

Razvoj mRNA cjeviva

Buršić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:653686>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Luka Buršić

Razvoj mRNA cjepiva

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Luka Buršić

The Development of mRNA Vaccines

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Razvoj mRNA cjepiva

Luka Buršić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Suprotno čestom mišljenju, tehnologija koja stoji iz mRNA cjepiva nije stvorena nedavno. Ta iznenađujuće jednostavna tehnologija nije se primjenjivala u ljudskoj medicini zbog predrasude od nestabilnosti molekule RNA. Ipak, nakon godina istraživanja unosa molekula RNA lipidnim nanočesticama, koja su prvenstveno bila okrenuta prema RNA-ovisnom utišavanju gena, nakupila su se saznanja koja su u situaciji pandemije COVID-19 mogla biti iskorištena za razvoj prvih mRNA cjepiva namijenjenih ljudima. Poboljšanja u sintezi molekula RNA, u razumijevanju imunskog odgovora induciranog sintetskim molekulama RNA, u sintezi razolikih lipida za nanočestice i u sintezi samih nanočestica razlog su zašto je mRNA tehnologija (cjepiva i terapeutici), premda jednostavna, uspješna i sigurna za uporabu.

Ključne riječi: prevencija, RNA tehnologija, nanočestice, imunologija, cjepiva
(24 stranice, 3 slike, 0 tablica, 63 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The Development of mRNA Vaccines

Luka Buršić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Opposite of what is commonly thought, mRNA vaccines are not a recently developed technology. This surprisingly simple technology wasn't of use in human medicine just because of the prejudice of the instability of RNA molecule. Nevertheless, after years of research on cell's intake of RNA molecules by lipid nanoparticles, primarily conducted for RNA-induced gene silencing, knowledge kept growing until the time of COVID-19 pandemics when it was finally used to give rise to the first mRNA vaccine for humans. Optimizing RNA synthesis, understanding RNA-induced immune response, optimizing synthesis of various lipids and lipid nanoparticle are the reason why mRNA technology (vaccines and therapeutics), although simple, is efficient and safe to use.

Keywords: prevention, RNA technology, nanoparticles, immunology, vaccine
(24 pages, 3 figures, 0 tables, 63 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Ivana Ivančić Baće

Sadržaj

1. Uvod	1
2.1. Koncept mRNA cjepiva	5
2.2. Dijelovi mRNA cjepiva – mRNA	7
2.2.1. Šećerno-fosfatna okosnica.....	7
2.2.2. ORF	9
2.2.3. Krajnje 5' i 3' strukture	10
2.2.4. Netranslatirajuće regije.....	11
2.2.5. Imunogenost mRNA.....	12
2.2.5.1. Dvolančane molekule RNA.....	12
2.2.5.2. Modificirane baze.....	14
2.3. Dijelovi mRNA cjepiva – nanočestice	15
2.3.1. Ionizirajući lipidi	15
2.3.2. Kolesterol	16
2.3.3. Pomoćni lipidi	17
2.3.4. Polietilen-glikolirani lipidi	17
2.4. Sinteza nanočestica	18
3. Zaključak	19
4. Literatura	20
5. Životopis	24

1. Uvod

Zaraze su oduvijek bile problem u ljudskoj zajednici te su tijekom povijesti uz glad bile glavna pojava koja je povećavala mortalitet i sprječavala drastičan porast stanovništva (Kunitz 1984). Znanost je svojim otkrićima uspjela smanjiti snagu tih razarajućih sila. Glad je smanjila poljoprivredna revolucija koju se dogodila razvojem umjetnih gnojiva, omogućenim industrijalizacijom kemijske sinteze amonijaka iz dušika i vodika 1911. godine, te je porast poljoprivredne proizvodnje pridonio smanjenju cijene i povećanju dostupnosti hrane za široku masu (Humphreys i sur. 2021). Razvoj u borbi protiv infektivnih bolesti bio je manje revolucionaran; kroz dugi niz godina istraživanja u mikrobiologiji, patologiji, imunologiji i epidemiologiji znanstvenici su došli do zaključaka koji su omogućili da su zaraze manje smrtonosne i koji su omogućili olakšavanje simptoma zaraženih pojedinaca te usporavanje širenja zaraze (Opal 2009). Dodatan problem je kompleksnost i raznolikost bioloških sustava zbog koje se ne mogu u potpunosti primijeniti već postojeći, već se stalno moraju dorađivati stari ili razvijati novi postupci suzbijanja zaraza sukladno novim saznanjima (Han 2015).

Taj dugi razvojni niz proteže se još od drevnih civilizacija u kojima su se, iako su često bili rizični, primjenjivali različiti postupci koji su se empirijski pokazali djelotvornima. U svjetlu priče o cjepivima, jedan od najranijih postupaka postizanja aktivne umjetno stečene imunosti je variolizacija. Variolizacija je podrazumijevala uzimanje krasti ili gnojnih plikova osoba zaraženih velikim boginjama kojima su se inokulirali zdravi ljudi, koji bi razvili mnogo slabije simptome, ali bi razvili otpornost na velike boginje. Procedura se razlikovala u različitim dijelovima svijeta. U Kini se od krasti pravio prah koji se ušmrkavao u nos. Vjeruje se da je Kina bila jedna od prvih civilizacija koja je koristila variolizaciju, ali je ušmrkavanje praha izazivalo jake glavobolje te se nije održalo u zapadnom svijetu. U Europi se inokulacija provodila nanošenjem infektivnog materijala, krasti ili gnojnih plikova, na rane zdravih pojedinaca pri čemu se smrtnost smanjila 15 puta, ali je i dalje na sto varioliziranih ljudi, od postupka umrlo dvoje (Boylston 2012). Danas tako velika smrtnost od postupka imunizacije ne bi bila prihvatljiva, ali misao vodilja ostala je ista: bolje spriječiti nego liječiti.

Patogeni, koji uzrokuju infektivne bolesti, napadaju druge organizme, ali su i sami organizmi pa je, zbog zajedničkih svojstava koje dijele svi organizmi, liječenje otežano i postupci eliminacije patogena nerijetko naštećuju zaraženom organizmu (Manns i sur. 2006). To je očito kod zaraza virusima, obligatnim unutarstaničnim parazitima, kod kojih je nužno uništiti permissivne stanice u koje je ušao virus da bi se suzbila bolest jer iz svake zaražene stanice može od jednog virusa nastati i do 10 000 novih virusnih čestica (Stray i Air 2001). Najmanju štetu u borbi protiv patogena, u većini slučajeva, čini sam zaraženi organizam, odnosno njegov imunostni sustav (Baxter 2007), stoga je razvijanje imunosti rano u povijesti medicine prepoznato kao bolji način obrane od zaraznih bolesti jer se sprječavaju ili višestruko umanjuju simptomi bolesti, poput plikova i ožiljaka u velikim boginjama (Timonius 1713), i izbjegavaju moguće nuspojave uzrokovane liječenjem.

Uspješnost organizma u obrani od napada patogena zove se imunost, koja može biti urođena za širi spektar patogena ili stečena za pojedinu usku skupinu patogena. Stečena imunost može se steći aktivno ili pasivno, na prirodan ili umjetan način. Aktivna imunizacija podrazumijeva aktivaciju limfocita T i B što se postiže prirodnim susretom organizma sa živim patogenom zbog prisutnosti zaraze u populaciji ili susretom s oslabljenim patogenom ili njegovim dijelovima kao dijelom protokola za umjetan razvoj imunosti. Aktivna imunizacija, osim što aktivira stečeni odgovor imunosnog sustava na patogen, omogućuje razvoj stanica imunosne memorije zbog koje je sljedeći doticaj s patogenom brži u njegovu suzbijanju. Pasivna imunizacija podrazumijeva unošenje molekula, najčešće antitijela, koje nije proizveo vlastiti imunosni sustav (Abbas i sur. 2018; Baxter 2007). Dakako, najviše prednosti u stjecanju imunosti ima aktivna umjetna imunizacija. Aktivna prirodna imunizacija može biti kobna za zaraženi organizam, a pasivna imunizacija, bilo prirodna, bilo umjetna, ne potiče imunosnu memoriju, stoga ne pruža dugotrajnu zaštitu.

Uz aktivnu umjetnu imunizaciju vežu se procesi upoznavanja i prepoznavanja patogena, odnosno prvi i svi naredni susreti imunosnog sustava s patogenom. Upoznavanje i prepoznavanje su mehanistički slični procesi jer oba procesa podrazumijevaju interakciju između molekula koja predstavljaju prisutnost patogena, poput molekula koje patogen izlučuje, molekula koje patogen sadrži na površini ili molekula koje se oslobađaju prilikom infekcije patogenom (Abbas i sur. 2018; Baxter 2007). Razlika je što upoznavanje dovodi do primarnog imunosnog odgovora, a prepoznavanje do sekundarnog koji se razlikuju u jačini, brzini, trajanju te molekulama, stanicama i dijelovima tijela koji su uključeni u imunosni odgovor (Abbas i sur. 2018). Budući da do kontakta patogena i organizma dolazi na molekularnoj razini, nije potreban intaktni virulentni patogen za indukciju imunosnog odgovora, već samo karakteristične molekule koje mogu pokrenuti imunosni odgovor – antigeni. To omogućuje umjetnu aktivnu imunizaciju. Antigeni imaju epitope – strukturno i kemijski definirane dijelove koje antigen-prezentirajuće stanice mogu pokazati na svojoj površini i koje može prepoznati pojedinačno antitijelo stvoreno iz jedne klonske linije plazmastanica. Epitopi su, stoga, važni za pokretanje imunosnog odgovora prilikom upoznavanja i prepoznavanja antigena, ali su također mjesta vezanja i djelovanja antitijela čime se antigen neutralizira, opsonizira ili razara sustavom komplementa (Abbas i sur. 2018; Baxter 2007). Strani antigeni se nalaze na intaktnim patogenima, oslabljenim, inaktiviranim patogenima ili samo njihovim dijelovima što je omogućilo razvoj preventivne medicine kroz povijest iako nisu bili poznati molekularni mehanizmi postizanja imunosti. Već spomenuta variolizacija, zatim vakcinacija, oslabljivanje patogena pasažiranje kroz druge organizme, inaktivacija patogena temperaturom ili kemikalijama – sve su to postupci kojima se kroz povijest dobivala smjesa za razvijanje imunosnog odgovora (Baxter 2007; Boylston 2012). Neki od tih postupaka više ne koristimo jer su prerizični ili nedovoljno efikasni, ali neke i dalje koristimo za dobivanje takve smjese za razvijanje imunosnog odgovora koja se danas naziva cjepivo (Baxter 2007).

