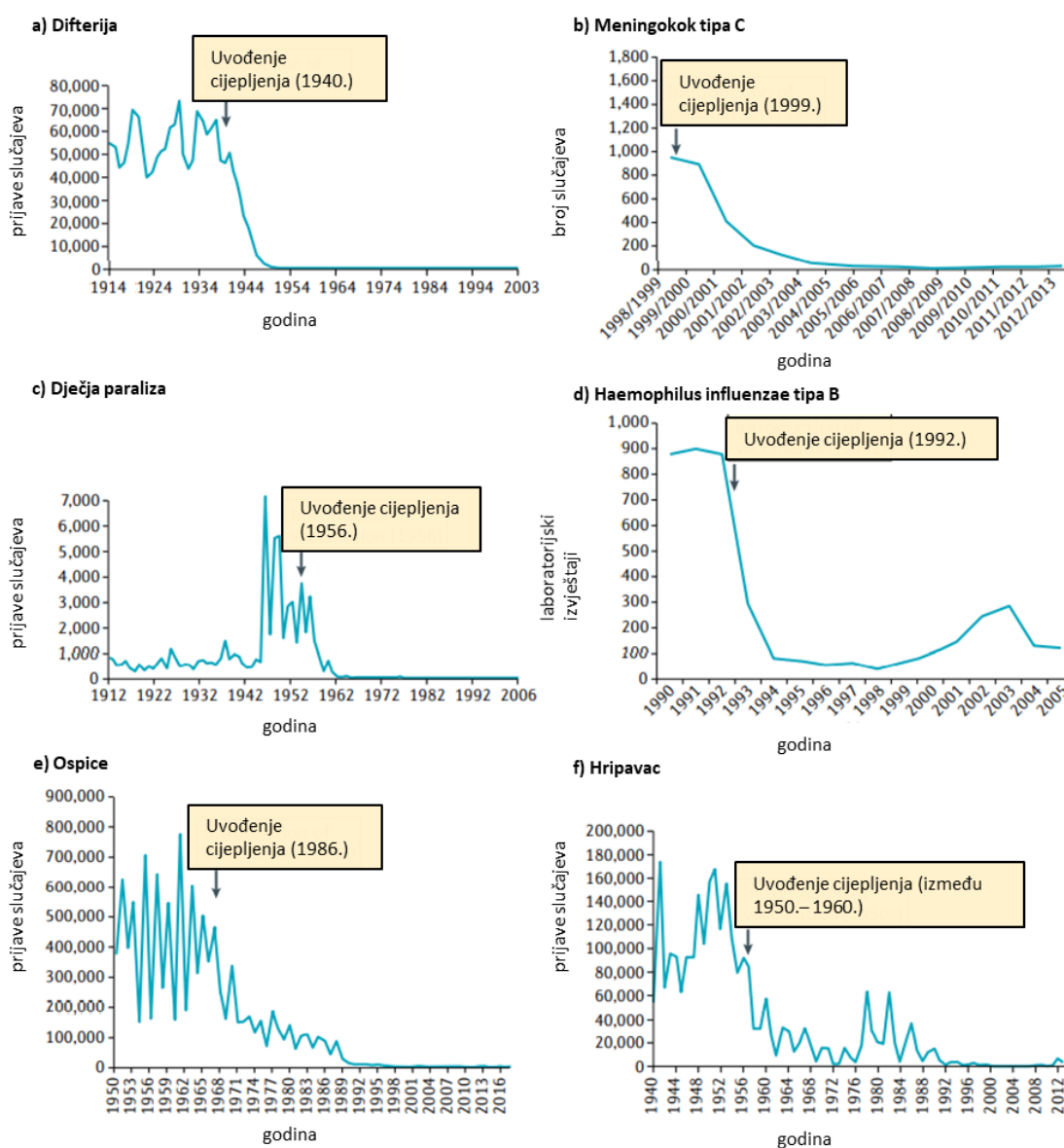
Već se desetljećima razvija tehnologija mRNA sintetizirane *in vitro* transkripcijom, te se proučava njen potencijal u prijenosu genetičke informacije, ekspresiji proteina u organizmu koji su kodirani upravo mRNA transkribiranoj *in vitro*, izazivanju imunoloških odgovora i imunoterapiji. Posljedično tome mRNA transkribirana *in vitro* pronašla je svoju potencijalnu primjenu u cjepivima protiv zaraznih bolesti, imunoterapiji za oboljele od karcinoma, terapijama za nadomjestak proteina, terapiji za ublažavanje alergija, reprogramiranju stanične sudbine, uređivanju genoma sa nuklezama koje su kodirane s mRNA dobivenom *in vitro* transkripcijom i mnogim drugim. Trenutna globalna pandemija SARS-CoV-2 koja je zaustavila svijet, zahtijevala je brzu i promptnu reakciju te su zahvaljujući tome iskorištena sva prethodna istraživanja i saznanja o mRNA sintetiziranoj *in vitro* transkripcijom, čiji je pun potencijal iskorišten u pravo vrijeme. Upravo je cjepivo na bazi mRNA prvo koje je dizajnirano i prvo koje je primijenjeno na ljudima kao odgovor na pandemiju.

1 UVOD

1.1. Cjepiva

Cjepiva su jedan od najznačajnijih izuma današnjice te izum koji spašava najviše života u povijesti medicine. Temeljna ideja cijepljenja je unos oslabljenog ili inaktiviranog patogena u organizam koji tom prilikom ne podliježe zarazi niti bolesti, ali pokreće imunološki odgovor. Pokretanjem imunog odgovora stječu se memorijske imunostane stanice koje pokreću efikasnu obranu organizma ukoliko se on ponovno susretne s istim patogenom.

Od početka utemeljenja i koordiniranja nacionalnih programa imunizacije (60-tih godina prošlog stoljeća), cjepiva su potpuno transformirala javno zdravstvo. U državama s programima visoke procijepljenosti, mnoge bolesti koje su prethodno bile odgovorne za većinu smrtnih slučajeva kod djece, potpuno su iskorijenjene (slika 1).^{1,2} Prema procjenama svjetske zdravstvene organizacije, dva do tri milijuna života su spašeni svake godine zahvaljujući trenutnim programima imunizacije. Cjepiva također pridonose značajnom smanjenju smrtnosti djece mlađe od 5 godina u svijetu sa 93 smrti na 1 000 rođenih (1990.). na 39 smrti na 1 000 rođene djece u 2018. godini.^{1,3} Cjepiva iskorištavaju izvanrednu sposobnost visoko razvijenog ljudskog imunog sustava da reagira i pamti susrete s antigenima patogena.¹



Slika 1. Utjecaj cijepljenja na odabrane bolesti u Ujedinjenom Kraljevstvu. Uvođenje cijepljenja protiv zaraznih bolesti dovelo je do značajnog smanjenja u njihovoj učestalosti (a-f). Povećanje izvješća o slučajevima *H. influenzae* tipa B (d) 2001. godine dovelo do kampanje za cijepljenje, nakon čega se incidencija smanjila. Za hripavac (f), pad procijepljenosti doveo je do povećanja slučajeva kasnih 1970-ih i 1980-ih, ali se zatim učestalost bolesti ponovno smanjila nakon što se povećala procijepljenost. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema A. J. Pollard *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, **21** (2021) 83-100.

1.1.1. Što je cjepivo






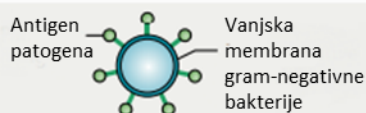

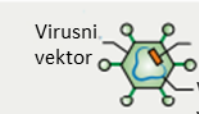


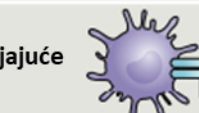
Cjepivo je biološki preparat koji se koristi za sigurnu indukciju imunskog odgovora koji pruža zaštitu protiv zaraze i bolesti nakon sljedećeg izlaganja organizma patogenu. Da bi se imunski odgovor postigao, cjepivo mora sadržavati antigene koji su izvedeni iz patogena ili sintetički proizvedeni kako bi predstavljali komponente patogena. Esencijalna komponenta većine cjepiva je jedan ili više proteinskih antigena koji induciraju imunološke odgovore u svrhu pružanja zaštite organizma. Međutim, polisaharidni antigeni također mogu izazvati zaštitne imunološke odgovore i osnova su cjepiva koja su razvijena za sprječavanje bakterijskih infekcija, poput upale pluća i meningitisa uzrokovanih bakterijom *Streptococcus pneumoniae*.^{1,4} Zaštita koju cjepivo pruža mjeri se u kliničkim ispitivanjima koja povezuju imunološke odgovore na antigen cjepiva sa završnim kliničkim točkama (kao što je prevencija infekcije, smanjenje težine bolesti ili smanjena stopa hospitalizacije). Pronalaženje imunskog odgovora koji korelira sa zaštitom organizma može ubrzati razvoj i dostupnost novih cjepiva.^{1,5}

1.1.2. Vrste cjepiva

Cjepiva su općenito klasificirana kao živa ili neživa (ponekad ih se naziva i inaktivirana) kako bi se razlikovala ona cjepiva koja sadrže oslabljene replicirajuće sojeve relevantnog patogenog organizma od onih koja sadrže samo komponente patogena ili usmrćene cijele organizme (slika 2). Oslabljeni (atenuirani) patogeni sojevi se očituju u redukciji virulentnosti bilo kroz namjerne ili prirodne promjene u genima za virulenciju. Uz tradicionalna živa i neživa cjepiva, u posljednjih nekoliko desetljeća razvijeno je nekoliko drugih platformi, uključujući virusne vektore, cjepiva na bazi nukleinskih kiselina RNA i DNA i čestica nalik virusu sadržanih u cjepivu. Cjepiva sa česticama nalik virusu sadrže čestice građene od proteina virusa koji strukturno oponašaju izvorni virus, ali im nedostaje virusni genom te zbog nedostatka genetskog materijala nisu infektivne.

Razlika između živih i neživih cjepiva je važna. Živa cjepiva imaju potencijal za nekontroliranu replikaciju kod imunokompromitiranih osoba (djeca s primarnim imunodeficijencijama, osobe s HIV infekcijom ili pojedinci koji primaju imunosupresivne lijekove i terapiju), što dovodi do nekih ograničenja u njihovoj uporabi.^{1,6} Za razliku od živih cjepiva, neživa cjepiva ne predstavljaju rizik za imunokompromitirane osobe, iako možda neće pružiti zaštitu onima s deficijencijom B-limfocita ili kombiniranom imunodeficijencijom.

Neživa cjepiva često se kombiniraju s adjuvansima kako bi se poboljšala njihova sposobnost izazivanja imunološkog odgovora (imunogenost). Adjuvans je agens odnosno pomoćna tvar korištena u cjepivima kako bi poboljšala imunski odgovor organizma na antigen.¹

Vrsta cjepiva		Licencirana cjepiva koja koriste tehnologiju	Početak primjene
Živa atenuirana (oslabljena ili inaktivirana)		Ospice, zaušnjaci, rubeola, žuta groznica, gripa, dječja paraliza, tifus, rotavirus, BCG, varicella zoster	1798. (boginje)
Mrtvi cijeli organizmi		Hripavac (cijela stanica), dječja paraliza, gripa, Japanski encefalitis, hepatitis A, bjesnoća	1896. (tifus)
Anatoksin (toksoid)		Difterija, tetanus	1923. (difterija)
Podjedinična cjepiva (pročišćeni protein, rekombinantni protein, polisaharid, peptid)		Hripavac, gripa, hepatitis B, meningokok, pneumokok, tifus, hepatitis A	1970. (antraks)
Čestice nalik virusu		Humani papilomavirus	1986. (hepatitis B)
Vezikul vanjske membrane		Meningokok tipa B	1987. (meningokok tipa B)
Protein-polisaharid konjugat		<i>Haemophilus influenzae</i> tip B, pneumokok, meningokok, tifus	1987. (H. influenzae tipa B) z
Virusni vektor		Ebola	2019. (ebola)
Cjepiva od nukleinskih kiselina		SARS-CoV-2	2020. (SARS-CoV-2)
Bakterijsko vektorsko		Eksperimentalno	–
Antigen-predstavljajuće stanice		Eksperimentalno	–

Slika 2. Shematski prikaz različitih vrsta cjepiva protiv određenih patogena. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema A. J. Pollard *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, **21** (2021) 83-

1.1.3. Nove tehnologije

Zahvaljujući potrebi za širim imunološkim odgovorom na cjepivo, bržom reakcijom na nove patogene i epidemijske situacije te potrebe za bržim i masovnijim razvojem cjepiva, razvijene su nove platforme cjepiva. Tradicionalno je za razvoj cjepiva bilo potrebno i više od 10 godina, ali pandemija COVIDA–19 je pokazala nužnost i hitnost za razvojem cjepiva koje je fleksibilno te omogućuje brzi razvoj, proizvodnju i mogućnost unaprjeđenja.^{1,7}

Cjepiva nove generacije obuhvaćaju virusna vektorska cjepiva, te cjepiva na bazi nukleinskih kiselina. Dok klasična cjepiva koja sadrže cijele organizme patogena zahtijevaju uzgoj patogena, virusna vektorska cjepiva i cjepiva na bazi nukleinskih kiselina mogu biti konstruirana koristeći samo genetsku sekvencu patogena, čime se značajno povećava brzina razvoja i proizvodnih procesa cjepiva.^{1,8}

Virusna vektorska cjepiva temelje se na rekombinantnom virusu (koji se može replicirati ili ne), u kojem je genom izmijenjen kako bi se omogućila ekspresija ciljanog antigena patogena. Izlaganje antigena patogena u kombinaciji s podražajima virusnog vektora koji oponaša prirodnu infekciju dovodi do indukcije snažnih humoralnih i staničnih imunskih odgovora bez potrebe za pomoćnim tvarima odnosno adjuvansima. Potencijalno najveća manjkavost virusnih vektorskih cjepiva je prisutnost već postojećega imuniteta kad se koristi vektor kao što je ljudski adenovirus, koji često uzrokuje infekcije kod ljudi. Na sreću, taj problem se može prevladati korištenjem vektora kao što je adenovirus viših primata odnosno majmuna, protiv kojeg gotovo da i ne postoji stečeni imunitet kod ljudi.^{1,9}

Cjepiva bazirana na nukleinskim kiselinama sastoje se od DNA ili RNA koje kodiraju ciljani antigen, što potencijalno omogućuje indukciju humoralnog i staničnog imunskog odgovora kad primatelj cjepiva eksprimira kodirane antigene nakon unosa nukleinskih kiselina u stanice. Velika prednost ovakvog tipa cjepiva je u tome što su vrlo višenamjenska te imaju sposobnost brze i jednostavne prilagodbe proizvodnje u slučaju nastanka novog patogena. Tim benefitima svjedočimo i u primjeru trenutne pandemije SARS–CoV–2 gdje su mRNA cjepiva podvrgnuta kliničkim testiranjima samo 2 mjeseca nakon što je identificirana genetička sekvenca virusa te su prva licencirana cjepiva u borbi protiv pandemije.^{1,10,11} Jedan od nedostataka mRNA cjepiva je to što mRNA molekule moraju biti dopremljene direktno u stanice, što zahtjeva posebne uređaje za injektiranje, elektroporaciju ili molekule nosače, a sa sobom nose rizik niske stope transfekcije i ograničene imunogenosti.^{1,12} Nadalje, primjena RNA cjepiva bila je ograničena

nedostatkom stabilnosti molekule RNA i potrebe za lancem hlađenja, međutim napori da se ova ograničenja prevladaju su se u posljednje vrijeme isplatili.^{1,13,14}

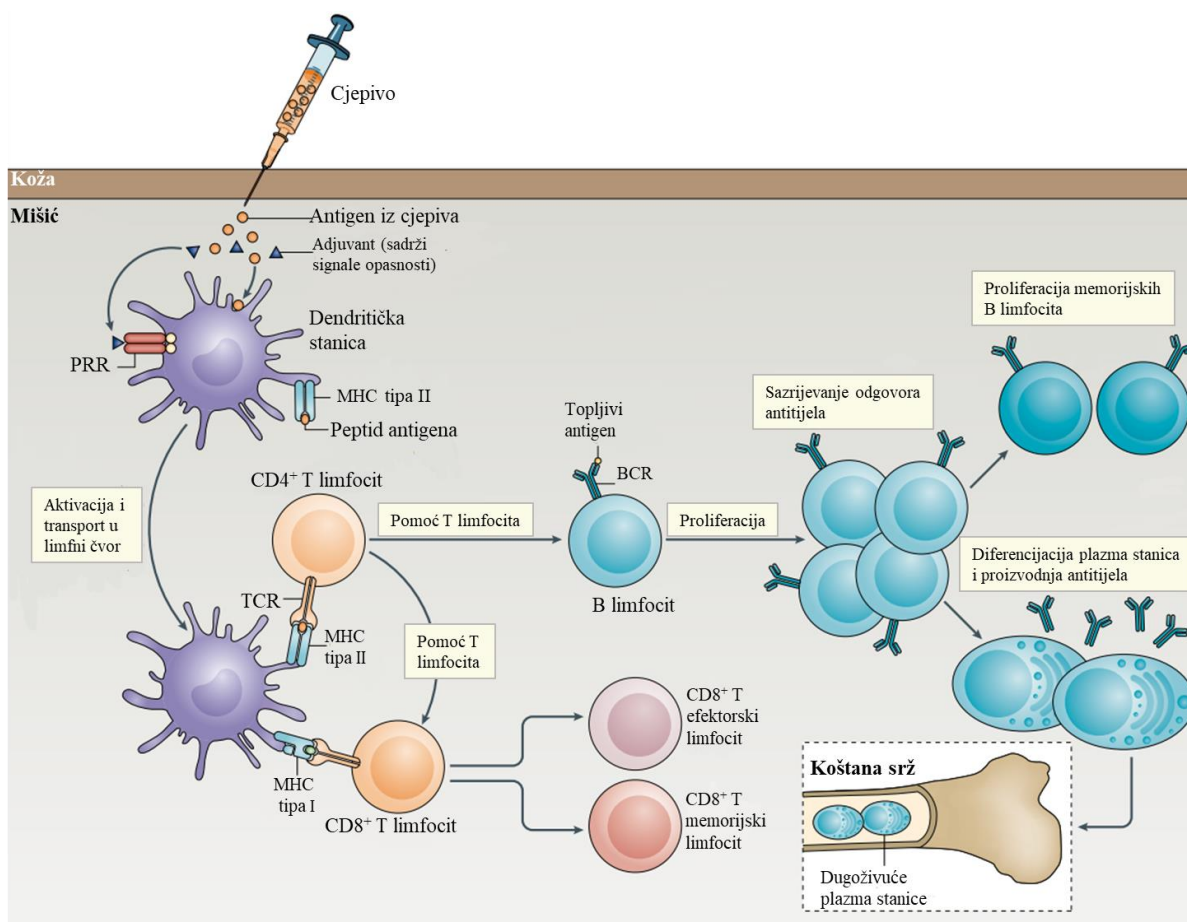
1.2. Ribonukleinska kiselina

Ribonukleinska kiselina (RNA) je iznimno važna biološka makromolekula, nosioc brojnih funkcija u osnovnim i evolucijski očuvanim staničnim procesima. Polimer je ribonukleotida – podjedinica sastavljenih od šećera riboze, 1' vezane dušične baze (adenin, gvanin, citozin i uracil) te fosfatnih skupina koji povezuju ribonukleotide na 3' i 5' položajima riboze i čine fosfodietersku okosnicu. Zbog slobodne 2' OH skupine i često neuređene strukture RNA je relativno nestabilna i podložna hidrolizi *in vivo* jer za razliku od DNA nije sputana prijenosom genetičke informacije na sljedeću generaciju te posljedično tome ima svestrane uloge u stanici. Svakako najvažnija uloga joj je prijenos genetičke informacije s genetskog zapisa u obliku DNA u jezgri do ribosoma odnosno mjesta translacije, to jest biosinteze proteina u citoplazmi. RNA se sintetizira u staničnoj jezgri enzimom RNA-polimerazom u procesu zvanom transkripcija gdje se koristi jedan lanac DNA kao kalup za transkripciju te nastaje njemu komplementarna RNA molekula. Novonastala RNA molekula se nakon transkripcije dorađuje i enzimatski modificira te joj se najčešće dodaje poliadenilni rep na 3' kraju i metilgvanozinska kapa na 5' kraju (eukarioti). Glasnička RNA (mRNA) služi kao posrednik između DNA i proteina, kodirana je tako da svaka njena 3 uzastopna nukleotida odgovaraju jednoj aminokiselini budućeg proteina. mRNA se prevodi u protein u procesu zvanom translacija, a svaki njen kodon prepoznaje prijenosna RNA (tRNA) koja zatim donosi ispravnu aminokiselinu na mjesto sinteze proteina u ribosomu. Ribosom je pretežito građen od rRNA te se u njemu očituje i katalitička uloga RNA molekula – rRNA između ostalog katalizira i stvaranje peptidne veze novonastalog proteina.

2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Odgovor organizma na antigen

Adaptivni imunitet se uspostavlja kontaktom s antigenom patogena koji izaziva zarazu ili cijepljenjem te tijelo proizvodi antitijela, a odgovor organizma u obliku antitijela se naziva humoralni imunitet. Adaptivni imunostni odgovor posredovan je humoralnim imunitetom koji se ponajviše očituje u B-limfocitima koji proizvode antitijela za određeni antigen te staničnim imunitetom koji je posredovan citotoksičnim T-limfocitima. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da antitijela poduprta T-limfocitima pomagačima (CD4+) imaju glavnu ulogu u prevenciji infekcije, dok su citotoksični T-limfociti (CD8+) nužni za kontrolu i uklanjanje potvrđene reakcije.¹



Slika 3. Imunosni odgovor nakon imunizacije sa konvencionalnim proteinskim antigenom.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema A. J. Pollard, *et al*, *Nature Reviews Immunology*,

21 (2021) 83-100.

Cjepivo se injektira u mišić (Slika 3), a proteinski antigen preuzimaju dendritične stanice (antigen-prezentirajuće stanice), koje se aktiviraju putem receptora za prepoznavanje uzoraka (PRR–*pattern recognition receptors*) signalima opasnosti u adjuvansu, a zatim se transportiraju u limfni čvor. Glavni kompleks histokompatibilnosti (MHC–*Major histocompatibility complex*) izlaže peptide antigena iz cjepiva na površini dendritične stanice što aktivira T-limfocite kroz njihov receptor (TCR–*T cell receptor*). T-limfociti potiču razvoj B-limfocita u limfnom čvoru u kombinaciji sa signalizacijom (od strane topljivog antigena) kroz receptor B-limfocita (BCR–*B cell receptor*). Razvoj B-limfocita ovisan o T-limfocitima rezultira sazrijevanjem odgovora antitijela kako bi se povećao afinitet antitijela i inducirali različiti izotipovi antitijela. Stvaranje kratkoživućih plazma-stanica, koje aktivno luče antitijela specifična za protein iz cjepiva, dovodi do brzog porasta razine antitijela u krvnom serumu u sljedeća 2 tjedna. Također se proizvode memorijski B-limfociti koji su posrednici imunskog pamćenja. Dugoživuće plazma stanice koje mogu nastaviti stvarati antitijela desetljećima, putuju u niše koštane srži. CD8+ memorijski T-limfociti mogu se brzo umnožavati kada naiđu na patogen, a CD8+ efektorski T-limfociti uklanjaju zaražene stanice.¹

2.2. Farmakologija mRNA

Temeljni koncept korištenja mRNA transkribirane *in vitro* (IVT–*in vitro transcribed*) kao vrste terapijke je u prijenosu definirane genetičke informacije u stanice pacijenta bilo u svrhu prevencije ili promjene stanja određene bolesti.¹⁵

Proučavana su dva načina primjene IVT mRNA. Prvi je prijenos mRNA u stanice pacijenta *ex vivo*, nakon čega pacijent natrag usvaja transfektirane stanice te se ova metoda koristi kod inženjeringa genoma, genetskog reprogramiranja, imunoterapija za tretiranje karcinoma i zaraznih bolesti (baziranih na T leukocitima i dendritičkoj stanici) i nekim od postupaka proteinske nadoknade. Drugi princip, direktno injektiranje IVT mRNA u pacijenta te doprema do stanica, koristi se za prevenciju infektivnih bolesti, u onkologiji i u tolerizacijskim režimima za liječenje alergija.¹⁵

Transfektirane stanice koriste se za *in vivo* translaciju određene genetičke poruke u odgovarajući protein, koji je farmakološki aktivan produkt. IVT mRNA dizajnirana je tako da bude nalik potpuno procesiranim zrelim molekulama mRNA koje prirodno nastaju u citoplazmi eukariotskih stanica.¹⁴ IVT mRNA je jednolančana, posjeduje 5' kapu i 3' poliadenilni rep. Otvoreni okvir za čitanje (ORF–*open reading frame*) koji kodira protein od interesa definiran

je i omeđen start i stop kodonom, a uz njega su sa svake strane netranslatirajuće regije (UTR-*untranslated regions*).¹⁵

mRNA se sintetizira iz DNA kalupa kao što je linearni plazmid ili PCR (polymerase chain reaction) produkt u sustavu za koji nije potrebna cijela stanica. Transkripciju provodi RNA-polimeraza iz faga T7, T3 ili Sp6 u prisutstvu nukleotida, nakon čega se 5' kapa dodaje enzimatski jer DNA kalup kodira sve strukturne elemente funkcionalne IVT mRNA osim 5' kape. Završno sa sintezom mRNA, DNA kalup razgrađuju enzimi za razgradnju DNA (DNaze) te se mRNA pročišćava metodama za izoliranje nukleinskih kiselina.^{14,15,16}

Citoplazma stanice je primarni stanični odjeljak odgovoran za farmakodinamičku aktivnost mRNA. Za razliku od mRNA koja prirodno nastaje u stanici i u citoplazmu mora ući iz jezgre, IVT mRNA se unosi u stanicu iz ekstracelularnog prostora. Dva su ključna čimbenika koji utječu na citoplazmatsku bioraspoloživost IVT mRNA, neovisno o tome je li IVT mRNA stanicama dopremljena u organizmu *in vivo* ili *ex vivo* transfekcijom izvan organizma. Prvi je razgradnja vrlo aktivnim sveprisutnim RNazama (enzimi za razgradnju RNA) kojih ima u izobilju u ekstracelularnom prostoru te ogoljena mRNA vrlo brzo podliježe njihovoj razgradnji. Drugi je stanična membrana koja onemogućuje pasivnu difuziju velike negativno nabijene molekule mRNA u citoplazmu. U načelu, eukariotske stanice sposobne su aktivno zahvatiti голу mRNA, ali u većini stanica različite vrste brzina apsorpcije i citoplazmatski prijenos su minimalni (manje od 1 na 10 000 molekula početnog unosa mRNA). Formulacijom IVT mRNA s kompleksnim agensima koji štite mRNA od razgradnje RNazama u ekstracelularnom prostoru te olakšavaju njen unos u stanicu, može se poboljšati transfekcija stanica kao i stanična apsorpcija. U *ex vivo* dopremi mRNA u stanice za efikasnost procesa može se koristiti elektroporacija u puferu u odsutnosti RNaza.¹⁵ Elektroporacija je mikrobiološka tehnika u kojoj se na stanice primjenjuje električno polje kako bi se povećala propusnost stanične membrane za tvari iz ekstracelularnog prostora. Jednom kad je IVT mRNA prevladala staničnu barijeru i ušla u citoplazmu, za nju vrijede ista biološka i biokemijska pravila posredovana istim kompleksnim staničnim mehanizmima koji reguliraju stabilnost i translaciju, kao i za prirodnu mRNA sintetiziranu u staničnoj jezgri.^{14,15}