Cjepivo sadrži antigen stran organizmu zbog kojeg se aktivira imunosni odgovor. Međutim, ne izazivaju svi antigeni imunosni odgovor na isti način pa se zbog razlike u putu imunosnog odgovora

razlikuje i jačina imunskog odgovora i razvitak imunodne memorije. Usporedbom proteinskih i ugljikohidratnih antigena jasno se uočava razlika u imunskom odgovoru. Strane proteine fagocitiraju dendritičke stanice i djelomično razgrađuju na dijelove koji se vežu na glavni kompleks histokompatibilnosti tipa 2 (eng. *major histocompatibility complex type II*, MHCII). Tako aktivirane dendritičke stanice putuju u limfnim žilama do limfnih čvorova gdje aktivirane dendritičke stanice aktiviraju nezrele pomoćničke limfocite tipa 2 (eng. *helper lymphocyte T type 2*, T_{H2}) i citotoksične limfocite T te ih potiču na umnažanje i djelovanje. Aktivirani limfociti T_{H2} aktiviraju limfocite B na proizvodnju antitijela specifičnih za antigen, prvenstveno IgM, a zatim promjenom izotipa antitijela i IgG (Abbas i sur. 2018; Baxter 2007; Chaudhary i sur. 2021). Za ugljikohidrate se dugo smatralo da izazivaju imunski odgovor neovisan o limfocitima T jer je slabiji od imunskog odgovora izazvanog proteinskim antigenom. Danas znamo da slaba imunogenost proizlazi iz slabe interakcije ugljikohidrata i MHCII, a ne iz slabe interakcije s limfocitima T (Avcı i sur.2013; Baxter 2007). Zbog toga manje limfocita B ostaje dio imunodne memorije i dolazi do rjeđe promjene izotipa antitijela što uzorkuje visok titar antitijela IgM, a nizak antitijela IgG te se od tri glavne funkcije antitijela (neutralizacija, opsonizacija, pokretanje sustava komplementa) efektivno provodi samo pokretanje sustava komplementa (Abbas i sur. 2018; Baxter 2007).

Glavne karakteristike koje cjepivo mora imati su dugotrajan imunski odgovor, ublažavanje ili potpuno uklanjanje simptoma u slučaju zaraze, što manje neželjenih nuspojava i brza i jeftina proizvodnja u kojoj se mogu mijenjati karakteristike cjepiva kako se patogen mijenja u populaciji (Chaudhary i sur. 2021). Iako postoje mnogi problemi vezani uz razvoj cjepiva na način da se sve glavne karakteristike cjepiva postignu, korisnicima cjepiva, koji često nemaju potpunu sliku vezanu za razvoj cjepiva, najbitniji je segment sigurnost jer su nuspojave dio razvojnog puta određenog cjepiva koji mogu izravno osjetiti na sebi. Sigurnost cjepiva ovisi o cjepivu samom, ali ovisi i o imunskom sustavu. Bilo u cjepivima s inaktiviranim i oslabljenim patogenima, bilo u cjepivima samo s dijelovima patogena, proteini su glavni antigeni koji potiču imunski odgovor. Ipak, postoje situacije kad je odgovor imunskog sustava prejak za krivi antigen, koji ne mora biti proteinskog porijekla. Alergije i autoimune bolesti su najpoznatiji primjeri pogrešivosti imunskog sustava. Alergije su preosjetljivosti na neštetne antigene iz peludi, hrane, prašine, kemikalija i slično, dok su autoimune bolesti preosjetljivosti na vlastite antigene te se razorna snaga imunskog sustava od obrane organizma pretvori u napad na vlastiti organizam (Abbas i sur. 2018). Velik problem predstavlja i preburna sekundarna imunodna reakcija, tzv. pojačanje ovisno o antitijelima (eng. *antibody-dependent enhancement*, ADE). Taj fenomen onemogućava izradu sigurnog cjepiva zato što cijepljenje, umjesto da dovede do smanjenja simptoma ili potpunog odsustva patološkog stanja, dovede do još jače imunodne reakcije koja traje predugo. ADE se ne javlja kod infekcija bilo kojim patogenom, stoga je vjerojatno vezan za zarazu pojedinim patogenom (Arvin i sur. 2020). Zbog kompleksnosti i razornosti imunskog sustava, bitno je razumjeti imunski sustav i kako cjepivo djeluje na njega zato što zbog procesa proizvodnje, osim željenog

antigena, cjepiva sadrže mnoge dodatne tvari – adjuvante, stabilizatore, vektore, tvari zaostale iz proizvodnog procesa, soli – koje mogu izazvati neželjenu imunsku reakciju (Baxter 2007).

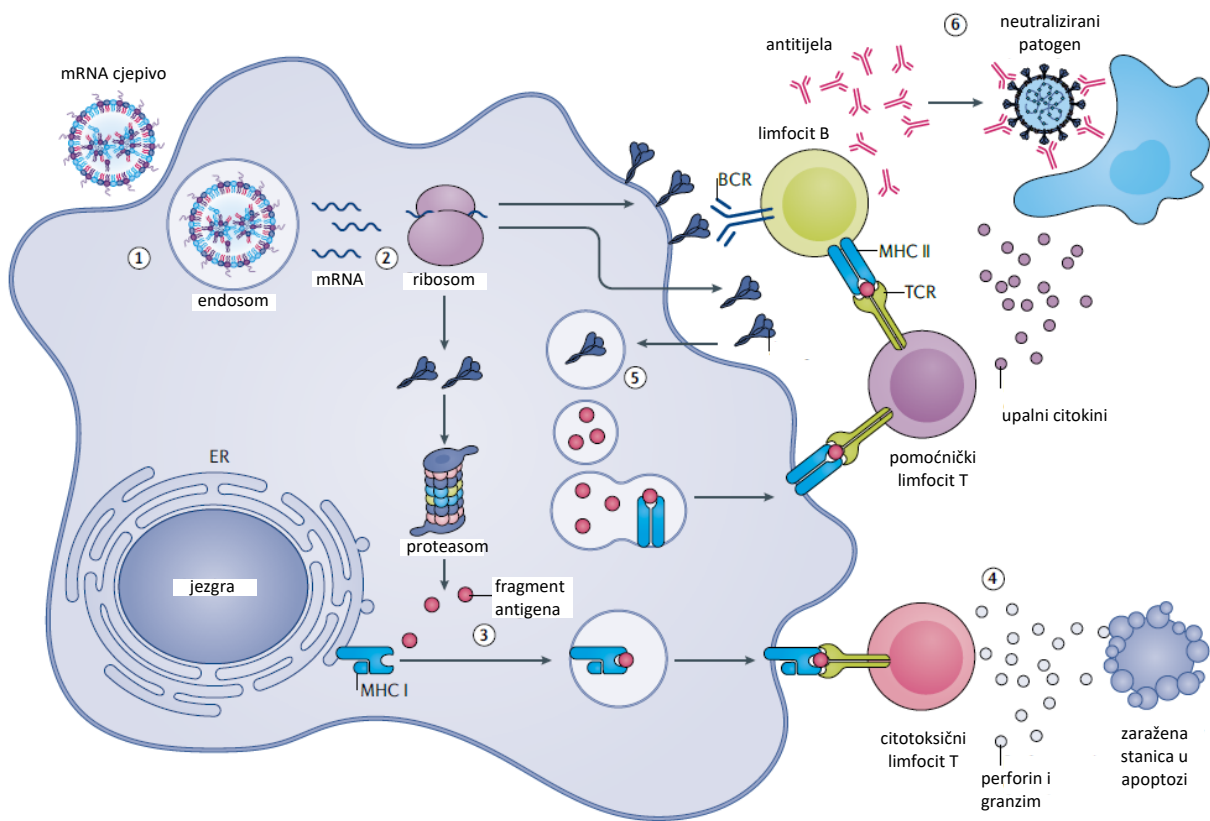
Do danas je razvijen veliki broj različitih cjepiva koja mogu sadržavati toksoidne, inaktivirane ili ubijene patogene, oslabljene patogene ili dijelove patogena (Baxter 2007). mRNA cjepiva su posebna po tome što sadrže nukleinsku kiselinu koja nije direktan antigen i nema svrhu izravnog uzrokovanja imunskog odgovora. Svrha mRNA molekule je prijenos informacije koja je pohranjena u linearnom nizu nukleotida kako bi u procesu translacije nastao protein koji će stanica izlučiti, prikazati na staničnoj membrani ili razgraditi na manje dijelove i prikazati na proteinima MCHII, ovisno o dizajnu cjepiva i vrsti stanica koja primi mRNA (Chaudhary i sur. 2021).

Svaki novostvoreni proizvod koji ulazi u organizam ima mane zbog kojih mora proći rigorozne provjere (Han 2015). Budući da su cjepiva stvorena u svrhu zaustavljanja velikih pandemija, prevencije široko rasprostranjenih bolesti ili čak eradicacija određenog patogena, očekuje se široka distribucija i česta primjena cjepiva zbog čega ono mora biti učinkovito, ali i vrlo sigurno. Najbolji primjer je pandemija bolesti COVID-19 izazvana virusom SARS-CoV-2 koja još uvijek traje zbog otpora javnosti prema stvorenim cjepivima pod izlikom navodno smrtonosnih nuspojava i nuspojava poput gubitka fertilnosti, komplikacija u trudnoći i razvoja neuropsihičkih bolesti poput autizma, skeptičnosti prema brzini promjene, izrade i provjere cjepiva, opasnosti od ugradnje mRNA u genom i osjećaja ograničavanja ljudske slobode. Iako navedene negativne konotacije nisu znanstveno potvrđene (De Rose i sur. 2022; Lifshitz i sur. 2022; Brondino i sur. 2021, Doerfler 2021), procjepljivanje ljudske populacije i stvaranje imunosti krda je usporeno i otežano jer cijepljenje nije obavezno, a velik se dio ljudi i dalje aktivno protivi ili samo pasivno izbjegava cijepljenje.