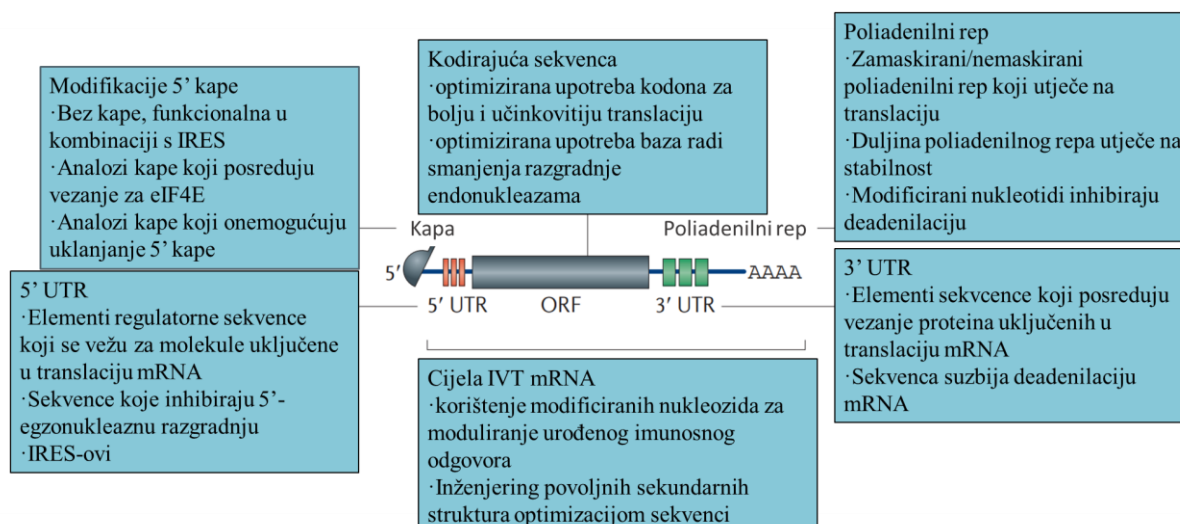
mRNA je u citoplazmi podvrgnuta staničnoj translacijskoj mašineriji te se proizvodi protein koji prolazi kroz post-translacijske modifikacije, što rezultira pravilno smotanim, potpuno funkcionalnim, bioaktivnim proteinom. Vrijeme poluživota IVT mRNA kalupa i proteinskog produkta ključne su odrednice za farmakokinetiku lijekova na bazi mRNA. Nakon generiranja

kodiranog proteina, njegovo daljnje odredište određuju signalni peptidi koji mogu biti svojstveni prirodnoj proteinskoj sekvenci ili dizajnirani za usmjeravanje proteina u željeni stanični odjeljak unutar stanice domaćina. Protein se također može izlučiti kako bi djelovao na susjedne stanice, a ako se izluči u krvotok može djelovati na udaljene organe. mRNA transkribirana *in vitro*, se u konačnici razgrađuje u fiziološkim procesima, smanjujući rizik metaboličke toksičnosti.^{14,15}

Za imunoterapijske pristupe, procesi obrade kodiranog proteina ključni su za određivanje njegove farmakodinamike. Proteini kodirani IVT mRNA, kao i endogeno generirani proteini, razgrađuju se u proteasomima i prezentiraju na molekulama glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC–*Major histocompatibility complex*) klase I do citotoksičnih CD8+ T-limfocita. U pravilu unutarstanični proteini ne dosežu put obrade MHC klase II u svrhu induciranja CD4+ T-limfocita pomagača. Međutim, uvođenjem sekrecijskog signala u sekvencu koja kodira antigen, može se postići odgovor T-limfocita pomagača, jer signal za sekreciju preusmjerava proteinski antigen u izvanstanični prostor.¹⁵

2.3. Optimizacija stabilnosti i translacije mRNA

Količina IVT mRNA potrebne za terapijski učinak i trajanje liječenja ovisi o mnogo faktora, uključujući predviđenu biološku funkciju kodiranog proteina, njegov način djelovanja, kao i jačinu te vrijeme poluživota, koji će se razlikovati za nekoliko redova veličine za različite primjene mRNA terapeutika. Za učinkovitu indukciju imunskog odgovora kod ljudi dovoljan je nanogram do mikrogram visoko antigenih proteina. Nasuprot tome, za dopremu sistemski aktivnih faktora rasta, hormona ili monoklonskih antitijela potreban je miligram ili čak gram proteina. Iterativnom optimizacijom translacijske moći i unutarstanične stabilnosti IVT mRNA, količine proteina koje se mogu generirati po jedinici mRNA znatno su povećane. Kako bi se sustavno poboljšala unutarstanična stabilnost i učinkovitost translacije, uloženi su znatni naponi za modificiranje strukturnih elemenata IVT mRNA osobito 5' kape, 5' i 3' UTR-a, kodirajuće regije i poliadenilnog repa (slika 4). Poboljšanja uzrokovana modifikacijama dovela su do proizvodnje značajnih razina kodiranog proteina u duljem vremenskom periodu, u rasponu od nekoliko minuta do dulje od jednog tjedna.^{15,17,18,19}



Slika 4. Ključni elementi (IVT) mRNA transkribirane *in vitro* i strategije za njihovu modifikaciju. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema U. Sahin, *et al*, *Nature reviews Drug discovery*, **13**, (2014) 759-780.

2.3.1. 5' Kapa

Robusna translacija mRNA zahtjeva funkcionalnu strukturu 5' kape te je ona nužna za efikasnu sintezu proteina iz mRNA. mRNA koja prirodno nastaje u stanici posjeduje 7-metilgvanozinsku kapu (m^7G) povezanu pomoću 5'-5'-trifosfatnog mosta (ppp) (struktura m^7GpppN) s mRNA tijekom procesa transkripcije. Vezanje 5'-kape na eukariotski faktor inicijacije translacije 4E (EIF4E) ključno je za učinkovitost translacije, dok njeno vezanje na enzime za dekapiranje (enzimi za uklanjanje kape sa mRNA) mRNA DCP1, DCP2 ili DCPS regulira raspad mRNA.^{15,20} Različite verzije 5'-kape mogu se dodati tijekom ili nakon transkripcije pomoću „Vaccinia virus Capping Enzyme“, inkorporirajući sintetičku kapu ili anti-reverznom analogima kape s obzirom na okvir čitanja.¹⁴ Prvi pristup dodavanja kape na IVT mRNA je izvođenje drugog koraka nakon inicijalne sinteze, s rekombinantnim „Vaccinia virus Capping Enzyme“. ^{15,21} Dobivena struktura kape identična eukariotskoj strukturi kape koja se najčešće pojavljuje u prirodi. Drugi pristup koji se češće koristi je dodavanje sintetičkog analoga kape u *in vitro* reakciji transkripcije te izvođenje dodavanja kape i *in vitro* transkripcije u jednom koraku. Međutim, glavno ograničenje ovog pristupa je to što se analog kape i GTP nukleotid potrebni za *in vitro* transkripciju natječu, što rezultira time da nekolicina mRNA ostane bez kape i translacijski neaktivna.¹⁵

Rana istraživanja mRNA provedena su s IVT mRNA generiranom s m⁷GpppG analogom kape, a većina kliničkih ispitivanja koja su u tijeku još uvijek koriste ovu vrstu mRNA.^{15,22,23} Međutim, značajan dio analoga m⁷GpppG inkorporiran je u reverznoj orijentaciji u mRNA te je stoga neprepoznat u translaciji, što rezultira nižom translacijskom aktivnošću. Sukladno tome uvedeni su takozvani anti-reverzni analozi kape (ARCAs; m₂^{7,3'}-^OGpppG). mRNA s ARCA kapom pokazale su superiornu translacijsku učinkovitost u različitim tipovima stanica.^{15,24,25,26} Naknadno je razvijena analogna kapa ARCA koji sadrži fosforotioat te ona omogućuje otpornost na dekapiranje mRNA pomoću DCP2, čime se dodatno produljuje vrijeme poluživota mRNA.^{15,27,28} Pokusi na miševima pokazali su da IVT mRNA koja sadrži kapu modificiranu fosforotioatima inducira snažne imunološke odgovore na kodirani protein, a odgovori su bili jači od onih induciranih mRNA s kontrolnom kapom.^{15,29} Utjecaj analoga kape na translaciju i stabilnost IVT mRNA ovisi o vrsti stanice i stanju stanične diferencijacije.^{15,27}

2.3.2. Poliadenilni rep

Poliadenilni rep također igra važnu regulatornu ulogu u translaciji i stabilnosti mRNA; te se na mRNA mora dodati optimalna duljina poliadenilnog repa bilo izravno iz kodirajućeg DNA-kalupa ili pomoću poliadenilat-polimeraze.¹⁴ Poliadenilni rep regulira stabilnost i translacijsku učinkovitost mRNA u sinergiji s 5' kapom, unutarnjim ribosomskim mjestom ulaza i raznim drugim odrednicama.^{15,30} Na IVT mRNA rep se dodaje kodiranjem poliadenilnog dijela u kalupu vektora iz kojeg se transkribira ili reakcijom u dva koraka u kojoj se IVT mRNA produljuje enzimatski koristeći rekombinantnu poliadenilat-polimerazu. Rekombinantna poliadenilat-polimeraza omogućuje ugradnju modificiranih nukleotida u poliadenilni rep kako bi se spriječila deadenilacija nukleazama specifičnim za poliadenilni rep.^{15,31} Također, istraživana je pristup i s različitim analogima adenzina kao što je kordicepin (3'-deoksiadenozin), međutim on nije povećao vrijeme poluživota mRNA. Razlog u neučinkovitost kordicepina kao analoga vjerojatno leži u tome što je on terminator lanca i stoga se ugrađuje samo na krajnjoj 3' poziciji.^{15,32,33}

Ograničenje enzimske poliadenilacije je u tome da se svaka priprava RNA sastoji od smjese specija RNA koje variraju u duljini poliadenilnog repa. Nasuprot tome, *in vitro* transkripcija iz DNA-kalupa rezultira molekulama RNA definirane duljine poliadenilnog repa, pa je stoga poželjnija ukoliko je IVT mRNA namijenjena za kliničku upotrebu. Analize dendritičnih

stanica pokazale su da 3' kraj poliadenilnog repa ne smije biti maskiran dodatnim bazama te da je optimalna duljina poliadenilnog repa između 120 i 150 nukleotida.^{15,17,26}

2.3.3. 5' i 3' netranslatirane regije (UTR-ovi)

5' i 3' netranslatirane regije sadrže regulatorne elemente za koje je identificirano da moduliraju translaciju i stabilnost endogene mRNA, stoga je strategija za optimizaciju translacije i stabilnosti IVT mRNA u stanicama također i inkorporiranje 5'- i 3'-UTR-a. Mnoge IVT mRNA sadrže 3'-UTR-ove α - i β -globina mRNA koje sadrže nekoliko elemenata sekvence koji povećavaju stabilnost i translaciju mRNA.^{15,18,34} Stabilizacijski učinak humanih 3'-UTR sekvenci β -globina dodatno se pojačava korištenjem dva humana 3'-UTR-a β -globina raspoređena u smjeru od glave do repa.^{15,17} Nadalje, različite regije staničnih i virusnih 5'- i 3'-UTR-a povećavaju stabilnost i translacijsku učinkovitost mRNA. 3'-UTR iz mRNA eukariotskog elongacijskog faktora 1 α (EEF1A1) i 5'-UTR element prisutan u mnogim mRNA ortopoks-virusa, inhibiraju dekapiranje mRNA i 3' – 5' egzonukleolitičku degradaciju.^{15,35,36} Ponekad je poželjna i destabilizacija mRNA kako bi se ograničilo trajanje proizvodnje proteina u stanici, te se ona može postići uključivanjem elemenata bogatih adeninom i uracilom u 3'-UTR-u, čime se osigurava brza razgradnja mRNA i kratko trajanje ekspresije proteina.^{15,37}

5' i 3' netranslatirane regije prateći kodirajuću sekvencu značajno utječu na stabilnost i translaciju mRNA, što je ključno za izradu i mogućnost primjene cjepiva. Te regularne sekvence se mogu dobiti od virusnih ili eukariotskih gena te značajno povećavaju vrijeme poluživota i ekspresiju terapijskih mRNA.¹⁴

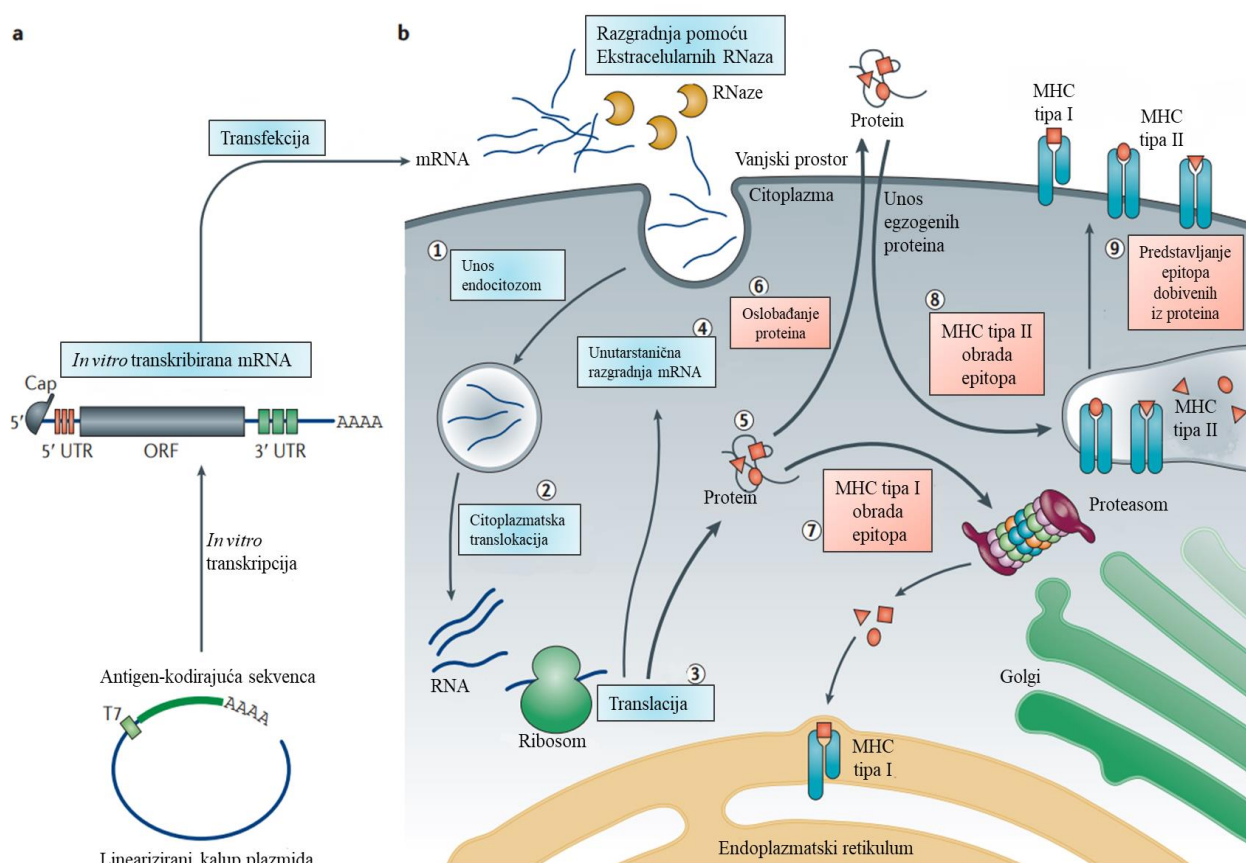
2.3.4. Kodirajuća sekvencija

Sastav kodirajuće sekvence značajno utječe na učinkovitost translacije. Zamjena rijetkih kodona s često korištenim sinonimnim kodonima, uz obilje tRNA koje ih prepoznaju u citosolu, poboljšava translacijski prinos jer ponovna upotreba iste tRNA ubrzava translaciju zahvaljujući amino-acilaciji tRNA u blizini ribosoma.^{14,15,38,39} Okolina kodona, susjedni kodoni i nukleotidi također utječu na brzinu translacijske elongacije i translacijsku učinkovitost. IVT mRNA s optimiziranim kodonima uspješno su korištene u studijama cjepiva protiv virusnih infekcija i za ekspresiju nevirusnih proteina.^{15,40}

Obogaćivanje gvanin:citozin parovima predstavlja još jedan oblik optimizacije sekvenci za koji se pokazalo da povećava razinu mRNA u stabilnom stanju *in vitro* i ekspresiju proteina *in*

vivo.^{14,41,42} Iako se ekspresija proteina može pozitivno modulirati promjenom sastava kodona ili uvođenjem modificiranih nukleozida, također je moguće da bi ovi oblici manipulacija sekvenci mogli utjecati na sekundarnu strukturu mRNA, kinetiku, točnost translacije i istodobno smatanje proteina te ekspresiju kriptičnih epitopa T stanica prisutnih u alternativnim okvirima čitanja.^{14,43,44,45} Svi ovi čimbenici mogu potencijalno utjecati na veličinu ili specifičnost imunološkog odgovora.¹⁴

Postoje valjani razlozi za suzdržavanje od uporabe optimiziranih kodona. Neki proteini zahtijevaju sporiju translaciju kako bi se stigli pravilno smotati te je sporija translacija osigurana rijetkim kodonima u mRNA sekvenci.^{15,46} Također zadržavanje izvornog otvorenog okvira čitanja može biti korisno za neka IVT mRNA cjepiva. Kad je IVT mRNA translirana u različitim okvirima čitanja zbog ribosomskog pomicanja okvira čitanja ili kada se translacija započinje interno ili sa CUG start kodonom.^{15, 47, 48} Optimizacija kodona bi trebala eliminirati ove važne izvore antigenskih peptida.



Slika 5. Načela farmakologije mRNA koja kodira antigen. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema U. Sahin, *et al*, *Nature reviews Drug discovery*, **13**, (2014) 759-780.

2.4. Imunostimulatorna aktivnost IVT mRNA i moduliranje imunogenosti

Egzogena mRNA, u svojoj je osnovi imunostimulirajuća, jer ju prepoznaju različiti urođeni imunološki receptori na površini stanica, endosomni i citosolni receptori (slika 6), što ovisno o terapijskoj primjeni mRNA može biti korisno ili štetno.^{14,49} U primjenama mRNA kao terapije za nadoknadu proteina, aktivacija urođenog imunskog sustava je veliki nedostatak. Za cijepjenje snažan imuno-stimulacijski učinak i unutarnja pomoćna aktivnost IVT mRNA su prednosti jer pružaju poticanje sazrijevanja dendritičkih stanica što dovodi do snažnih staničnih i humoralnih imunskih odgovora specifičnih za antigen.^{14,15} Vrsta imunskog odgovora ovisi o nizu čimbenika uključujući karakteristike vrste i veličinu čestica u koje je mRNA ugrađena.^{15,50} IVT mRNA inducira imunološku stimulaciju aktiviranjem receptora za prepoznavanje uzoraka (PRR) čija je prirodna uloga identificirati i reagirati na virusne RNA induciranjem različitih posljedičnih učinaka.¹⁵

U imunološkim stanicama Toll-nalik receptori (TLR-*Toll-like receptors*) TLR3, TLR7 i TLR8, koji se nalaze u endosomskom odjeljku stanica, aktiviraju se endocitoziranom IVT mRNA i induciraju lučenje interferona. TLR3 prepoznaje dvolančanu RNA (dsRNA), dok TLR7 i TLR8 detektiraju jednolančanu RNA (ssRNA).^{15,51,52} Poliuridilat (poly(U)) je najmoćniji induktor interferona i djeluje putem TLR7.^{15,52}

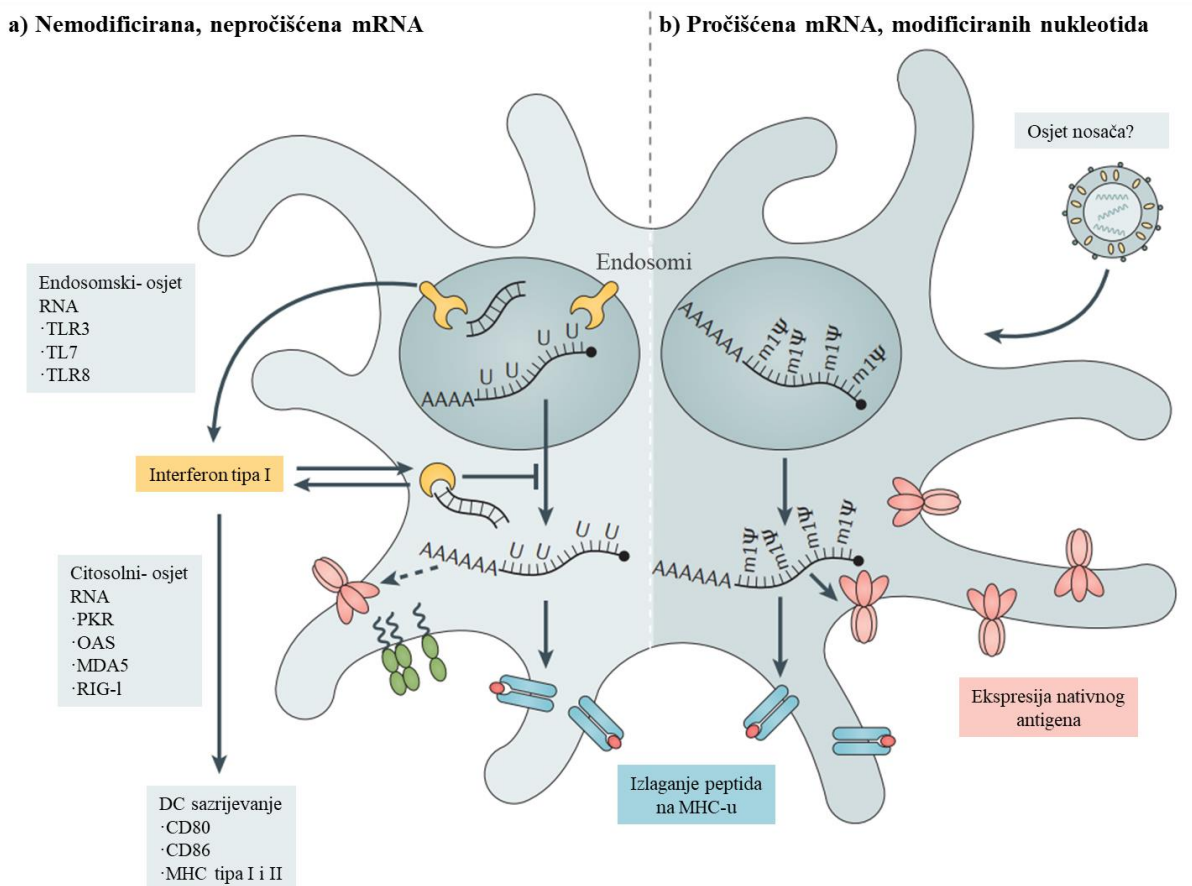
Međutim, urođeni imunološki osjet mRNA također je povezan s inhibicijom ekspresije antigena i može negativno utjecati na imunološki odgovor.^{14,53,54}

RNA citoplazmatski senzori posreduju u imunološkoj stimulaciji i utječu na učinkovitost translacije mRNA, što u konačnici dovodi do zaustavljanja translacije, razgradnje RNA i izravne antivirusne aktivnosti. Ovi učinci djelomično su posredovani protein-kinazom koju aktivira RNA (PKR; također poznatom kao EIF2AK2), koja fosforilira eukariotski faktor inicijacije translacije 2α (eIF2 α) i u konačnici inhibira translaciju mRNA.^{15,55}

Studije su tijekom proteklih nekoliko desetljeća pokazale da se imunostimulatorni profil mRNA može modelirati pročišćavanjem IVT mRNA, uvođenjem modificiranih nukleozida te kompleksiranjem mRNA s različitim molekulama nosačima.^{14,53,54} Enzimski sintetizirani pripravci mRNA sadrže onečišćenja u obliku dvolančane mRNA (dsRNA) kao aberantne produkte *in vitro* reakcije. Dvolančana RNA je imitacija virusnih genoma i intermedijera replikacije te je stoga moćan molekularni motiv povezan s patogenom (PAMP- *pathogen-associated molecular pattern*) koji je detektiran receptorima za prepoznavanje motiva u

mnogim staničnim odjeljcima. PAMP je očuvana molekularna struktura koju proizvode mikroorganizmi te je prepoznata kao signal upalne opasnosti od strane raznih urođenih imunskih receptora. Prepoznavanje IVT mRNA kontaminirane sa dsRNA rezultira robusnom proizvodnjom interferona tipa I, koji pojačava ekspresiju i aktivaciju PKR i 2'-5'-oligoadenilat sintetaze (OAS), što dovodi do inhibicije translacije i razgradnje stanične mRNA, odnosno ribosomske RNA. Onečišćenja dsRNA mogu se učinkovito ukloniti iz IVT mRNA kromatografskim metodama kao što su brza proteinska tekućinska kromatografija s obrnutom fazom (FPLC-*fast protein liquid chromatography*) ili tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-*high-performance liquid chromatography*). Odgovarajuće pročišćavanje IVT mRNA je čini se ključno za maksimiziranje proizvodnje proteina u dendritičkim stanicama i za izbjegavanje neželjenog urođenog imunskog odgovora, s obzirom na to da se pokazalo da pročišćavanje pomoću FPLC povećava sintezu proteina iz IVT mRNA za do 1000 puta.^{14,54}

Kad se jednolančane RNA dopremaju u stanice egzogeno, osim onečišćenja dsRNA, one su i same po sebi PAMP, s obzirom na to da ih prepoznaju TLR7 i TLR8 što rezultira proizvodnjom interferona tipa I.^{14,54} Deimunizirana IVT mRNA može biti proizvedena ugradnjom modificiranih nukleozida koji se javljaju u prirodi, kao što su pseudouridin, 2-tiouridin, 5-metiluridin, 5-metilцитидин ili N6-metiladenozin.¹⁵ Ugradnja modificiranih nukleozida u IVT mRNA se pokazala kao parcijalni supresor prepoznavanja dsRNA¹⁴, supresor intrinzične adjuvantske aktivnosti IVT mRNA kao i supresor inhibicijskih učinaka na translaciju¹⁵ te je pokazano da je mRNA modificiranih nukleotida efikasnije translirana od nemodificirane mRNA *in vitro* i *in vivo* u primarnim dendritičkim stanicama i mišu^{14,53,56}. IVT mRNA s modificiranim nukleotidima izbjegavaju aktivaciju TLR7 i TLR8, a pokazalo se da neke od njih, uključujući pseudouridin i 2-tiouridin, čine IVT mRNA nedetektiranom pomoću PKR.¹⁵ Značajno je da su opažene najveće razine proizvodnje proteina u dendritičkim stanicama kad je mRNA bila kromatografski pročišćena FPLC-om i kad je posjedovala modificirane nukleotide.¹⁴ Također, kad su dsRNA onečišćenja kromatografski eliminirana, a s njima i svaka preostala TLR3 aktivacija, modificirana mRNA više nije inducirala nikakav imunostimulacijski učinak. Izvanredna translacija mRNA modificirane pseudouridinom pripisuje se povećanoj stabilnosti i smanjenom vezanju za PKR.^{15,57,58}



Slika 6. Prepoznavanje mRNA cjepiva od strane urođenog imunskog sustava. Urođeno imunsko prepoznavanje dvije vrste mRNA cjepiva od strane dendritičkih stanica (DC). mRNA senzori – žuto, antigen – crveno, DC faktori sazrijevanja -zeleno, peptid sa MHC-om – plavo s crvenim. Navedeni su glavni poznati RNA senzori, isprekidana strelica predstavlja reduciranu ekspresiju antigena (lijevo). Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema N. Pardi, *et al*, *Nature reviews Drug discovery* **17**, (2018) 261–279.