Cilj ovog rada je na jednostavan način objasniti temeljne dijelove mRNA cjepiva, kako oni utječu na naše tijelo, koje je optimizacije trebalo poduzeti kako bi cjepivo bilo efikasno i sigurno te kako se sintetizira mRNA cjepivo što objašnjava zašto ga se tako brzo proizvelo.

2.1. Koncept mRNA cjepiva

Središnja molekula mRNA cjepiva je jednolančana glasnička ribonukleinska kiselina (eng. *messenger ribonucleic acid*, mRNA). Budući da je molekula mRNA sklona hidrolizi, jako negativno nabijena te je organizam kao slobodnu molekulu može prepoznati i brzo razgraditi, mRNA se ne unosi u organizam kao samostalna molekula, već se nalazi u nanočesticama koje joj služe kao vektori (Chaudhary i sur. 2021). Takav je koncept cjepiva zahvalan iz više razloga, ali najvažniji su jednostavna sinteza molekule mRNA i mala količina različitih komponenti koje se jednostavno sklope u nanočesticu koja obuhvaća molekulu mRNA (Shepherd i sur. 2021). Iako sama molekula mRNA može izazvati imunosnu reakciju, ta je reakcija urođena, često se javlja kao odgovor na virusne infekcije i nije specifična jer do nje dolazi u prisustvu bilo koje molekule RNA s nemodificiranim nukleotidima (Mu i Hur 2021). Kao što je spomenuto u uvodu, molekula mRNA nema ulogu antigena u mRNA cjepivu, već služi za sintezu antigena na koji će tijelo reagirati aktiviranjem imunosnog odgovora. Točnije, imunogenost molekule mRNA je negativna strana cjepiva i pokušava se smanjiti što je više moguće jer se cjepivom pokušava aktivirati specifičan imunosni odgovor pa svaka dodatna pozadinska reakcija predstavlja trošenje resursa imunosnog sustava, a prejaka i dugotrajna aktivnost imunosnog sustava može dovesti do oštećenja tkiva i neželjenih simptoma (Mu i Hur 2021). Pravi antigen je protein koji je sintetiziran prema uputi molekule mRNA. Odabir proteina ovisi od patogena do patogena, a za isti patogen mogu se uzeti različiti proteini, različiti dijelovi istog proteina ili protein s modifikacijama na način da odgovora različitim konformacijama proteina u različitim fazama invazije patogena (Walls i sur. 2020; Wrapp i sur. 2020). S obzirom na to da cjepivo indirektno sadrži željeni antigen, jasno je da, od ulaska u tijelo, molekule iz cjepiva prolaze kroz različite procese kao što je prikazano na **Slici 1**. (Chaudhary i sur. 2021). To predstavlja problem jer, iako su temeljni procesi centralne dogme biologije i anatomije i fiziologije organizma i stanice poznati, znanstvenici su limitirani saznanjima o općim procesima koji stoje na putu između cjepiva unesenog u tijelo i aktiviranog specifičnog imunosnog odgovora. S druge strane, svaki međukorak na tom putu nudi mogućnost u optimizaciji cjepiva. Glavni procesi koje mRNA i nanočestice prolaze su ulazak u organizam sa što manjom imunosnom reakcijom, ulazak u stanice endocitozom, stapanje nanočestice s endosomom i ulazak mRNA u citoplazmu (endosomalni bijeg), translacija mRNA, sklapanje proteina, izlučivanje proteina ili prikazivanje proteina na površini stanice i razgradnja mRNA. Modifikacije napravljene na komponentama mRNA cjepiva i na procesima uključenim u proizvodnju doprinijeli su stabilnosti, efikasnosti i reguliranoj imunogenosti (Chaudhary i sur. 2021). Glavna istraživanja su provedena prije pandemije COVID-19 (Dolgin 2021), ali mRNA cjepiva za virus SARS-CoV-2, koji je uzrokovao pandemiju COVID-19, pokazala su mRNA cjepiva uspješnima i brzima za proizvodnju (Chaudhary i sur. 2021).



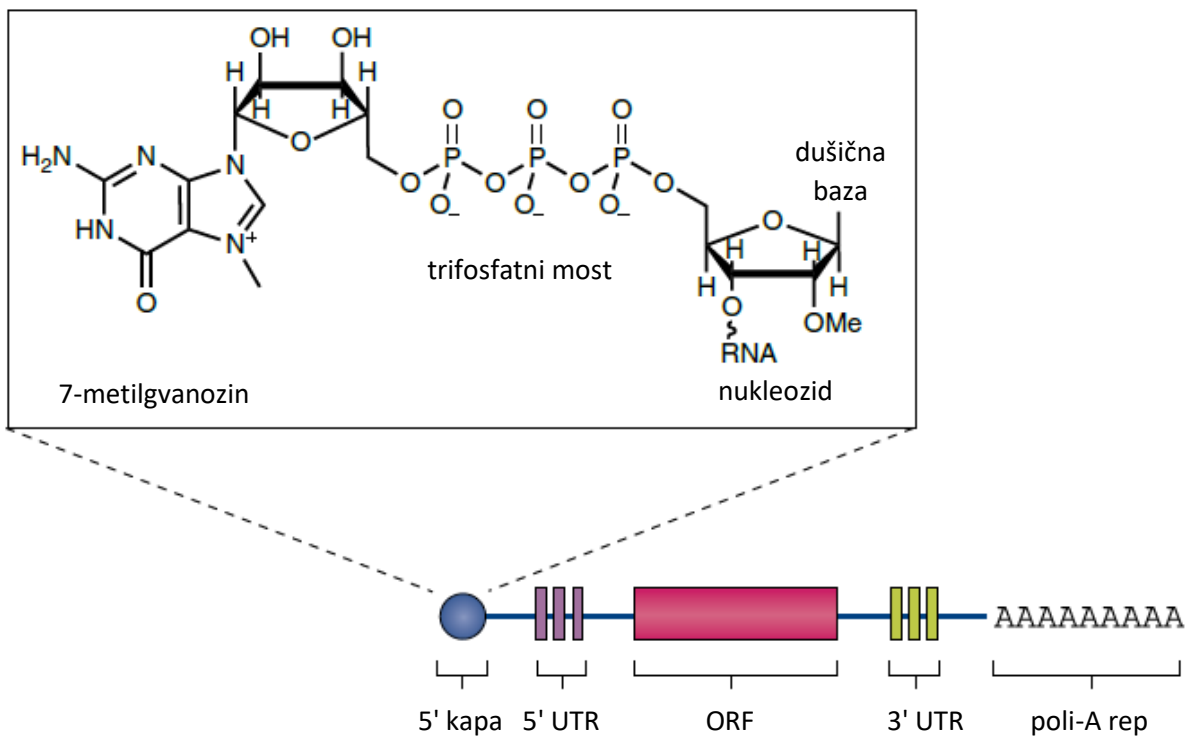
Slika 1. Glavni procesi koje mRNA i nanočestice prolaze u organizmu: (1) Nanočestice s mRNA ulaze endocitozom u endosom, a zatim endosomalnim bijegom u citoplazmu. (2) Antigenski protein stvara se translacijom mRNA na ribosomu. (3) Proteasomalnom razgradnjom protein se cijepa na manje fragmente koji se adsorbiraju na protein MCHI i prikazuju na površini stanice čime se aktiviraju citotoksični limfociti T. (4) Aktivni citotoksični limfociti T izlučuju perforine i granzime koji ubijaju zaraženu stanicu inducirajući apoptozu. (5) Fragmenti antigenskog proteina adsorbiraju se na MCHII i aktiviraju pomoćničke limfocite T. Intaktni antigenski protein izlaže se na površini stanice ili izlučuje te dolazi u kontakt s limfocitima B koji se aktiviraju kontaktom s pomoćničkim limfocitima T. (6) Pomoćnički limfociti T izlučuju upalni citokine koji reguliraju rad ostalih stanica imunskog sustava, a limfociti B izlučuju antitijela koja neutraliziraju patogen i pomažu makrofagima fagocitozu patogena (opsonizacija). (Preuzeto i prilagođeno iz: Chaudhary i sur. 2021)

2.2. Dijelovi mRNA cjepiva – mRNA

Molekula mRNA sastoji se od slijeda nukleotida koji možemo podijeliti na šećerno-fosfatnu okosnicu i slijed dušični baza koje nose informaciju za sintezu antigenskog proteina. U organizmima nastaje u procesima transkripcije i posttranskripcijske dorade (Voet 2010). Molekula mRNA koja se nalazi u mRNA cjepivima je umjetno sintetizirana, bez uporabe stanične kulture, pa se njezina sinteza mora prilagoditi na način da dobiveni produkt preživi u stanici i da ima željenu svrhu. Stanica, slično kao i imunostani sustav u organizmu, ima vlastite molekularne mehanizme za percepciju i obranu od stranih materijala, stoga sintetska molekula mRNA mora imati sve potrebne dijelove kao i prirodna mRNA u stanici (Mu i Hur 2021; Wadhwa 2020). Što se tiče arhitekture mRNA, postoje dvije glavne razlike u živom svijetu, prokariotska i eukariotska molekula mRNA, čija različitost proizlazi iz kompartmentizacije dijelova stanice u eukariotskim stanicama zbog čega transkripcija i translacija postaju prostorno i vremenski odvojeni procesi. Budući da se cjepiva stvaraju pretežito za potrebe humane medicine, cjepiva prate arhitekturu zrele eukariotske mRNA. Zrela eukariotska mRNA nužno sadrži samo jedan otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*, ORF), okolne netranslatirajuće regije (eng. *untranslating region*, UTR) te 5' i 3' krajnje strukture. ORF predstavlja slijed nukleotida koji nosi informaciju o primarnoj strukturi proteina, a okolne strukture su regulatorne strukture koje zaštićuju ORF od egzonukleaza s 5' i 3' kraja, omogućavaju započinjanje translacije, stabiliziraju mRNA i tako produžuju trajanje procesa translacije i povećavaju količinu nastalog proteina iz pojedine mRNA. Ipak, te iste regulatorne regije mogu sadržavati sekvencije koje prepoznaju mikro RNA molekule (eng. *micro RNA*, miRNA) koje navode proteinske kompleksne s endonukleazama koje mogu privremeno zaustaviti translaciju ili potaknuti hidrolizu šećerno-fosfatne okosnice i prekinuti translaciju te mRNA. Isto tako, uklanjanje krajnjih struktura potiče razgradnja mRNA i zaustavljanje translacije (Voet 2010). Prilikom dizajniranja mRNA pokušavaju se izbjeći ti regulacijski mehanizmi na načina da sintetska mRNA opstane što duže u stanici i da se po pojedinoj molekuli mRNA proizvede što više genskog produkta (Chaudhary i sur. 2021). Duža prisutnost strane mRNA u stanici u nekih je znanstvenika digla uzbunu jer bi zbog prisustva integrirajućih proteina aktivnih retrotranspozona takva mRNA mogla biti ugrađena u genom (Domazet-Lošo 2022), ali niti jedan eksperiment nije tu mogućnost dokazao (Doerfler 2021).