Nasuprot tome, imunostimulirajuća svojstva mRNA mogu se povećati dodavanjem pomoćne tvari – adjuvansa, kako bi se povećala učinkovitost nekog mRNA cjepiva. To uključuje tradicionalne adjuvanske, kao i nove tehnologije koje iskorištavaju intrinzičnu imunogenost mRNA ili njezinu sposobnost kodiranja imunomodulirajućih proteina. Samoreplicirajuća RNA cjepiva pokazala su povećanu imunogenost i učinkovitost nakon formuliranja RNA u kationskoj nanoemulziji na temelju licenciranog adjuvansa MF59 (Novartis).^{14,59} Drugi princip je kombinacija mRNA koje kodiraju tri proteina imunoaktivatora: CD70, ligand CD40

(CD40L) i konstitutivno aktivan TLR4 (TriMix). TriMix mRNA je povećala imunogenost ogoljene, nemodificirane, nepročišćene mRNA u više studija o cjepivima za tretiranje karcinoma, a posebno je povezana s povećanim sazrijevanjem dendritičkih stanica i imunskim odgovorima citotoksičnih T-limfocita (CTL).^{14,60} Na citokinski profil induciran mRNA dopremom također utječu vrsta mRNA nosača i veličina kompleksa mRNA s nosačem, štoviše platforma cjepiva RActive (CureVac AG)^{14,61,62} ovisi o svom nosaču kako bi osigurala adjuvantnu aktivnost. U ovom slučaju, antigen se eksprimira iz ogoljene, nemodificirane, mRNA optimizirane sekvence, dok adjuvantnu aktivnost osigurava zajednički dopremljena RNA kompleksirana s protaminom (polikationski peptid), koji djeluje putem signalizacije TLR7.^{14,62,63} Ovaj format cjepiva izazvao je povoljne imunološke odgovore u više prekliničkih studija na životinjama za cijepljenje protiv zaraznih bolesti i tretiranje karcinoma.^{14,64,65}

Nedavna studija dala je mehanističke podatke o adjuvantnosti RNAaktivnih cjepiva kod miševa *in vivo* i ljudskih stanica *in vitro*. Pokazana je snažna aktivacija TLR7 (miš i čovjek) i TLR8 (čovjek) proizvodnja interferona tipa I, proupalnih citokina i kemokina nakon intradermalne imunizacije. Slično adjuvantno djelovanje također je pokazano u kontekstu cjepiva koja nisu na bazi mRNA, a koriste RNAdjuvant (CureVac AG), nemodificiranu, jednolančanu RNA stabiliziranu kationskim peptidnim nosačem.^{14,63,66}

2.5. Doprema mRNA cjepiva u stanicu

Učinkovita doprema IVT mRNA u stanice *in vivo* je od ključne važnosti za postizanje terapijskih učinaka. Egzogen mRNA mora prodrijeti kroz lipidnu staničnu barijeru kako bi ušla u citoplazmu u kojoj se događa proces translacije mRNA u funkcionalni protein. Mehanizmi unosa mRNA u stanicu ovise o vrsti stanica, a fizikalno-kemijska svojstva mRNA kompleksa značajno utječu na dopremu u stanice te raspodjelu po organima. Dva su glavna pristupa dopreme mRNA u stanice – prvi je unos mRNA u dendritičke stanice *ex vivo*, nakon čega slijedi ponovna infuzija transfektiranih stanica u pacijenta, a drugi je izravna parenteralna injekcija mRNA sa ili bez molekula nosača u pacijenta (Tablica 1). *Ex vivo* unos u dendritičke stanice omogućuje preciznu kontrolu stanične mete, učinkovitu transfekciju, ali je vrlo skup kao oblik stanične terapije te radno- intenzivan i zahtjevan pristup cijepljenju.^{14,67} Izravno injektiranje mRNA je iznimno brzo, financijski isplativo i jednostavno, ali je manje precizan način dopreme i manje učinkovito za dopremu u specifične vrste stanica.¹⁴

Aktivni unos mRNA je u većini stanica neučinkovit i zasićenje je prisutno pri vrlo malim dozama mRNA. Iznimka su nezrele dendritičke stanice, koje su specijalizirane za konstantno upijanje ekstracelularne tekućine tijekom uzorkovanja svoje okoline, jer unose mRNA makropinocitozom i na taj način je akumuliraju s visokom učinkovitošću na linearni nezasićen način u koncentracijskim rasponima iznad nekoliko redova veličina. Kao posljedica toga, za dopremu mRNA u većinu ostalih staničnih vrsta potrebne su odgovarajuće formulacije za zaštitu IVT mRNA od izvanstanične razgradnje posredovane RNazama i olakšavanje njezinog ulaska u stanice (slika 7). Dva su glavna cilja povezana s dopremom IVT mRNA: jedan je postići dovoljno visoku neto razinu kodiranog proteina, a drugi je unos u velik broj stanica.^{15,68}

VRSTA SUSTAVA DOPREME	RUTA DOPREME	VRSTA MODELNOG ORGANIZMA	META
KOMERCIJALNI TRANSFEKCIJSKI REAGENS	intranazalno	miš	ovalbumin-ekspimirajući modeli karcinoma (OVA)
PROTAMIN	intradermalno	miš, tvor, svinja i ljudski	virus gripe, melanom, karcinom pluća nemalih stanica, rak prostate, virus bjesnoće, OVA, Lewisov rak pluća
PROTAMIN LIPOSOM	intravenozno	miš	rak pluća
POLISAHARIDNA ČESTICA	potkožno	miš i zec	Virus gripe
KATIONSKA NANOEMULZIJA	intramuskularno	miš, zec, tvor i rezus makaki	virus gripe, respiratorni sincicijski virus (RSV), HIV-1, humani citomegalovirus (HCMV), <i>Streptococcus spp</i> , hepatitis C virus (HCV) i virus bjesnoće
KATIONSKI POLIMER	potkožno intranazalno	miš	virus gripe i HIV-1
KATIONSKI POLIMERNI LIPOSOM	intravenozno	miš	melanom i rak gušeraće
KATIONSKA LIPIDNA NANOČESTICA	intradermalno intravenozno potkožno	miš	HIV-1 i OVA
KATIONSKI LIPID, KOLESTEROL NANOČESTICA	intravenozno potkožno intrasplenično	miš	virus gripe, melanom, virus mišje leukemije, OVA, humani papilomavirus (HPV) i rak crijeva
KATIONSKI LIPID, KOLESTEROL, POLIETILEN GLIKOL NANOČESTICA	intradermalni intramuskularno potkožno	miš, pamučni štakor i rezus makaki	zika virus, virus gripe, RSV, HCMV, virus bjesnoće i melanom
NANOČESTICA DENDRIMERA	intramuskularno	miš	virus gripe, virus ebole, <i>Toxoplasma gondii</i> i zika virus

Tablica 1. Strategije kompleksiranja mRNA za in vivo dopremu. Podaci su preuzeti i prilagođena prema N. Pardi, *et al*, *Nature reviews Drug discovery* **17**, (2018) 261–279.

2.5.1. *Ex vivo* transfekcija dendritičkih stanica

Dendritičke stanice su najmoćnije antigen-predstavljajuće stanice imunološkog sustava. One iniciraju adaptivni imunološki odgovor internalizirajući i proteolitički obrađujući antigene te prezentirajući ih CD8⁺ i CD4⁺ T-limfocitima na glavnim kompleksima histokompatibilnosti (MHC), odnosno na MHC tipa I i II. MHC tipa I je polimorfni set proteina izražen na svim stanicama sa jezgrom, koji prezentira antigen citotoksičnim CD8⁺ T-limfocitima pomagačima u obliku proteolitički obrađenih peptida, dužine oko 8 – 11 aminokiselina. MHC II je polimorfni set proteina izražen na antigen-predstavljajućim stanicama i određenim drugim vrstama stanica, koji prezentira antigen CD4⁺ T-limfocitima pomagačima u obliku proteolitički obrađenih peptida, dužine oko 11 – 30 aminokiselina. Dendritičke stanice također mogu predstaviti antigen i B-limfocitima te tako inducirati odgovor antitijela (Slika 3 i 5).^{14,69} S obzirom na to da su dendritičke stanice vrlo podložne transfekciji, predstavljaju atraktivnu metu za transfekciju mRNA cjepivom *in vivo* i *ex vivo*. Iako se pokazalo da dendritičke stanice internaliziraju ogoljenu mRNA kroz različite endocitne puteve,^{14,70} učinkovitost *ex vivo* transfekcije obično se povećava elektroporacijom: molekule mRNA prolaze kroz membranske pore nastale visokonaponskim impulsom i izravno ulaze u citoplazmu.^{14,71} Elektroporacija je vrlo favorizirana u *ex vivo* dopremi zbog svoje visoke učinkovitosti transfekcije bez potrebe za kompleksiranjem mRNA i molekulom nosačem. Transfektirane dendritičke stanice zatim se ponovno vraćaju u autologno cjepivo primatelja za pokretanje imunskog odgovora. Većina opisanih *ex vivo* cjepiva izaziva pretežno stanično posredovani imunski stoga su se prvenstveno koristili za liječenje karcinoma.^{14,67}

2.5.2. *Injektiranje ogoljene mRNA in vivo*

Ogoljena mRNA uspješno se koristi za imunizacije *in vivo*, osobito u formatima koji preferirano ciljaju na antigen-predstavljajuće stanice, kao u intradermalnim i intranodalnim injekcijama. Nedavno je izvješteno da su ponavljane intranodalne imunizacije ogoljenom, nemodificiranom mRNA koja kodira neoantigene povezane s tumorom, generirale robusne odgovore T-limfocita i povećale preživljavanje bez progresije.^{14,70,72} Ovakav način dopreme mRNA nalazi primjenu u individualiziranim neoepitopskim mRNA cjepivima gdje se visokoprotočno sekvenciranje koristi za identifikaciju svake jedinstvene somatske mutacije uzorka tumora pojedinog pacijenta. Time se omogućava racionalni dizajn neoepitopa tumorskog cjepiva na način specifičan za svakog pacijenta.^{14,73}

2.5.3. Kompleksiranje s protaminom

Kationski peptidni protamin se pokazao kao dobra zaštita od razgradnje mRNA serumskim RNAazama.^{14,74} Nažalost, zbog jačine interakcija između protamina i mRNA, mRNA kompleksirana s protaminom pokazala je ograničenu ekspresiju proteina i djelotvornost u modelu cjepiva za tretiranje karcinoma.^{14,75} S obzirom na to RNA kompleksirana s protaminom se ne koristi samostalno kao cjepivo na bazi nukleinske kiseline i ekspresijski vektor, nego je svoju primjenu našla kao imunološki aktivator i pomoćna tvar u drugim cjepivima.^{14,62}

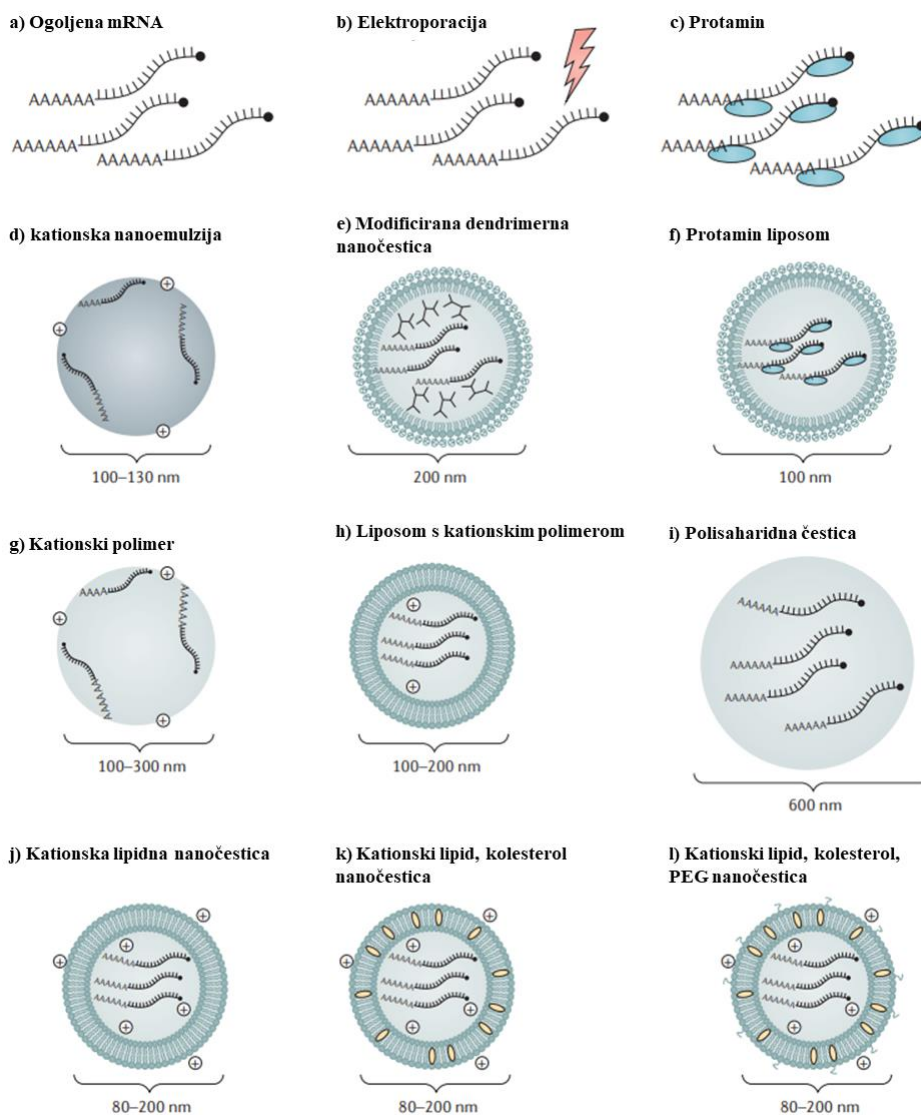
2.5.4. Doprema na bazi kationskih lipida i polimera

Vrlo učinkoviti reagensi za transfekciju mRNA na bazi kationskih lipida ili polimera, poput *TransIT-mRNA* (Mirus Bio LLC) i *Lipofectamine* (Invitrogen), komercijalno su dostupni i dobro djeluju u mnogim primarnim staničnim kulturama i staničnim linijama karcinoma, ali često pokazuju ograničenu djelotvornost *in vivo* ili visoku razinu toksičnosti.^{14,53,54} Posljedično tome, postignut je velik napredak u razvoju i dizajnu sličnih kompleksirajućih reagensa za sigurnu i učinkovitu upotrebu *in vivo*. U posljednjih nekoliko godina, kationski lipidi i polimeri, uključujući i dendrimere (visoko uređene, razgranate polimerne molekule), postali su rasprostranjeno korišteni mediji za primjenu mRNA. Područje mRNA terapeutika je poprilično profitiralo od prethodnih značajnih ulaganja u *in vivo* dopremu male interferirajuće RNA (siRNA), gdje se lipidne nanočestice za dopremu koriste više od desetljeća. Lipidne nanočestice (LNP – *lipid nanoparticles*) postale su jedan od najprivlačnijih i najčešće korištenih alata za dopremu mRNA. Lipidne nanočestice se najčešće sastoje od četiri komponentne: nabijenog kationskog lipida, polietilen-glikola vezanog za lipide (PEG – polyethylene glycol), kolesterola i fosfolipida. Nabijeni kationski lipid promiče spontano sklapanje u česticu veličine virusa (~ 100 nm) i omogućuje endosomsko oslobađanje mRNA u citoplazmu. Polietilen-glikol povećava vrijeme poluživota formulacije, kolesterol služi kao stabilizacijsko sredstvo, a fosfolipidi koji se prirodno nalaze u čestici, podupiru strukturu lipidnog dvosloja. Iako su brojna istraživanja prikazala učinkovitu *in vivo* dopremu siRNA sa LNP,^{14,76} tek nedavno je pokazano da su lipidne nanočestice moćni alati za *in vivo* dopremu samoreplicirajuće RNA i konvencionalne nereplicirajuće mRNA. Meta sistematski dopremljenih mRNA-LNP kompleksa je uglavnom jetra zbog vezanja apolipoproteina E i kasnijeg unosa u hepatocyte posredovanog receptorom,^{14,77} a pokazano je da intradermalna, intramuskularna i potkožna primjena proizvode produženu ekspresiju proteina na mjestu injekcije.^{14,78,79} Mehanizmi

oslobađanja mRNA iz liposomskih nanočestica u citoplazmu nisu u potpunosti razjašnjeni, ne samo za umjetne liposome nego i za egzosome koji se javljaju u prirodi.^{14,80}