2.2.1. Šećerno-fosfatna okosnica

Molekula mRNA je građom RNA molekula, odnosno polimer ribonukleotida kojima su 3' i 5' ugljikovi atomi na kojima se inače nalaze hidroksilne skupine, povezani fosfodieterskom vezom (Voet 2010). Molekula mRNA je funkcijom prijenosnik genetičke informacije za sintezu proteina, ali osim informacije koja izravno služi za sintezu proteina, sadrži i druge dijelove prikazane na **Slici 2**. (Chaudhary i sur. 2021). Slobodna fosforna kiselina ima četiri kisikova atoma koja se mogu protonirati, ali u nukleinskim kiselinama dva se kisika nalaze u fosfoesterskoj vezi dok su slobodna samo dva



Slika 2. Temeljni dijelovi eukariotske molekule mRNA: otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*, ORF), okolne netranslatorne regije (eng. *untranslating region*, UTR) te 5' kapu i 3' poli-A rep. Krajnje strukture omogućavaju translaciju i štite od egzonukleaza i protuvirusnog odgovora. UTR reguliraju stabilnost i trajanje translacije mRNA. (Preuzeto i prilagođeno iz: Chaudhary i sur. 2021)

kisikova atoma. Budući da je fosfor fosfatne kiseline peterovalentan, jedan od kisikovih atoma trebao bi s atomom fosfora biti povezan dvostrukom vezom, a drugi jednostrukom vezom i imati dodatni elektron koji daje skupini negativan naboj (−1). Takav lokalizirani naboj lako može napasti hidronijev ion i prenijeti proton pri čemu bi se naboj fosfatne skupine neutralizirao i molekula RNA bi precipitirala. Ipak, to se ne događa jer se elektron, pa s njime i naboj fosfatne skupine, delokalizira između dva slobodna atoma kisika što čini deprotoniranu fosfatnu skupinu slabijim protonakceptorom, odnosno slabijom bazom, analogno karboksilnim kiselinama (DeRuiter 2005). U kontekstu fizioloških uvjeta, nukleinske kiseline su u pH uvjetima stanice deprotonirane i negativno nabijene što sprječava njihovu precipitaciju i omogućuje nespecifičnu interakciju s proteinima bogatim pozitivnim nabojem zbog bazičnih aminokiselina (Voet 2010). Također, to omogućuje nespecifičnu interakciju molekule mRNA i molekula nanočestice i korištenje istih nanočestica za cilo niz različitih mRNA (Chaudhary i sur. 2021).

Molekula mRNA, kao i svaka molekula RNA, smatra se intrinzički nestabilnom molekulom što je prva razina regulacije trajanja translacije u stanici. Hidroksilna skupina na 2' ugljikovom atomu riboze može autokatalizirati proces alkalne hidrolize šećerno-fosfatne okosnice i degradirati RNA čime se jednosmjerno prekida translacija (Voet 2010). Do degradacije ne mora doći samo tijekom translacije,

već može doći u bilo kojoj fazi mRNA cjepiva, od sinteze mRNA do translacije. Zbog toga su mRNA cjepiva dugo smatrana projektom koji neće uspjeti, ali uspješno djelovanje cjepiva potvrdilo je dovoljnu stabilnost molekule mRNA (Dolgin 2021; Sahin i sur. 2014). Poznato je da fleksibilna šećerno-fosfatna okosnica molekulama RNA omogućuje ravnotežnu promjenu konformacija i da postoji tzv. A konformacija u kojoj ne dolazi do alkalne hidrolize zbog čega je umanjen utjecaj alkalne hidrolize molekule RNA u smjesi molekula RNA. Takva je stabilizacija prisutnija u dvolančanih RNA molekula (Zhang i sur.2021), ali zbog slaganja baza može biti prisutna i u jednolančanih molekula (Voet 2010). Osim toga, jednolančane RNA molekule mogu se stabilizirati postizući različite sekundarne i tercijarne strukture iako takve strukture predstavljaju problem prilikom interakcije s inicijacijskim faktorima za translaciju i ribosomom pa ih se pokušava umanjiti prilikom dizajniranja mRNA (Leppek i sur. 2018). Uz potrebnu stabilizaciju nanočesticama i dodatnim modifikacijama molekule mRNA, mRNA cjepiva su se pokazala uspješnima u kliničkim ispitivanjima. Treba imati na umu da su istraživanja uvijek bazirana na eksperimentima te mnoga saznanja koja trenutačno imamo imaju samo empirijsku potporu i da mehanizmi nisu u potpunosti jasni u teoriji. Primjerice, ne zna se točno zašto je RNA molekula toliko postojana u cjepivu, ali budući da uspijeva dati zadovoljavajuće rezultate, razlog je vjerojatno kombinacija dovoljne količine mRNA, koju je lako postići zbog brze sinteze, i navedenih teorijskih objašnjenja poput povoljne konformacije, dizajna mRNA i stabilizacije nanočesticama.

2.2.2. ORF

ORF sadrži informaciju za samu sintezu proteinskog produkta pa su promjene i optimizacije u tom dijelu mRNA ograničene, ali ipak moguće. Informacija se prevodi iz nukleotidnog zapisa u slijed aminokiselina tako da kombinacija triju nukleotida kodira za jednu dvadeset aminokiselina. Ta tri nukleotida tvore jedan kodon. Više različitih kodona kodira jednu aminokiselinu zbog čega je genetički kod degeneriran. Prilikom procesa translacije kodon na mRNA se nalazi u akceptorskom mjestu u ribosomu na koje dolazi prijenosna molekula RNA (eng. *transfer RNA*, tRNA) kovalentno vezana za karboksilnu skupinu odgovarajuće aminokiseline. Budući da više kodona kodira za različitu aminokiselinu, mora postojati više različitih molekula tRNA koje nose istu aminokiselinu. Takve se tRNA nazivaju izoakceptorskim tRNA. Molekula tRNA se komplementarno veže za kodon dijelom koji se zove antikodon i sastoji se također od tri nukleotida. Prvi nukleotid antikodona je tzv. kolebljiva baza koja se može povezati s više od jedne baze jer je to povezivanje manje kontrolirano ribosomskim molekulama RNA (eng. *ribosomal RNA*, rRNA) u akceptorskom mjestu što objašnjava degeneriranost genetičkog koda. Ipak, u organizmu postoji preferencija prema određenim kodonima zbog različite količine pojedine vrste izoakceptorske tRNA. Česti kodoni komplementiraju s čestim aminoaciliranim tRNA i ubrzavaju translaciju što povećava prinos pojedine mRNA u proizvodnji proteina s obzirom na njenu ograničenu stabilnost (Voet 2010). To isprva zvuči dobro, ali rijetki kodoni također imaju svrhu u jednom od glavnih procesa koji prethode specifičnom imunom odgovoru – smatanje proteina.

Rijetki kodoni se često nalaze na granicama domena proteina gdje usporavaju proces translacije čime se omogućava pravilno smatanje proteina i postizanje njegove pravilne konformacije. Iako ORF jasno kodira za primarnu strukturu proteina, vidljivo je da utječe i na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina (Spencer i sur. 2012).

Odabir pojedinih kodona za istu aminokiselinu nije jedini način optimizacije ORF. Prije ovakve fine optimizacije bitno je odabrati što će se točno sintetizirati, koji će biti temeljni nukleotidni slijed koji će se kasnije poboljšavati. Hoće li se sintetizirati topljivi oblik proteina koji će stanice izlučivati u međustanični prostor ili transmembranski pa će ga stanice prikazivati na svojoj površini, hoće li se sintetizirati potpuni protein ili samo neki njegovi dijelovi, hoće li se sintetizirati modificirani protein koji je zakočen u jednoj konformaciji koju postiže u jednoj od faza, u kojoj fazi i koja konformacija će to biti – sve te odluke utječu na uspješnost cjepiva (Walls i sur. 2020; Wrapp i sur. 2020). Potpuni proteini mogu sadržavati epitope koji će potaknuti proizvodnju antitijela koja neće biti relevantna u borbi protiv patogena, a troše resurse imunskog sustava, ili mogu sadržavati epitope koji mogu djelovati supresorski na imunološki sustav kao posljedica evolucije patogena na imunski sustav domaćina. Zato se dijelovi proteina ili proteini usidreni u membranu i izloženi okolini samo određenim epitopima mogu pokazati boljima od solubilnih cjelovitih proteina (Baxter 2007). Imunogenost različitog odabira proteina može se pokazati dvama cjepivima protiv infekcije virusom SARS-CoV-2 proizvođača Pfizer i BioNTech, BNT162b1 i BNT162b2. Oba su cjepiva potakla aktivnost limfocita T i B te proizvodnju antitijela, ali je cjepivo BNT162b2 pokazalo manje sustavne simptome i manja lokalna oštećenja tkiva. BNT162b1 sadrži trimerizirani, topljivi oblik domene virusnog proteina šiljka koji se veže za receptor, a BNT162b2 sadrži cjeloviti glikoprotein s modifikacijom koja ga je blokirala u konformaciji kakvu postiže neposredno prije stapanja s membranom stanice (Chaudhary i sur. 2021; Walls i sur. 2020; Wrapp i sur. 2020).