Veličina i trajanje proizvodnje proteina iz mRNA-LNP cjepiva može se *in vivo* djelomično kontrolirati promjenom načina primjene. Intramuskularna i intradermalna primjena mRNA-LNP-a rezultira dugotrajnijom ekspresijom proteina od sistemskih ruta dopreme (krvožilni sustav). Eksperimentom dokazano, vrijeme poluživota luciferaze krijesnica kodirane pomoću mRNA bilo je više od tri puta duže nakon intradermalne injekcije nego nakon intravenozne dopreme.^{14,79}

Kinetika ekspresije mRNA - LNP može biti povoljna za induciranje imunoloških odgovora. Postojana dostupnost antigena tijekom cijepljenja pokretač visokog titra antitijela i odgovora B-limfocita i folikularnih pomagačkih T-limfocita (T_{FH}) u germinalnom centru (GC).^{14,81} Ovaj proces potencijalno pridonosi faktoru djelovanja mRNA-LNP cjepiva modificiranih nukleotida koja se isporučuju intramuskularnim i intradermalnim putem.^{14,82} T_{FH} -limfociti imaju ključnu ulogu u zaštitnom imunitetu pomažući B-limfocitima da proizvedu antitijela protiv stranih patogena, identificirane su kao iznimno važna populacija imunoloških stanica koje cjepiva moraju aktivirati kako bi generirale snažne i dugotrajne neutralizirajuće reakcije protutijela, osobito protiv virusa koji izbjegavaju humoralni imunitet.^{14,83}



Slika 7. Glavne metode dopreme mRNA u cjepivima.). Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema N. Pardi, *et al*, *Nature reviews Drug discovery* **17**, (2018) 261–279.

2.6. mRNA kao cjepivo za infektivne bolesti

Pretkliničke studije stvorile su nadu da će mRNA cjepiva ispuniti mnoge kriterije idealnog kliničkog cjepiva: pokazala su povoljan sigurnosni profil kod životinja, prilagodljiva su i brzo se mogu dizajnirati za nove zarazne bolesti te su podložna skalabilnoj proizvodnji dobre proizvođačke prakse (GMP – good manufacturing practice). GMP je zbirka smjernica i postupaka osmišljenih kako bi jamčili dosljednu proizvodnju visokokvalitetnih i sigurnih farmaceutskih proizvoda te se GMP materijali moraju koristiti za klinička ispitivanja na ljudima. Za razliku od imunizacije proteinima, nekoliko formata mRNA cjepiva inducira

snažne reakcije citotoksičnih CD8+ T-limfocita, zbog učinkovite prezentacije endogeno proizvedenih antigena na molekulama MHC tipa I, uz snažne odgovore CD4+ T-limfocita pomagača.^{14,84,85} Za razliku od imunizacije pomoću DNA, mRNA cjepiva pokazala su sposobnost stvaranja snažnih neutralizirajućih odgovora antitijela u životinjama sa samo jednom ili dvije imunizacije niske doze. Kao rezultat, mRNA cjepiva izazvala su zaštitni imunitet protiv raznih uzročnika zaraze u životinjskim modelima.^{14,79,86}

Dva glavna tipa RNA cjepiva korištena su protiv zaraznih patogena: samoreplicirajuća RNA cjepiva (SAM – self-amplifying mRNA vaccines) i nereplicirajuća mRNA cjepiva. Nereplicirajuća mRNA cjepiva mogu se dalje razlikovati po načinu dopreme: *ex vivo* unošenje transfektiranih dendritičkih stanica ili izravno *in vivo* injektiranje u različita anatomska mjesta.

2.6.1. Samoreplicirajuća mRNA cjepiva

Samoreplicirajuća mRNA cjepiva (SAM) temelje se na genomu alfavirusa, gdje su geni koji kodiraju mehanizam replikacije RNA netaknuti, a geni koji kodiraju strukturne proteine zamijenjeni sekvencom za antigen od interesa.^{14,87} Puna duljina RNA je oko 9000pb i može se lako proizvesti *in vitro* transkripcijom iz DNA kalupa. Sistem SAM cjepiva omogućava produkciju velike količine antigena iz iznimno malih doza cjepiva, zahvaljujući unutarstaničnoj replikaciji antigen-kodirajuće RNA. Imunizacija s 10µg ogoljenog SAM cjepiva koje kodira RSV fuzijski protein (F) ili hemaglutinin virusa influence (HA), rezultirala je odgovorima antitijela i djelomičnom zaštitom od letalnih posljedica virusne infekcije kod miševa.^{14,88} Značajno poboljšanje učinkovitosti SAM cjepiva donio je i razvoj RNA kompleksirajućih agensa – samo 100 ng cjepiva koje kodira RSV F protein (*Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein*), kompleksirano sa lipidnim nanočesticama (LNP), rezultiralo je snažnim imunskim odgovorom T i B-limfocita kod miševa, a 1µg izazvalo je zaštitni imunološki odgovor protiv infekcije RSV-om u intranazalnom sustavu štakora.^{14,89} Daljnje studije pokazale su imunogenost ovog oblika cjepiva protiv različitih virusa u više vrsta organizama, uključujući humani citomegalovirus (CMV), virus hepatitisa C i virus bjesnoće kod miševa, HIV-1 u zečevima, HIV-1 i humani CMV u rezus majmunu.^{14,59,84,90} SAM RNA koja kodira antigene influence, u kompleksu s hitosanom koji sadrži LNP ili polietilenimin (PEI) izazvala je imunološke odgovore T i B-limfocita kod miševa nakon potkožne dopreme.^{14,91,92} Razvijanjem platforme za dopremu cjepiva koja se sastojala od kemijski modificiranog ioniziranog dendrimernog kompleksa u LNP, demonstrirano je da intramuskularna dostava RNA-replikona

koji kodira virus gripe, virus Ebole ili antigene *Toxoplasma gondii*, štiti miševе od smrtonosne infekcije.^{14,93}

Također je dokazano da je cijepljenje s RNA replikomom koji kodira Zika virus, formuliranim na isti način, izazvalo antigen-specifična antitijela i odgovore CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita kod miševa.^{14,85} Široku primjenu platforme SAM cjepiva dodatno potvrđuje studija o imugenosti i umjerenoj zaštitnoj učinkovitosti SAM cjepiva protiv bakterijskih patogena, streptokoka skupine A i B.^{14,94}

Još jedna od prednosti SAM cjepiva je ta što stvaraju vlastite pomoćne tvari - adjuvanse u obliku dsRNA struktura, međuprodukata replikacije i drugih motiva koji mogu pridonijeti njihovoj visokoj snazi. Međutim svi ti motivi su ujedno i PAMP, odnosno signali za uplanu opasnost – što može otežati moduliranje upalnog profila ili reaktogenosti SAM cjepiva. Dodatno, ograničenja na veličinu inserta veća su za SAM cjepiva nego za mRNA koja ne kodiraju gene replikona, a imunogenost replikacijskih proteina teoretski može ograničiti ponovnu uporabu.¹⁴

2.6.2. mRNA cjepiva u obliku transfektiranih dendritičkih stanica

Ex vivo transfekcija dendritičkih stanica često je korištena metoda u istraživanjima za stvaranje stanično posredovanog imuniteta protiv karcinoma. Razvoj cjepiva protiv zaraznih bolesti korištenjem ovog pristupa uglavnom je bio ograničen na terapijsko cjepivo za HIV-1. Pojedinci zaraženi HIV-1 na visoko aktivnoj antiretrovirusnoj terapiji liječeni su autolognim dendritičkim stanicama elektroporiranim s mRNA koje kodiraju različite antigene HIV-1, te su procjenjivani stanični imunološki odgovori.^{14,95,96} Istraživanje se pokazalo sigurnom i izazvalo je antigen-specifične odgovore CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita, ali nije primijećena klinička korist. Druga studija na ljudima proučavala je cijepljenje dendritičkim stanicama transfektiranim s CMV pp65 (cytomegalovirus rekombinantni protein) mRNA kod zdravih ljudskih dobrovoljaca i primatelja alogenih matičnih stanica te je izvijestila o indukciji i ekspanziji CMV-specifičnih staničnih imunoloških odgovora.^{14,97}

2.6.3. Direktno injektiranje nereplicirajućih mRNA cjepiva

Nereplicirajuća mRNA cjepiva koja se direktno injektiraju su vrlo poželjan oblik cjepiva zbog svoje jednostavne i ekonomične primjene, osobito u okolnostima gdje su ograničeni resursi. Iako je vrlo rano pokazano da je imunizacija s mRNA, kompleksiranom u liposomima, koja

kodira nukleoproteine virusa gripe, izazvala imunodne odgovore citotoksičnih T-limfocita u miševima, prva demonstracija zaštitnih imunoloških odgovora mRNA cjepiva protiv zaraznih patogena objavljena je prije samo nekoliko godina.^{14,98,99} Intradermalna primijenjena nekompleksirane mRNA koja kodira različite antigene virusa gripe u kombinaciji s adjuvansom (RNA kompleksiranom s protaminom) pokazala se imunogenom u više životinjskih modela i zaštitila je miševima od smrtonosnog ishoda bolesti.¹⁴

Imunizacija s RNAktivnom platformom na bazi protamina, koja kodira glikoprotein virusa bjesnoće, također je izazvala zaštitni imunitet protiv smrtonosnog intracerebralnog virusa kod miševa i snažne neutralizirajuće reakcije antitijela kod svinja.^{14,100} Zatim je provedeno istraživanje ovog cjepiva kod 101 zdravog ljudskog dobrovoljca.^{14,101} Ispitanici su primili 80–640µg mRNA cjepiva tri puta injekcijom s iglom ili bez igle, intradermalno ili intramuskularno. Sedam dana nakon cijepljenja, gotovo svi sudionici prijavili su blage do umjerene reakcije na mjestu ubrizgavanja, a 78% je doživjelo sustavnu reakciju (groznicu, glavobolju i zimicu). Postojao je jedan ozbiljniji slučaj koji je vjerojatno bio povezan s cjepivom: prolazan i umjeren slučaj Bellove paralize. Kod 98% primatelja injekcije s iglom nisu generirale neutralizirajuća antitijela. Nasuprot tome, doprema bez igle izazvala je promjenjive razine neutralizirajućih antitijela, od kojih je većina dosegla vrhunac iznad očekivanog zaštitnog praga, ali je potom uvelike oslabila nakon godinu dana kod ispitanika koji su dugotrajno praćeni. Objašnjenje različite imunogenosti između životinja i ljudi koji su primili ovo cjepivo te između dva načina dopreme bit će informativno za dizajn budućih cjepiva pomoću ove platforme.¹⁴

Druga cjepiva protiv zaraznih bolesti uspješno su koristila sustave za dopremu na bazi lipida ili polimera. Kationski 1,2-dioleoiloksi-3-trimetilamonijpropan (DOTAP) i dioleoilfosfatidiletanolamin (DOPE) lipidi kompleksirani s mRNA koja kodira HIV-1 gag protein, generirali su antigen-specifične reakcije CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita nakon potkožne dopreme u miševima.^{14,102} Dvije druge studije pokazale su da se mRNA sa kompleksom polietilenimina (PEI) mogu učinkovito dopremiti miševima za induciranje imunoloških odgovora specifičnih za HIV-1: potkožno dopremljena mRNA koja kodira HIV-1 gag protein izazvala je odgovore CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita, te intranazalno dopremljena mRNA koja kodira HIV-1 podjedinicu ovojnice gp120 proteina prešla je epitel nosa i generirala imunološke odgovore specifične za antigen u nosnoj šupljini. Intravenoznom imunizacijom kod miševa koristeći mRNA s kompleksom lipida koja kodira HA protein virusa gripe aktivirali su se T-limfociti nakon jedne doze.^{14,103}

mRNA cjepiva modificiranih nukleotida predstavljaju novu i vrlo učinkovitu kategoriju mRNA cjepiva. Prvo objavljeno izvješće pokazalo je da mRNA koja kodira prM-E protein Zika virusa, te je modificirana 1-metilpseudouridinom, pročišćena FPLC-a i kompleksirana LNP-om, jednom intradermalnom injekcijom uz upotrebu samo 50 μ g (0,02 mg kg⁻¹) cjepiva izaziva imunološke odgovore kod rezus majmuna.^{14,86} Naknadna studija druge skupine testirala je slično dizajnirano cjepivo protiv Zika virusa na miševima i dokazala je da jedna intramuskularna imunizacija izaziva umjerene imunološke odgovore, a dodatno cijepljenje rezultiralo snažnim i zaštitnim imunološkim odgovorima.^{14,82} Ovo cjepivo također je sadržavalo modificirani nukleozid 1-metilpseudouridin, ali korištenje pročišćavanja FPLC-om ili druge metode uklanjanja onečišćenja dsRNA nije spomenuto. Nedavna naknadna studija proučavala je isto cjepivo na modelu cijepjenja majke sa fetalnom infekcijom. Dvije imunizacije smanjile su infekciju Zika virusom kod fetalnih miševa za nekoliko redova veličine i potpuno omogućile preživljavanje fetusa.^{14,104}

Također je ispitivana imunogenost mRNA cjepiva modificiranih nukleotida s LNP kompleksom, koje nije prethodno pročišćeno FPLC-om, a kodira proteine HA10 neuraminidazu (H10N8) i H7N9 gripe te je testirano na miševima, tvorovima, primatima (makakijima) i po prvi put na ljudima.^{14,79} Pojedinačna intradermalna ili intramuskularna imunizacija s niskim dozama (0,4-10 μ g) mRNA koja kodira protein HA virusa influence te je kompleksirana s LNP-om, izazvala je zaštitne imunološke odgovore protiv homolognog virusa influence kod miševa. Slični su rezultati postignuti kod tvorova i makaki majmuna nakon imunizacije s jednom ili dvije doze od 50-400 μ g cjepiva potvrđujući da se snaga mRNA-LNP cjepiva odnosi također i na veće životinje, uključujući primat.¹⁴

Na temelju ohrabrujućih prekliničkih podataka, zatim su započela dva klinička ispitivanja I. faze za procjenu imunogenosti i sigurnosti nukleozidom modificiranih mRNA -LNP cjepiva kod ljudi. Sudionici su primili malu količinu (100 μ g) mRNA cjepiva koje kodira H10N8 HA intramuskularno, a imunogenost je izmjerena 43 dana nakon cijepjenja. Cjepivo se pokazalo imunogenim kod svih ispitanika, mjereno inhibicijom hemaglutinacije i testom mikroneutralizacije antitijela.^{14,79} Titri antitijela bili su iznad očekivanog zaštitnog praga, ali su bili umjereno niži nego u životinjskim modelima. Većina cijepjenih ispitanika prijavila je blagu do umjerenu reaktogenost (bol na mjestu ubrizgavanja, mijalgija, glavobolja, umor i zimica), a tri su subjekta prijavila ozbiljnije reakcije na mjestu ubrizgavanja ili sistemski odgovor sličan

prehladi. Zaključeno rezultatima, prijavljena razina reaktogenosti slična je onoj kod tradicionalnih oblika cjepiva.¹⁴

2.7. Pandemija SARS – CoV – 2

Krajem prosinca 2019. godine, prijavljeni su slučajevi upale pluća nepoznate etiologije u gradu Wuhanu u Kini. Uzročnik je bio pozitivni jednolančani RNA koronavirus punog naziva – Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2 – *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). SARS-CoV-2 izazvao je značajnu epidemiju COVID-19 u Kini, a zatim se ubrzo proširio po cijelom svijetu te je epidemija dosegla pandemijski razmjer već u ožujku 2020. Pandemija COVIDA-19 je trenutno i u kolovozu 2021. godine teška globalna kriza s pogubnim zdravstvenim, socijalnim i ekonomskim utjecajem te je do kolovoza 2021. godine odnijela više od četiri milijuna života diljem svijeta.^{105,106,107}

Globalna pandemija COVIDA-19 zahtijevala je hitnu intervenciju u obliku procjepljivanja populacije, a razvoj cjepiva je krenuo odmah nakon objavljivanja cijele sekvence genoma koronavirusa 11. siječnja 2020. mRNA cjepiva su u doba ove zdravstvene krize iskoristila svoj puni potencijal te je američka biotehnološka tvrtka Moderna stvorila kandidatsko mRNA cjepivo u svega 42 dana od analize sekvence virusa.¹⁰⁵

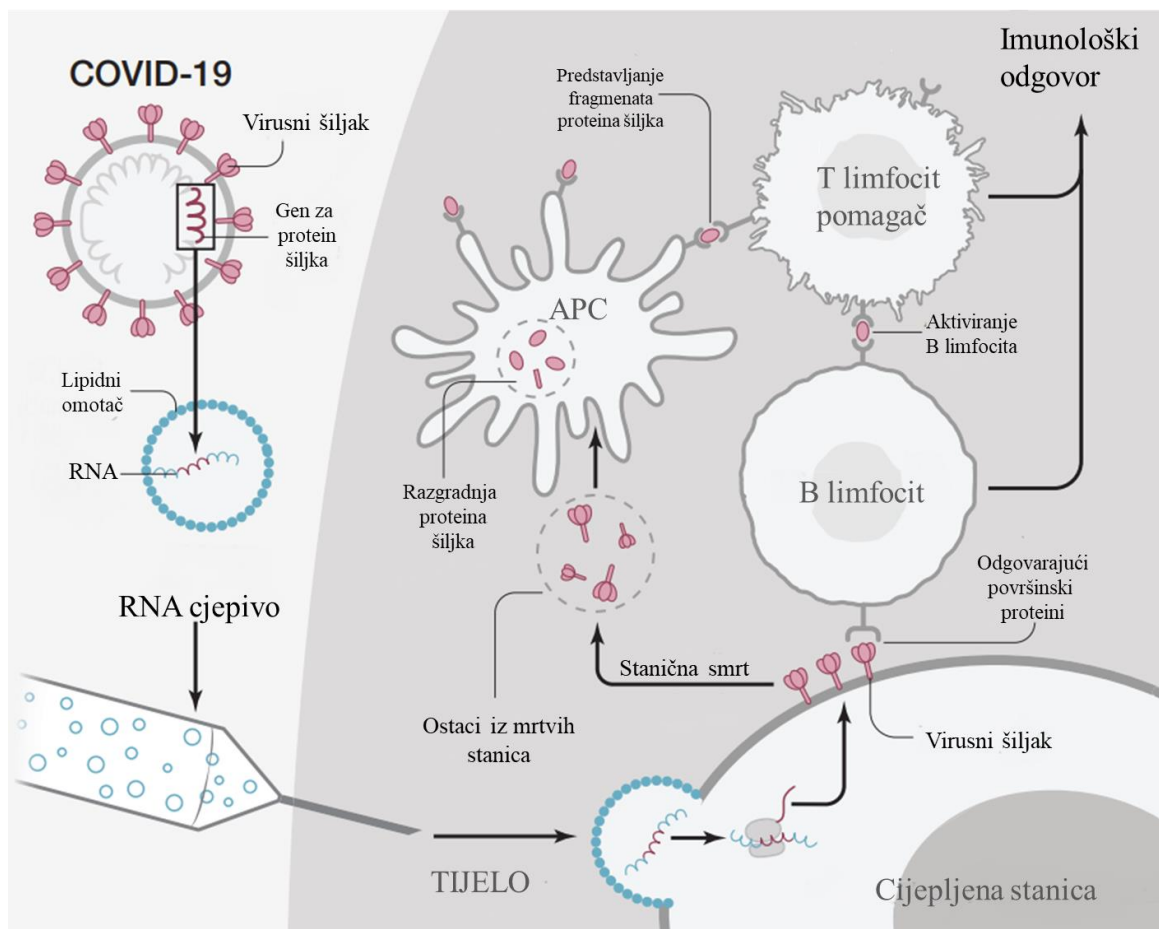
SARS-CoV-2 sadrži četiri glavna strukturalna proteina, proteine ugrađene u virusnu površinsku ovojnica: protein šiljka (S), membranski protein (M) i protein omotnice (E) i protein koji se nalazi u jezgri ribonukleoproteina, a zove nukleokapsid (N). Većina istraživanja o cjepivima protiv COVID-19 uključuje generiranje imunogenog odgovora na cijeli ili dio proteina šiljka (*engl. spike protein ili protein S*) koji je jedinstven za virus SARS-CoV-2.¹⁰⁵

BNT162b2 (BioNTech i Pfizer) je mRNA cjepivo modificiranih nukleotida koje kodira antigen za vezujuću domenu SARS-CoV-2 (RBD – *receptor-binding domain*) proteina šiljka. Cjepivo se isporučuje u lipidnim nanočesticama s ciljem ekspresije proteina šiljka. Injektira se intramuskularno, u dvjema dozama, u razmaku od tri tjedna. Kod skladištenja i otpreme mora biti smrznuto (ultrahladno skladište) na temperaturi od –70 °C. Jednom odmrznuto, stabilno je u hladnjaku do 5 dana, a na sobnoj temperaturi 2 sata. Cjepivo je imalo 95% djelotvornosti u sprječavanju simptomatske COVID-19 kod druge doze ili sedam dana nakon druge doze cjepiva. Taj je učinak procijenjen nakon analize 170 potvrđenih slučajeva COVID-19 (8 u skupini koja je primila cjepivo i 162 u placebo skupini) među 36 523 sudionika u dobi od 16

godina i starijih. Devet od deset teških slučajeva bolesti koji su se dogodili tijekom studije bili su u placebo skupini. Lokalni i sistemski štetni učinci ovisili su o dozi i bili su relativno česti nakon druge doze. Većina ih je bila blage ili umjerene težine (tj. nije spriječila svakodnevne aktivnosti). Među sudionicima mlađim od 55 godina vrućica se pojavila u 16%, a jak umor 4%, glavobolja 3% i zimica u 2% slučajeva. Zabilježeni su rijetki slučajevi Bellove paralize (četiri u skupini koja su primila cjepivo i nijedan u placebo skupini). Slični su nalazi pojavili su se već kod cijepjenja s drugim mRNA cjepivima (RNAktivna platforma na bazi protamina koja kodira glikoprotein virusa bjesnoće), pa je opravdano kontinuirano praćenje moguće povezanosti Bellove paralize s cjepivom.¹⁰⁵

mRNA-1273 (Moderna) cjepivo također koristi nukleozidno modificiranu mRNA dopremljenu u lipidnoj nanočestici za ekspresiju proteina šiljka. Daje se intramuskularno, u dvjema dozama od 100µg, u razmaku od 28 dana. Kod skladištenja i otpreme mora biti smrznuto na temperaturi od -25 do -15°C. Jednom odmrznuto, stabilno je u hladnjaku na 2-8°C do 30 dana, a na sobnoj temperaturi (8-25°C) 12 sati. Djelotvornost cjepiva bila je 94,1%, a to je procijenjeno u ispitivanju koje je uključilo 30 420 dobrovoljaca nasumično raspoređenih u omjeru 1:1 u placebo i cijepljenoj skupini. Simptomatska bolest COVID-19 potvrđena je kod 185 sudionika u placebo-skupini i kod 11 sudionika u mRNA-1273 skupini. Teški oblik COVID-19 dogodio se kod 30 sudionika, uz jedan smrtni slučaj, a svih 30 teže oboljelih bilo je u placebo skupini. Nuspojave u sudionika starijih od 18 godina bile su: bol na mjestu uboda u 92%, umor 70%, glavobolja 64,7%, mijalgija 61,5%, bol u zglobovima 46,4%, jeza 45,4%, mučnina/povraćanje 23%, aksilarna oteklina/osjetljivost 19,8%, povišena temperatura 15,5%, oteklina na mjestu ubrizgavanja 14,7%, i eritem na mjestu uboda igle u 10% slučajeva. Zabilježeni su rijetki slučajevi Bellove paralize koja se smatrala potencijalno povezanom s cijepljenjem (tri u mRNA-1273 skupini i jedan u placebo skupini).¹⁰⁵

Oba mRNA cjepiva induciraju proizvodnju antitijela na protein šiljka virusa pomoću B-limfocita. Također se izaziva imunosni odgovor T-limfocita, osobito CD4+ pomagača i citotoksičnih CD8+ protiv proteina šiljka SARS-CoV-2. Protutijela se vežu na ciljna mjesta na površini glikoproteina SARS-CoV-2 i neutraliziraju ga ili inaktiviraju virione radi uništenja i uklanjanja imunološkim sustavom (slika 8).¹⁰⁸



Slika 8. Shema djelovanja mRNA cjepiva proizvođača Pfizerov-BioNTech i Moderna. Antigen predstavljajuća stanica APC – *An antigen-presenting cell*. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema E. J.Topol., Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2. *Cell*, **184** (2021) 1401.

Kao što je navedeno Pfizerova-BioNTech i Modernina mRNA cjepiva pokazala su se nevjerojatno učinkovita u sprječavanju COVID-19, ali treći kandidat temeljen na mRNA imao je poražavajuće rezultate završnoj fazi ispitivanja. CureVac sa sjedištem u Tübingenu u Njemačkoj, objavio je 16. lipnja 2021. preliminarne podatke iz ispitivanja na 40 000 osoba, koji su pokazali da je cjepivo u dvije doze samo 47% učinkovito u sprječavanju bolesti. Očekivalo se da će CureVac-ovo cjepivo biti jeftinije i da će se moći duže držati u hladnjaku od ranijih mRNA cjepiva, zbog čega su se mnogi nadali da bi to moglo pomoći u proširenju procijepljenosti u siromašnijim zemljama koje nemaju tehnologije za skladištenje ostalih cjepiva. Cjepivo je dozirano u rasponu od 2 do 20 mikrograma mRNA po injekciji, što nije bilo dovoljno za učinkovit imunski odgovor i razina antitijela je bila preniska. Pri višim dozama cjepivo je izazvalo previše nuspojava, a sudionici ispitivanja često su se žalili na probleme

poput jakih glavobolja, umora, zimice i boli na mjestu ubrizgavanja. Stoga su iz tvrtke tvrdili da je problem u doziranju. Ipak, mnogo znanstvenika smatra da odgovor za neefikasnost CureVac-ovog cjepiva najvjerojatnije leži u mRNA sekvenci. Sva tri mRNA cjepiva kodiraju oblik proteina šiljka koronavirusa u konformacij koja pomaže česticama virusa da prodru u ljudske stanice. Međutim, cjepiva Moderna i Pfizer-BioNTech koriste RNA modificiranih nukleotida, koja uključuje nukleotid mRNA pseudouridin - koji je sličan uridinu i njegova je prirodna modifikacija, ali nalazi se na mjestu samog uridina. Smatra se da se time zaobilaze upalne reakcije tijela protiv strane mRNA. CureVac -ovo cjepivo koristi normalni uridin i oslanja se na promjenu sekvence RNA na način koji ne utječe na protein koji kodira, ali pomaže cjepivu da izbjegne imunološku detekciju. Postoji nekoliko drugih mogućih objašnjenja za probleme s podnošljivošću ispitanika na CureVac-ovo cjepivo. Strukturne razlike u nekodirajućim regijama sekvence CureVac mogle bi biti odgovorne. Alternativno, viša temperatura skladištenja mogla je ubrzati razgradnju mRNA u bočicama, proizvodeći komadiće genetskog koda koji bi mogli uzrokovati imunološke napade, a ako su tijekom proizvodnog procesa tvrtke unesene bilo kakve nečistoće, one bi u načelu, imale isti učinak.¹⁰⁹

3. LITERATURNI IZVORI

1. A. J. Pollard, E. M. Bijker, *A guide to vaccinology: from basic principles to new developments*. *Nature Reviews Immunology*, **21** (2021) 83-100.
2. World Health Organization. Global vaccine action plan 2011–2020. WHO https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/ (2013) (datum pristupa 15. srpnja 2021.).
3. World Health Organization. Child mortality and causes of death. WHO https://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_under_five_text/en/ (2020) (datum pristupa 15. srpnja 2021.)
4. J. B. Robbins et al. *Prevention of invasive bacterial diseases by immunization with polysaccharide–protein conjugates*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **146**, (1989) 169–180.
5. S. A. Plotkin, *Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection*. *Vaccine* **38**, (2020) 2250–2257.
6. L. G. Rubin, et al. *2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host*. *Clin. Infect. Dis.* **58**, (2014) e44–e100.
7. S. Rauch, E. Jasny, K. E. Schmidt, B. Petsch, *New vaccine technologies to combat outbreak situations*. *Frontiers in immunology*, **9**, (2018) 1963.
8. D. van Riel, E. de Wit, *Next-generation vaccine platforms for COVID-19*. *Nature materials*, **19**, (2020) 810-812.
9. C. S. Rollier, A. Reyes-Sandoval, M. G. Cottingham, K. Ewer, A. V. Hill, *Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight*. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, (2011).377–382.
10. K. S. Corbett, et al. *SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness*. *Nature* **586**, (2020) 567–571.
11. F. P. Polack, et al. *Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine*. *N. Engl. J. Med.* (2020) <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
12. Wallis, J., Shenton, D. P. & Carlisle, R. C. *Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies*. *Clin. Exp. Immunol.* **196**, (2019) 189–204.