I dalje velik problem ostaje određivanje antigena koji će kodirati mRNA, pogotovo u patogena koji se brzo mijenjaju, poput virusa gripe tipa A (Scholtissek 1994), ali i kod mRNA terapeutika protiv raka jer i stanice raka imaju visoku stopu proliferacije i mutagenosti zbog koje se potomci nakon nekoliko generacija stanica raka mogu znatno razlikovati od početne stanice (Mroz i Rocco 2017).

2.2.3. Krajnje 5' i 3' strukture

Strukture na samim 5' i 3' krajevima molekule su bitne jer sprječavaju razgradnju mRNA egzonukleazama, interakcijom s inicijacijskim faktorima započinju translaciju te sprječavaju aktivaciju protuvirusnog odgovora u stanici (Wadhwa i sur. 2020). Inicijacijski faktori stupaju i međusobno u interakciju pa je kompleks mRNA s proteinima za translaciju kružan. Takva je struktura preduvjet za uspješan početak translacije, ali i budući da 5' i 3' krajevi nisu slobodni, egzonukleaze nemaju supstrat za koji bi se vezale i mRNA je tokom translacije zaštićena od razgradnje. Na 5' kraju molekule mRNA eukariota nalazi se 7-metilgvanozinska kapa povezana s prvim nukleotidom na 5' kraju 5'-5' trifosfatnom

vezom, a prvi ili prva dva nukleotida su metilirana na 2' hidroksilnoj skupini u molekuli mRNA sisavaca. Takva O-metilacija kod sisavaca je dodatan biljeg za vlastitu mRNA, stoga mRNA koje imaju kapu bez takve metilacije u sisavaca izazivaju reakciju sličnu reakciji na prisutnu virusnu RNA (Zhong i sur. 2018). Kapa se može dodati zajedno s metilacijom prvih dvaju nukleotida kotranskripcijski ili posttranskripcijski koristeći enzime posebno za dodavanje kape i posebno za 2'-O-metilaciju prvih dvaju nukleotida. Kotranskripcijska modifikacija mRNA ubrzava proces sinteze zrele mRNA, ali budući da je za sintezu RNA i kape potreban gvanozin, zabilježena je kompeticija za supstrat između transkripcije i sinteze kape zbog čega nastaje dio mRNA s kapom, a dio bez i predstavlja gubitak i imunogeno središte. S druge strane, modifikacija mRNA u više koraka usporava proces proizvodnje, ali je postotak nemodificiranih mRNA zanemarivo malen (Ramanathan i sur. 2016).

Na 3' kraju se nalazi dugi niz adenina (poli-A rep) koji ima istu ulogu kao i kapa – stupa u interakciju s poli-A-vezajućim proteinima i posredno s inicijacijskim faktorima za translaciju čime se postiže cirkularni kompleks mRNA i proteina što započinje translaciju i čuva krajeve mRNA od egzonukleaza (Wadhwa i sur. 2020). Neke polimeraze imaju vlastitu poliadenilacijsku aktivnost neovisnu o kalupu, ali tako nastaju molekule mRNA različite duljine repa pa različite i nekonzistentne aktivnosti (Eberle i sur. 2020), a različita duljina mRNA otežava i pročišćavanje mRNA molekula tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography* HPLC) (Weissman i sur. 2013). Zato većina proizvođača uključuje poliadeninski slijed već u plazmid čime se može postići optimalna duljina poliA slijeda od otprilike 100 adenina (Chaudhary i sur. 2021).

2.2.4. Netranslatirajuće regije

Netranslatirajuće regije, UTR, koje okružuju ORF s 5' i 3' strane imaju važnu regulatornu ulogu. Pokušava se definirati točna uloga UTR u regulaciji translacije i način na koji se to može zaključiti iz slijeda nukleotida UTR. Istraživanja se sve više vrše pomoću računalnih programa koji s obzirom na danu bazu podataka mogu puno brže od ljudi stvoriti uzorak i naučiti predviđati strukturu i ulogu UTR iz njene sekvencije (Sample i sur. 2019). Prilikom dizajniranja mRNA pokušavaju se izbjeći slijedovi u 5' i 3' UTR koji dovode do stvaranja sekundarnih i tercijarnih struktura jer takve strukture mogu spriječiti interakciju s proteinima poput inicijacijskih faktora translacije i pogoršati efikasnost cjepiva (Leppek i sur. 2018). Kako je to područje još uvijek u začetku, za trenutna mRNA cjepiva koriste se 5' i 3' UTR regije mRNA za sintezu poznatih, jako zastupljenih proteina, poput α i β globina. Ipak, istraživanja pokazuju da je za pojedinu mRNA moguće eksperimentalno odrediti 5' i 3' UTR koji najviše odgovaraju za najveću sintezu proteina s te mRNA uzimajući u obzir i različitu vrstu stanice. Otkriveno je da isti UTR može različito utjecati na translaciju u ovisnosti o proučavanom tipu stanice te se tako korištenjem određenog UTR može ciljano poboljšati translacija u pojedinoj vrsti stanica (Orlandini von Niessen i sur. 2019). To je slično različitom utjecaju modificiranih baza na translaciju u različitim stanicama. Osim toga, počinju se otkrivati i druge uloge UTR osim regulatorne kao što je stanična lokalizacija. Pod

alternativnu obradu mRNA spada i različita interpretacija mjesta za započinjanje poliadenilacijskog repa koja stvara različite varijante mRNA koje se razlikuju samo u 3' UTR regiji. Berkovits i Mayr (2015) su pokazali kako protein CD47, inače zaslužan za sprječavanje fagocitoze vlastitih stanica, može biti lokaliziran u citosolu ili na staničnoj membrani. Lokalizacija na staničnoj membrani inače se događa kotranslacijskim pozicioniranjem proteina na membrani endoplazmatskog retikuluma te putovanjem takvog proteina na membrani vezikule koja se fuzionira sa staničnom membranom i tako dovodi protein na površinu stanice (Alberts 2008). U ovom slučaju dugi 3' UTR služi kao mjesto regrutacije proteina koji će novosintetizirani protein dovesti na površinu stanice dok protein sintetiziran s mRNA s kratkim 3' UTR ostaje u citosolu (Berkovits i Mayr 2015). Ovakvo posttranslacijsko pozicioniranje proteina pomoću UTR nije još iskorišteno u tehnologiji mRNA cjepiva, ali nudi zanimljivu mogućnost za optimizaciju cjepiva.

2.2.5. Imunogenost mRNA

Već je spomenuto kako nedostatak nužnih dijelova mRNA može dovesti do razgradnje mRNA zbog vlastite nestabilnosti, staničnih egzonukleaza, endonukleaza i blokatora translacije koji su dio staničnih obrambenih mehanizama od stranog materijala i dio sustava koji regulira translaciju i stvaranje pojedinog genskog produkta. Molekula mRNA se sintetizira *in vitro*, bez uporabe staničnih kultura, koristeći plazmid kao kalup s nukleotidnim slijedom odgovarajućim željenoj mRNA i promotorom za određenu DNA-ovisnu RNA polimerazu, modificirane nukleotide i enzime za sintezu mRNA i doradu njenih krajeva (Chaudhary i sur. 2021). Cilj tog procesa je nastajanje jednolančane, zrele, eukariotske mRNA. Takav način sinteze ubrzava proizvodnju, ali i omogućava modularnost jer se na jednostavan način, nakon identifikacije novog antigena prilikom izbijanja nove varijante, može stvoriti novi plazmid s kojeg će se prepisivati nova mRNA. Nova mRNA i novo cjepivo moraju ponovno proći kroz sigurnosne provjere (Han 2015), ali proces je mnogo brži nego kad se cjepivo proizvodili *ab ovo*.

Glavni problem prilikom sinteze mRNA je nastajanje molekula RNA koje pobuđuju obrambene mehanizme u stanici, a nastaju kao nusprodukti sinteze mRNA *in vitro*, poput dvolančanih mRNA i mRNA bez zaštitnih elemenata na svim mRNA, ili zbog nedovoljno optimiziranog mRNA dizajna (Chaudhary i sur. 2021; Mu i Hur 2021).

2.2.5.1. Dvolančane molekule RNA

Zašto je nastanak dvolančanih molekula RNA (eng. *double-strand RNA*, dsRNA) problem i kako nastaju? U životinjskim stanicama RNA u citoplazmi nije dvolančana pa je prisutnost dsRNA ekvivalentna prisutnosti stranog genetičkog materijala u stanici virusnog podrijetla. Zato su se evolucijski razvili geni čiji produkti detektiraju dsRNA, čine dio signalnog puta i na kraju potiču protuvirusni odgovor stanice koji najčešće uključuje stvaranje interferona tipa I (IFN-I) i upalnog

nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) te zaustavljanje translacije proteina djelovanjem fosforiliranih inicijacijskih faktora ili degradacijom ukupne RNA u stanici i apoptozu stanice (Mu i Hur 2021). Time se može uključiti urođena nespecifična imunost koja može izazvati neželjene simptome nakon cijepljenja zbog čega se to pokušava izbjeći.

U stanici postoji sustav receptora koji ne detektiraju točno određene molekule, već samo skupinu molekula, poput dsRNA, stoga se zovu receptori za prepoznavanje uzoraka (eng. *pattern recognition receptors*, PPR) jer prepoznaju specifične karakteristike zajedničke svim molekulama te skupine. Dva glavna kaskadna puta čiji receptori za prisutnost dsRNA spadaju u skupinu PPR su citoplazmatski RLR (eng. *RIG-I-like receptors*) i endoplazmatski TLR (eng. *Toll-like receptors*) (Mu i Hur 2021). Obje su skupine proteina važne jer su lokalizirane upravo u dijelovima stanice u kojima će se sintetska mRNA naći, u citoplazmi i endosomu prilikom endosomalnog bijega. RLR proteini prepoznaju 5'-trifosfate, 5'-disfosfate i šećerno-fosfatnu okosnicu dsRNA bez obzira na slijed nukleotida stvarajući proteinski filament oko dsRNA. Takav filament je zatim nukleacijsko središte za stvaranje bočnog proteinskog filameta koji dalje pokreće kaskadni put. RLR imaju ATPaznu aktivnost koja regulira stvaranje i razaranje filameta oko dsRNA što određuje minimalnu i optimalnu duljinu dsRNA za stvaranje filameta (Wu i sur. 2014). RLR obuhvaćaju širok raspon veličina prepoznatih dsRNA jer postoje posebni receptorski proteini koji spadaju u RLR, ali se razlikuju u točnom mjestu, mehanizmu i duljini dsRNA koju vežu. Primjerice, protein RIG-I (eng. *retinoic acid-inducible gene 1*) i protein MDA5 (eng. *melanoma differentiation-associated 5*) pripadaju citoplazmatskim RLR s time da RIG-I veže kraće dsRNA, optimalno u rasponu 40 – 150 parova baza, dok MDA5 veže dsRNA veličine oko 1000 parova baza (Mu i Hur 2021). TLR pokazuju još veću raznolikost. Lokalizirani su na unutrašnjoj strani endosomalne membrane. TLR3, slično proteinima RLR, na nespecifičan način prepoznaje dsRNA vezanjem na šećerno-fosfatnu okosnicu, ali ne dolazi do stvaranje proteinskih filamenata, već dimerizacija TLR3 pokreće signalni put. TLR7 i TLR8 su drugačiji od navedenih receptora jer su specifični za sljedove nukleotida koji su bogati uracilom pri čemu dimeriziraju ili samo vezanje unaprijed postojećeg dimera pokreće signalni put (Blasius i Beutler 2010; Mu i Hur 2021).

Kako bi se riješili ovi problemi pokušava se smanjiti udio dsRNA u smjesi sintetske mRNA i uporabom modificiranih nukleotida smanjiti imunogenost posebnih sljedova nukleotida jer su u živim bićima nukleotidi molekula RNA često modificirani modifikacijama koje ne utječu na komplementarno sparivanje (Moore i sur. 2013).

Dvolančane RNA nastaju prilikom *in vitro* sinteze mRNA s plazmidnog kalupa zbog RNA-ovisne sinteze RNA i zbog promotor-neovisne sinteze *antisense* molekula RNA koje se nakon pročišćavanja povezuju za *sense* molekule mRNA (Mu i Hur 2021). RNA-ovisna sinteza RNA podrazumijeva da nakon terminacije transkripcije 3' kraj *sense* mRNA ostaje vezan za RNA polimerazu, ali se ona odvaja od plazmidnog kalupa. Zatim zbog vrlo fleksibilne okosnice jednolančane RNA dolazi do okreta za 180° i RNA polimeraza zahvaća uzvodni već sintetizirani dio mRNA za koju je prihvaćena na 3' kraju i koristi ju kao kalup za nastavak sinteze RNA (Gholamalipour i sur. 2018). Tako nastaje

dsRNA s jednolančanom omčom. Istraživanja su pokazala da polimerizacija pri povišenoj temperaturi i kodiranje poliadenilnog repa u plazmidu smanjuje afinitet DNA-ovisne RNA polimeraze prema RNA kalupu i pospješuje proces terminacije transkripcije, ali ne sprječava promotor-neovisnu sintezu *antisense* RNA i dimerizaciju *sense* i *antisense* RNA nakon pročišćavanja (Wu i sur. 2020). Promjenom uvjeta reakcije polimerizacije otkriveno je da povišena količina Mg^{2+} povećava količinu *antisense* RNA, stoga se pretpostavlja da magnezijevi ioni na neki način stabiliziraju konformaciju RNA polimeraze u fazi elongacije koja se nakon terminacije *sense* transkripcije može ponovno vezati za drugi lanac plazmida, bez promotora, jer je elongacijska konformacija zadržana (Mu i sur. 2018). Također, osim promjena uvjeta, moguće je promijeniti i enzim. Najčešće je korištena RNA polimeraza iz virusa T7, ali kako bi se reakcija mogla provesti pri nižim uvjetima, istraživala se sinteza RNA koristeći RNA polimerazu psihorfilnog bakteriofaga VSW-3. Rezultati su pokazali smanjen udio dsRNA čak i na temperaturama nižim od sobne temperature (Xia i sur. 2020).

2.2.5.2. Modificirane baze

Za smanjenje imunogenosti molekula RNA veliku ulogu imaju modificirane dušične baze. Dosad su zabilježene prirodno i sintetski modificirane baze poput pseudouridina (ψ), N6-metiladenozina (m6A), 5-metilцитидина (m5C), 2-tiouridina (s2U) i N1-metilpseudouridina (m1 ψ) (Karikó i sur. 2005). Modifikacije mogu spriječiti pokretanje upalnog odgovora ili utjecati na proces translacije neovisno o upalnom odgovoru. Modifikacije dušičnih baza umanjuju vezanje TLR7 i TLR8 i sličnih proteina koji osim okosnice dijelom prepoznaju i specifičnosti u slijedu nukleotida i tako ne dolazi do sinteze proteina upale (Karikó i sur. 2005). Takve modifikacije mogu smanjiti aktivnost RIG-I i TRL3 proteina (Korman i sur. 2011), ali ne sprječavaju proteine koji prepoznaju samo okosnicu dsRNA, poput proteina MDA5 (Wu i sur. 2013), što znači da je uz uporabu modificiranih baza i dalje potrebno što bolje sprječavati nastajanje dsRNA. Modifikacije koje smanjuju imunogenost pokazale su povećanu uspješnost molekula mRNA u cjepivima u usporedbi s cjepivima koja ne koriste modificirane nukleotide. Primjerice, cjepiva za virus SARS-CoV-2 proizvođača Pfizer-BioNTech i Moderna sadrže molekule mRNA kojima su svi uridini zamijenjeni s m1 ψ , dok cjepiva proizvođača CureVac sadrže molekule mRNA s nemodificiranim nukleotidima, ali maksimalno smanjenom količinom uridina. Cjepivo proizvođača CureVac je termostabilnije, ali pokazuje upola manju efikasnost u završnim fazama kliničkih ispitivanja (Chaudhary i sur. 2021). Modifikacije mogu utjecati na proces translacije neovisno o upalnom odgovoru jer različito utječu na translaciju u različitim stanicama dok je RNA-uzrokovan upalni odgovor zajednički svim stanicama (Mu i Hur 2021). Osim utjecaja modificiranih nukleotida na mRNA u stanici, zabilježeno je smanjenje dsRNA produkta prilikom *in vitro* sinteze mRNA korištenjem modificiranih nukleotida (Mu i sur. 2018).

2.3. Dijelovi mRNA cjepiva – nanočestice

Uz sve probleme vezane za stabilnost i imunogenost molekule mRNA, jasno je da mRNA cjepiva ne mogu biti samo otopine mRNA, već ona mora biti zapakirana u vektoru koji će je zaštititi od vanjskih utjecaja. Budući da je taj vektor prvi u dodiru s organizmom, treba zadovoljavati određene uvjete: ne smije biti imunogen ni citotoksičan, ali mora moći ući u stanicu (Chaudhary i sur. 2021). Tehnike unosa nukleinske kiseline poznate su već od 1960-ih godina jer su se koristile za *in vitro* transfekciju stanica. Do danas postoji mnogo metoda *in vitro* unosa nukleinske kiseline, problem je jedino što su te tehnike vrlo izravne, grube i neprimjenjive za unos nukleinske kiseline *in vivo* (Hajj i Whitehead 2017). Kod *in vivo* unosa, mnogo je manja kontrola nad procesima pronalaska ciljne stanice i ulaska u stanicu (Nguyen i Szoka 2012) pa razumijevanje i usavršavanje tih dvaju procesa čini bitan dio u današnjim istraživanjima. Vektori za unos nukleinskih kiselina dijele se na virusne i nevirusne vektore s time da se virusni vektori sve više izbjegavaju jer mogu dovesti do imunosne reakcije te ugradnjom u genom mogu izazvati mutagenezu i kancerogenezu (Chaudhary i sur. 2021, Nguyen i Szoka 2012). Zato se sve više koriste nevirusni vektori – nanočestice.

Nanočestice su male čestice u nanometarskoj i mikrometarskoj skali, vrlo su raznolike u građi te se mogu podijeliti na lipidne nanočestice, nanočestice na bazi polimera, nanočestice na bazi skvalena i nanočestice s različitim proteinima koji potiču penetraciju u stanicu ili antitijela koja ciljaju određene stanice. Najkorištenije, najprosperitetnije i najistraženije su lipidne nanočestice jer ostale vrste nanočestica pokazuju citotoksična svojstva ili imaju kompliciraniju sintezu pa nisu toliko često korištene koliko lipidne nanočestice. Upravo su lipidne nanočestice korištene kao vektori u mRNA cjepivima za prevenciju zaraze virusom SARS-CoV-2 proizvođača Pfizer-BioNTech i Moderna (Chaudhary i sur. 2021). Lipidne nanočestice građene su od četiri skupine molekula: ionizirajući lipidi, kolesterol, pomoćni lipidi i lipidi konjugirani s polietilenglikolom (Kim i sur. 2021). Svaka skupina ima ulogu i daje prostora za optimizaciju nanočestice prema željenom učinku.

2.3.1. Ionizirajući lipidi

Glavni dio lipidnih nanočestica su ionizirajući lipidi, amfipatske molekule s polarnom glavom koja je izložena vodenom mediju i hidrofobnim repovima uklopljenima u lipidni dvosloj nanočestice. Ionizirajuće lipide karakterizira neutralni naboj u pH koji odgovara fiziološkim uvjetima u krvi i stanici, ali pozitivan naboj pri nižim pH vrijednostima. Mogućnost posjedovanja pozitivnog naboja ključna je za pakiranje i stabilizaciju mRNA molekule koja je zbog šećerno-fosfatne okosnice polianion (Voet 2010). Također, membrane stanice su bogate negativno nabijenim molekulama na necitoplazmatskoj strani pa pozitivan naboj nanočestice pomaže u fuziji membrana prilikom endosomalnog bijega. Danas se koriste neutralne nanočestice pa, iako nanočestica u vanstaničnom prostoru nije pozitivno nabijena,

u eksperimentima s modelnim membranskim sustavima pokazana je uspješna fuzija neutralnih nanočestica s membranom (Bailey i Cullis 1994).