13. C. Zhang, G. Maruggi, H. Shan, J. Li, *Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. Front. Immunol.* **10**, (2019) 594.
14. N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, *mRNA vaccines — a new era in vaccinology. Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, (2018) 261–279.
15. U. Sahin, K. Karikó, Ö. Türeci, *mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. Nature reviews Drug discovery,* **13**, (2014) 759–780.
16. N. Pardi, H. Muramatsu, D. Weissman, K. Kariko, *In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides. Methods Mol. Biol.* **969**, (2013) 29–42.
17. S. Holtkamp, et al. *Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. Blood,* **108**, (2006) 4009–4017.
18. K. Karikó, A. Kuo, E. Barnathan, *Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. Gene Ther,* **6**, (1999) 1092–1100.
19. K.-J. Kallen, A. Theß, *A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. Ther. Adv. Vaccines* **2**, (2014), 10–31.
20. Y. Li, M. Kiledjian, *Regulation of mRNA decapping. Wiley Interdiscip. Rev. RNA,* **1** (2010), 253–265.
21. S.-A. Martin, E. Paoletti, B. Moss, *Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions. J. Biol. Chem.* **250** (1975) 9322–9329.
22. J. A. Wolff, et al. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science* **247**, (1990) 1465–1468.
23. R.-W. Malone, P. L. Felgner, I. M. Verma, *Cationic liposome-mediated RNA transfection. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, (1989) 6077–6081.
24. J. Stepinski, et al. *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* **7**, (2001) 1486–1495.
25. J. Jemielity, et al. *Novel “anti-reverse” cap analogs with superior translational properties. RNA* **9**, (2003) 1108–1122.

-
26. M. Mockey, et al. *mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340** (2006) 1062–1068.
27. E. Grudzien-Nogalska, et al. *Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. RNA.* **13** (2007) 1745–1755.
28. J. Kowalska, et al. *Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. RNA.* **14** (2008) 1119–1131.
29. A. N. Kuhn, et al. *Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. Gene Ther.* **17** (2010) 961–971.
30. D. R. Gallie, R. *The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. Genes Dev.* **5** (1991) 2108–2116
31. C. G. Korner, E. Wahle, *Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. J. Biol. Chem.* **272** (1997) 10448–10456.
32. G. Martin, W. Keller, *Tailing and 3'-end labeling of RNA with yeast poly(A) polymerase and various nucleotides. RNA.* **4** (1998) 226–230.
33. P. M. Rabinovich, et al. *Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy. Hum. Gene Ther.* **17** (2006) 1027–1035.
34. J. Ross, T. Sullivan, *Half-lives of β and γ globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. Blood* **66** (1985) 1149–1154.
35. J. W. Zinckgraf, L. K. Silbart, *Modulating gene expression using DNA vaccines with different 3'-UTRs influences antibody titer, seroconversion and cytokine profiles. Vaccine* **21** (2003) 1640–1649.
36. N. Bergman, et al. *Lsm proteins bind and stabilize RNAs containing 5' poly(A) tracts. Nature Struct. Mol. Biol.* **14** (2007) 824–831.
37. C. Y. Chen, A. B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. Trends Biochem. Sci.* **20** (1995) 465–470.
38. C. Gustafsson, S. Govindarajan, J. Minshall, *Codon bias and heterologous protein expression. Trends Biotechnol.* **22** (2004) 346–353.

-
39. G. Cannarozzi, et al. *A role for codon order in translation dynamics*. *Cell*. **141** (2010) 355–367.
40. E. R. A. Van Gulck, et al. *Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins*. *Blood*. **107** (2006) 1818–1827.
41. A. Thess, et al. *Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals*. *Mol. Ther.* **23** (2015) 1456–1464.
42. G. Kudla, L. Lipinski, F. Caffin, A. Helwak, M. Zylicz, *High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells*. *PLoS Biol.* **4** (2006) e180.
43. G. Kudla, A. W. Murray, D. Tollervey, J. B. Plotkin, *Coding-sequence determinants of gene expression in Escherichia coli*. *Science*. **324** (2009) 255–258.
44. F. Buhr, et al. *Synonymous codons direct cotranslational folding toward different protein conformations*. *Mol. Cell*. **61** (2016) 341–351.
45. V. P. Mauro, S. A. Chappell, *A critical analysis of codon optimization in human therapeutics*. *Trends Mol. Med.* **20** (2014) 604–613.
46. C. Kimchi-Sarfaty, et al. *A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity*. *Science*. **315** (2007) 525–528.
47. X. Saulquin, et al. *+1 frameshifting as a novel mechanism to generate a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope derived from human interleukin 10*. *J. Exp. Med.* **195** (2002) 353–358.
48. S. R. Schwab, et al. *Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules*. *Science*. **301** (2003) 1367–1371.
49. N. Chen, et al. *RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens*. *IUBMB Life*. **69** (2017) 297–304.
50. L. Rettig, et al. *Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling*. *Blood*. **115** (2010) 4533–4541.
51. L. Alexopoulou, et al. *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3*. *Nature*. **413** (2001) 732–738
52. F. Heil, et al. *Species-specific recognition of single stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8*. *Science*. **303** (2004) 1526–1529

53. K. Kariko, et al. *Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.* *Mol. Ther.* **16** (2008) 1833–1840.
54. K. Kariko, H. Muramatsu, J. Ludwig, D. Weissman, *Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleosidemodified, protein-encoding mRNA.* *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) e142.
55. S. Balachandran, et al. *Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection.* *Immunity* **13** (2000) 129–141.
56. O. Andries, et al. *N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice.* *J. Control. Release* **217** (2015) 337–344.
57. K. Karikó, et al. *Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA.* *Immunity* **23** (2005). 165–175.
58. S. R. Nallagatla, P. C. Bevilacqua, *Nucleoside modifications modulate activation of the protein kinase PKR in an RNA structure-specific manner.* *RNA* **14** (2008) 1201–1213.
59. L. A. Brito, et al. *A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines.* *Mol. Ther.* **22** (2014) 2118–2129.
60. S. Van Lint, et al. *The ReNAissanCe of mRNA-based cancer therapy.* *Expert Rev. Vaccines* **14** (2015) 235–251.
61. K. J. Kallen, et al. *A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive® vaccines.* *Hum. Vaccin Immunother.* **9** (2013) 2263–2276.
62. S. Rauch, J. Lutz, A. Kowalczyk, T. Schlake, R. Heidenreich, *RNActive® technology: generation and testing of stable and immunogenic mRNA vaccines.* *Methods Mol. Biol.* **1499** (2017) 89–107.
63. D. K. Edwards, et al. *Adjuvant effects of a sequence engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response.* *J. Transl Med.* **15** (2017) 1.
64. M. Fotin-Mleczek, et al. *Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity.* *J. Immunother.* **34** (2011) 1–15

65. A. Kowalczyk, et al. *Self-adjuvanted mRNA vaccines induce local innate immune responses that lead to a potent and boostable adaptive immunity. Vaccine* **34** (2016) 3882–3893.
66. A. Ziegler, et al. *A new RNA-based adjuvant enhances virus-specific vaccine responses by locally triggering TLR- and RLH-dependent effects. J. Immunol.* **198** (2017)1595–1605.
67. D. Benteyn, C. Heirman, A. Bonehill, K. Thielemans, K. Breckpot, *mRNA-based dendritic cell vaccines. Expert Rev. Vaccines* **14** (2015) 161–176 .
68. M. Diken, et al. *Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. Gene Ther.* **18** (2011) 702–708.
69. M. Wykes, A. Pombo, C. Jenkins, G. G. MacPherson, *Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. J. Immunol.* **161** (1998) 1313–1319.
70. A. Selmi, et al. *Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. Cancer Immunol. Immunother.* **65** (2016) 1075–1083.
71. J. Gehl, *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiol. Scand.* **177** (2003) 437–447.
72. S. Kreiter, et al. *Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. Cancer Res.* **70** (2010) 9031–9040.
73. U. Sahin, et al. *Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. Nature* **547** (2017) 222–226.
74. I. Hoerr, R. Obst, H. G. Rammensee, G. Jung, *In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. Eur. J. Immunol.* **30** (2000) 1–7.
75. T. Schlake, A. Thess, M. Fotin-Mleczek, K. J. Kallen, *Developing mRNA-vaccine technologies. RNA Biol.* **9** (2012) 1319–1330.
76. R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, *Delivery materials for siRNA therapeutics. Nat. Mater.* **12** (2013) 967–977.
77. A. Akinc, et al. *Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. Mol. Ther.* **18** (2010) 1357–1364.
78. N. Pardi, et al. *Expression kinetics of nucleoside modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. J. Control. Release* **217** (2015) 345–351.

79. K. Bahl, et al. *Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses*. *Mol. Ther.* **25** (2017) 1316–1327.
80. M. Z. Ratajczak, J. Ratajczak, *Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later*. *Clin. Transl Med.* **5** (2016) 7.
81. H. H. Tam, et al. *Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113** (2016) E6639–E6648.
82. J. M. Richner et al. *Modified mRNA Vaccines protect against Zika virus infection*. *Cell* **168** (2017) 1114–1125.e10.
83. C. Havenar-Daughton, J. H. Lee, S. Crotty, *Tfh cells and HIV bnAbs, an immunodominance model of the HIV neutralizing antibody generation problem*. *Immunol. Rev.* **275** (2017) 49–61.
84. L. A. Brito, et al. *Self-amplifying mRNA vaccines*. *Adv. Genet.* **89** (2015) 179–233.
85. J. S. Chahal, et al. *An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model*. *Sci. Rep.* **7** (2017) 252.
86. N. Pardi, et al. *Zika virus protection by a single low dose nucleoside-modified mRNA vaccination*. *Nature* **543** (2017) 248–251.
87. S. Perri, et al. *An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector*. *J. Virol.* **77** (2003) 10394–10403.
88. M. N. Fleeton, et al. *Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus*. *J. Infect. Dis.* **183** (2001) 1395–1398.
89. A. J. Geall, et al. *Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109** (2012) 14604–14609.
90. W. M. Bogers, et al. *Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion*. *J. Infect. Dis.* **211** (2015) 947–955.
91. K. C. McCullough, et al. *Self-replicating replicon-RNA delivery to dendritic cells by chitosan-nanoparticles for translation in vitro and in vivo*. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3** (2014) e173.

-
92. T. Demoulin, et al. *Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines*. *Nanomedicine* **12** (2016) 711–722.
93. J. S. Chahal, 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** (2016) E4133–E4142.
94. G. Maruggi, et al. *Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens*. *Vaccine* **35** (2017) 361–368.
95. E. Van Gulck, et al. *mRNA-based dendritic cell vaccination induces potent antiviral T-cell responses in HIV-1-infected patients*. *AIDS* **26** (2012) F1–F12.
96. J. M. Jacobson, et al. *Dendritic cell immunotherapy for HIV-1 infection using autologous HIV-1 RNA: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. *J. Acquir. Immune Def. Syndr.* **72** (2016) 31–38.
97. A. H. Van Craenenbroeck, et al. *Induction of cytomegalovirus-specific T cell responses in healthy volunteers and allogeneic stem cell recipients using vaccination with messenger RNA-transfected dendritic cells*. *Transplantation* **99** (2015) 120–127.
98. F. Martinon, et al. *Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA*. *Eur. J. Immunol.* **23** (1993) 1719–1722.
99. B. Petsch, et al. *Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection*. *Nat. Biotechnol.* **30** (2012) 1210–1216.
100. M. 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** (2016) 0004746.
101. M. 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** (2017) 1511–1520.
102. C. Pollard, et al. *Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines*. *Mol. Ther.* **21** (2013) 251–259
103. L. M. Kranz, et al. *Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy*. *Nature* **534** (2016) 396–401.

-
104. J. M. Richner, et al. *Vaccine mediated protection against Zika virus-induced congenital disease. Cell* **170**, 273–283.e12 (2017).
105. M. Blekić, B. Kljaić Bukvić, *Cjepiva za koronavirusnu bolest (COVID-19).Liječnički vjesnik*, **143(5-6)** (2021) 192-208.
106. F. Krammer, *SARS-CoV-2 vaccines in development. Nature*.586.7830 (2020): 516-527.
107. <https://www.koronavirus.hr/> (datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
- 108.E. J.Topol.,. *Messenger RNA vaccines against SARS-CoV-2. Cell*,**184** (2021) 1401.
109. E. Dolgin, *CureVac COVID vaccine let-down spotlights mRNA design challenges. Nature* 594.7864 (2021): 483-483.