Do fuzije nanočestica sa stanicom može doći odmah na površini stanica, ali češće predlagan mehanizam je endocitoza cijele nanočestice i zatim endosomalni bijeg. Endosom je endoplazmatski membranski sustav koji nastaje nakon endocitoze te se sazrijevanjem sve više zakiseljuje do pH vrijednosti oko 5 – 6 kada se spaja s lizosomom i sadržaj se razgrađuje lizosomalnim kiselim hidrolazama (Alberts 2008). Do endosomalnog bijega mora doći prije spajanja endosoma s lizosomom (Kim i sur. 2021). Prilikom zakiseljavanja endosoma protoniraju se ionizirajući lipidi nanočestice i njihov pozitivan naboj ionskim silama poveže se s negativno nabijenim lipidima unutrašnjosti endosoma. Te ionske sile destabiliziraju lipidni dvosloj nanočestice i endosoma jer se na granici membrana, koje su u početku bile paralelni lipidni dvosloji u tzv. lamelarnoj konformaciji, pozitivno i negativno nabijeni lipidi počinju stvarati strukture slične micelama, tzv. heksagonalna konformacija. Nestabilna heksagonalna konformacija se stabilizira fuzijom membrana jer se tada i pozitivno nabijeni i negativno nabijeni lipidi na istoj strani dvosloja stabiliziraju lateralnim ionskim vezama nabijenih glava (Nguyen i Szoka 2012).

Ionizirajućim lipidima prethodili su nanočestice s kationskim lipidima. Treba uvijek imati na umu da je organizam naviknut na stanje koje je uobičajeno, a svaka promjena može izazvati imunosnu reakciju – na razini lipida i naboja uobičajeno je da su lipidi, glikolipidi i glikoproteini na vanjskoj strani stanične membrane neutralni ili negativno nabijeni (Voet 2010), stoga pozitivan naboj na nanočestici u vanstaničnom prostoru izaziva imunosnu reakciju. To je bio glavni problem s kationskim lipidima – potiču stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, otpuštanje kemokina i citokinina, aktivaciju kaspaza, MAP kinaza, NF- κ B signalnog putem što sve vodi do upalnog odgovora i apoptoze stanica (Lonez i sur. 2012). Razvoj ionizirajućih lipida iz kationskih lipida u početku je tekao sporo, ali razvojem terapeutika, koji zahtijevaju prijenos lipidnim nanočesticama, sve se više radi na stvaranju raznolikih ionizirajućih lipida i istraživanju za koju su upotrebu pojedini sintetizirani lipidi najpogodniji. Pokazano je da neke vrste lipida, koje karakterizira ciklička struktura u glavi ili repovima, mogu služiti za ciljanu administraciju u limfocite T (Lokugamage i sur. 2019; Zhao i sur. 2020) ili aktivirati maturaciju dendritičkih stanica imunosnog sustava i antitumorski odgovor (Miao i sur. 2019).

2.3.2. Kolesterol

Kolesterol kao i u biološkim membranama stabilizira nanočestice sprječavajući prejakom i preslabu lateralnu difuziju lipidnih molekula u lipidnom dvosloju nanočestice. Dodatan napredak je korištenje različitih derivata kolesterola. Kolesterol se unosi hranom te hilomikronima dolazi do jetre ili se sintetizira, pretežito u stanicama jetre. Zatim se lipoproteinima male gustoće (neg. *low-density lipoprotein*, LDL) prenosi iz jetre do svake stanice tijela (Goedeke i Fernandez-Hernando 2012). LDL se vežu za LDL-receptor i ulaze u stanicu endocitozom. U kasnom endosomu nalazi se par proteina

Nieman-Pick, tip C1 (NPC1) i tip C2 (NPC2), koji su odgovorni za vezanje i endosomalni bijeg kolesterola. Međutim, postoji NPC1-ovisna regulacija unosa kolesterola zbog koje se do 70% LDL, zajedno s kolesterolom, vraća u krvotok, odnosno prilikom unosa nukleinskih kiselina nanočesticama s prirodnim kolesterolom do 70% nanočestica je vraćeno u krvotok što uvelike smanjuje uspješnost unosa nukleinske kiseline. Korištenje derivata kolesterola povećala je uspješnost prijenosa, vjerojatno zbog smanjene interakcije s proteinom NPC1 (Patel i sur. 2020).

2.3.3. Pomoćni lipidi

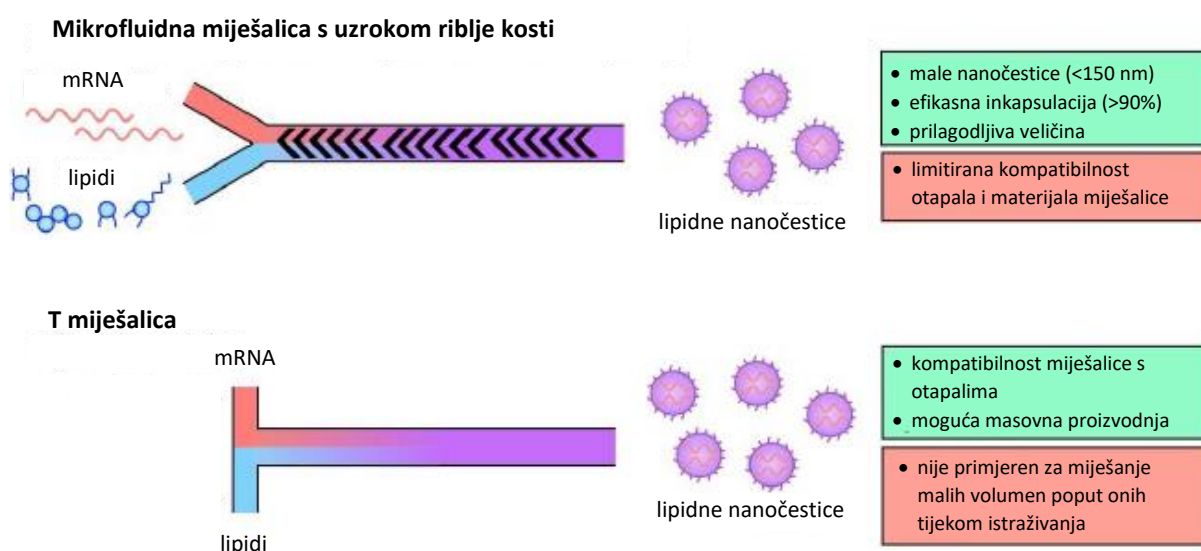
Pomoćni lipidi imaju sličnu ulogu kao kolesterol, održavanje optimalne fluidnosti membrane čime se olakšava fuzija nanošestice s endosomalnom membranom. To su često fosfolipidi ili slični lipidi koji mogu imati zasićene ili nezasićene repove pri čemu je pokazano da zasićeni lanci pogoduju unosu kratkih, a nezasićeni lanci unosu dugih RNA (Ball i sur. 2018; Kauffman i sur. 2015).

2.3.4. Polietilen-glikolirani lipidi

Zadnja komponenta lipidnih nanočestica je polietilen-glikol (PEG) kovalentno vezan za lipid koji ga usidruje u lipidni dvosloj nanočestice. Te molekule mogu difundirati iz dvosloja nanočestice u okolnu otopinu, a njihov poluživot ovisi o broju ugljikovih atoma u ugljikovodičnim repovima usidrujućeg lipida i molarnoj masi PEG. Veći broj ugljikovih atoma u usidrujućem lipidu i veća molarna masa polimera PEG pojačava stabilnost s okolnim lipidnim dvoslojem. To izolira nanočestice od međusobnog spajanja i tako regulira veličinu nanočestica, ali sprječava fuziju nanočestica i s endosomalnom membranom čime se smanjuje unos mRNA, ali i produžuje prisutnost nanočestica u krvotoku (Semple i sur. 2001). Stabilizacija nanočestica, stoga, uzrokuje dvije posljedice koje su međusobno oprečne te se eksperimentalno treba odrediti optimalna veličina obaju dijelova. Primjerice, za cjepiva proizvođača Pfizer-BioNTech i Moderna usidrujući lipidi sadrže 13 i 14 ugljikovih atoma u ugljikovodičnim repovima, a molarna masa PEG iznosi 2000 Da (Kim i sur. 2021).

2.4. Sinteza nanočestica

Lipidne nanočestice imaju jednostavan plan građe i jednostavno se sintetiziraju, a sa sve većim obimom istraživanja, povećava se biblioteka različitih lipida koji se mogu koristiti za različite svrhe jer je u početku razvoja lipidnih nanočestica nepostojanje velike raznolike uporabljivih ionizirajući lipida bilo glavni problem u daljnjem napretku (Chaudhary i sur. 2021). Molekula mRNA sintetizirana *in vitro* otopljena je u kiseloj (pH = 4) otopini citrata ili acetata, a lipidne komponente otopljene su u etanolu (Chaudhary i sur. 2021). Cijevi otopina se spajaju i otopine se miješaju u plosnatom proširenju koje u središtu ima statične izbojke okomite na smjer strujanja tekućina zbog čega nalikuje na riblje kosti (eng. *staggered herringbone micromixer*, SHM) i koji miješa ubačene tekućine u roku mikrosekundi (Shepherd i sur. 2021). Prilikom miješanja pri niskoj pH vrijednosti ionizirajući lipidi se nabijaju i privlače negativno nabijenu mRNA, a hidrofobni efekt omogućava stvaranje nanočestica s lipidnim dvoslojem na površini i mRNA u središtu. Ipak, zbog potrošivosti SHM u dodiru s etanolom, za povećanje proizvodnje sve se više koriste T miješalice koji se ne troše, a daju slične rezultate. Shematski izgled i karakteristike prikazani su na **Slici 3**. (Shepherd i sur. 2021). Budući da sinteza ne zahtjeva kulturu stanica, to smanjuje količinu neželjenih spojeva koji mogu zaostati nakon pročišćavanja i omogućava lakšu optimizaciju procesa. Nebiološki sustavi su mnogo jednostavniji od živih, bioloških sustava jer je u nebiološkim sustavima puno jasnija uzročno-posljedična veza između promjene određenog parametra i dobivenog rezultata. Tako se reguliranjem uvjeta miješanja poput brzine protjecanja svake od smjesa komponenata i brzine ukupne smjese može odrediti oblik, veličina, uniformnost veličine i efikasnost punjenja nanočestica (Shepherd i sur. 2021).



Slika 3. Shematski prikaz i važne karakteristike miješalice korištene u sintezi nanočestica miješanjem otopine mRNA i otopine lipida. (Preuzeto i prilagođeno iz: Shepherd i sur. 2021)

3. Zaključak

Iako su najkobnije pošasti koje su harale u prošlosti prošle, to ne znači da ne dolazi do nastajanja novih patogena. U ljudskoj je prirodi prilagođavati svoju okolinu sebi i sebi stvarati najugodnije uvjete, ali zbog toga često se može zaboraviti kako varijabilnost i prirodna selekcija i dalje postoje. U prirodi se kroz mnoge generacije i mnoge potomke organizmi mijenjaju, a najviše se mijenjaju mikroorganizmi jer imaju najkraće generacijsko vrijeme i najviše potomaka. Novi patogeni se najčešće razvijaju iz već poznatih patogena, ali su dovoljno drugačiji da nadvladaju naš imunski sustav i izazovu pandemije. Prenapučenost Zemlje ljudima jako je povećala opasnost od izbijanja pandemija zato što se olakšao prijenos patogena. Brzo širenje zaraza je velik problem koji tehnologije prije mRNA cjepiva nisu mogle pratiti, što se i pokazalo u pandemiji COVID-19 uzrokovanoj virusom SARS-CoV-2.

Razvoj mRNA cjepiva možemo dvojako shvatiti. Razvoj mRNA cjepiva od izbijanja pandemije do klinički odobrenog cjepiva, na primjeru COVID-19, bilo je brzo. Trebalo je vremena da se virus okarakterizira, da se odabere pravi antigen, da se ispita interakcija virusa i organizma, ali nakon skupljanja tih ključnih informacija cjepivo je brzo sintetizirano i uz poneke optimizacije odmah je pokazalo dobre rezultate – zato što je postojala podloga RNA tehnologije već godinama prije pandemije.

Razvoj mRNA cjepiva možemo shvatiti i kao proces utemeljivanja RNA tehnologije. Taj proces nije bio nimalo brz, ali se polako skupljala kritična masa saznanja koja je omogućila da se od molekule koja se smatra nestabilnom, RNA, napravi vrlo efikasno cjepivo. Ključ uspjeha je jednostavnost ideje – *in vitro* sinteza nukleinske kiseline koja je u centralnoj dogmi neposredno prije nastanka proteina, mRNA, a stanica sama proizvede protein koji izlučuje ili izlaže na površinu, a onda ga imunski sustav prepoznaje. Tako su, iako je ključna bila ideja, znanja biotehnologije, citobiologije i imunologije omogućila ostvarivanje te ideje; mRNA cjepiva ne bi bilo bez poznavanja staničnog odgovora na dvolančane RNA i RNA bogate uridinima, bez modifikacija nukleotida, bez mogućnosti brze *in vitro* transkripcije i obrade enzimima za postavljanje kape i metilaciju, bez umanjivanja nusprodukata i uspješnog pročišćavanja smjese nakon sinteze, bez poznavanja imunskog odgovora na pozitivno nabijene nanočestice, bez znanja kako sintetizirati nanočestice koje su na površini neutralne, ali u središtu pozitivno nabijene što je nužno za stabilizaciju već ionako nestabilne mRNA i bez još mnogo sitnih optimizacija. Sve znanja skupljena istraživanjem RNA tehnologije u svrhu RNA-interferencije i utišavanja gena omogućila su RNA tehnologiji novu primjenu – mRNA cjepiva i još uvijek nedovoljno istraživane mRNA terapeutike.

4. Literatura

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2018). Cellular and Molecular Immunology, 9e, Elsevier, Philadelphia
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008) Molecular biology of the cell, 5e, Garland Science, New York
3. Arvin, A. i sur. (2020). A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature*, 584(7821), 353-363.
4. Avci, F. Y., Li, X., Tsuji, M., Kasper, D. L. (2013). Carbohydrates and T cells: a sweet twosome. *Seminars in immunology*, Vol. 25, No. 2, pp. 146-151 Academic Press.
5. Bailey, A. L., Cullis, P. R. (1994). Modulation of membrane fusion by asymmetric transbilayer distributions of amino lipids. *Biochemistry*, 33(42), 12573-12580.
6. Ball, R. L., Hajj, K. A., Vizelman, J., Bajaj, P., Whitehead, K. A. (2018). Lipid nanoparticle formulations for enhanced co-delivery of siRNA and mRNA. *Nano letters*, 18(6), 3814-3822.
7. Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational medicine*, 57(8), 552-556.
8. Berkovits, B. D., Mayr, C. (2015). Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature*, 522(7556), 363-367.
9. Blasius, A. L., Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305-315.
10. Boylston, A. (2012). The origins of inoculation. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 105(7), 309-313.
11. Brondino, N. i sur. (2021). A pilot study on Covid and autism: prevalence, clinical presentation and vaccine side effects. *Brain Sciences*, 11(7), 860.
12. Chaudhary, N., Weissman, D., Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(11), 817-838.
13. De Rose, D. U., Salvatori, G., Dotta, A., Auriti, C. (2022). SARS-CoV-2 vaccines during pregnancy and breastfeeding: a systematic review of maternal and neonatal outcomes. *Viruses*, 14(3), 539.
14. DeRuiter, J. (2005). Carboxylic acid structure and chemistry: part 1. *Principles of drug action*, 1, 1-10.
15. Doerfler, W. (2021). Adenoviral vector DNA-and SARS-CoV-2 mRNA-based COVID-19 vaccines: possible integration into the human genome—are adenoviral genes expressed in vector-based vaccines?. *Virus Research*, 302, 198466.
16. Dolgin, E. (2021). The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, 597(7876), 318-324.
17. Domazet-Lošo, T. (2022). mRNA vaccines: Why is the biology of retroposition ignored?. *Genes*, 13(5), 719.
18. Eberle, F., Sahin, U., Kuhn, A., Vallazza, B., Diken, M. (2020). *U.S. Patent No. 10,717,982*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
19. Gholamalipour, Y., Karunanayake Mudiyansele, A., Martin, C. T. (2018). 3' end additions by T7 RNA polymerase are RNA self-templated, distributive and diverse in character—RNA-Seq analyses. *Nucleic acids research*, 46(18), 9253-9263.

20. Goedeke, L., Fernández-Hernando, C. (2012). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(6), 915-930.
21. Hajj, K. A., Whitehead, K. A. (2017). Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 2(10), 1-17.
22. Han, S. (2015). Clinical vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, 4(1), 46-53.
23. Humphreys, J., Lan, R., Tao, S. (2021). Development and recent progress on ammonia synthesis catalysts for Haber–Bosch process. *Advanced Energy and Sustainability Research*, 2(1), 2000043.
24. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165-175.
25. Kauffman, K. J., i sur. (2015). Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs. *Nano letters*, 15(11), 7300-7306.
26. Kim, J., Eygeris, Y., Gupta, M., Sahay, G. (2021). Self-assembled mRNA vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 170, 83-112.
27. Kormann, M. S., i sur. (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature biotechnology*, 29(2), 154-157.
28. Kunitz, S. J. (1984). Mortality change in America, 1620-1920. *Human Biology*, 559-582.
29. Leppek, K., Das, R., Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(3), 158-174.
30. Lifshitz, D., Haas, J., Lebovitz, O., Raviv, G., Orvieto, R., Aizer, A. (2022). Does mRNA SARS-CoV-2 vaccine detrimentally affect male fertility, as reflected by semen analysis?. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(1), 145-149.
31. Lokugamage, M. P., Sago, C. D., Gan, Z., Krupczak, B. R., Dahlman, J. E. (2019). Constrained nanoparticles deliver siRNA and sgRNA to T cells in vivo without targeting ligands. *Advanced Materials*, 31(41), 1902251.
32. Lonz, C., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J. M. (2012). Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. *Advanced drug delivery reviews*, 64(15), 1749-1758.
33. Manns, M. P., Wedemeyer, H., Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 55(9), 1350-1359.
34. Miao, L., i sur. (2019). Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Nature biotechnology*, 37(10), 1174-1185.
35. Moore, L. D., Le, T., Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38.
36. Mroz, E. A., & Rocco, J. W. (2017). The challenges of tumor genetic diversity. *Cancer*, 123(6), 917-927.
37. Mu, X., Greenwald, E., Ahmad, S., Hur, S. (2018). An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Research*, 46(10), 5239-5249.

38. Mu, X., Hur, S. (2021). Immunogenicity of in vitro-transcribed RNA. *Accounts of Chemical Research*, 54(21), 4012-4023.
39. Nguyen, J., Szoka, F. C. (2012). Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle?. *Accounts of chemical research*, 45(7), 1153-1162.
40. Opal, S. M. (2009). The evolution of the understanding of sepsis, infection, and the host response: a brief history. *Critical care clinics*, 25(4), 637-663.
41. Orlandini von Niessen, i sur. (2019). Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular Therapy*, 27(4), 824-836.
42. Patel, S., i sur. (2020). Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nature communications*, 11(1), 1-13.
43. Ramanathan, A., Robb, G. B., Chan, S. H. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic acids research*, 44(16), 7511-7526.
44. Sahin, U., Karikó, K., Türeci, Ö. (2014). mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 13(10), 759-780.
45. Sample, P. J., Wang, B., Reid, D. W., Presnyak, V., McFadyen, I. J., Morris, D. R., Seelig, G. (2019). Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature biotechnology*, 37(7), 803-809.
46. Scholtissek, C. (1994). Source for influenza pandemics. *European journal of epidemiology*, 10(4), 455-458.
47. Semple, S. C., i sur. (2001). Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1510(1-2), 152-166.
48. Shepherd, S. J., Issadore, D., Mitchell, M. J. (2021). Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 274, 120826.
49. Spencer, P. S., Siller, E., Anderson, J. F., Barral, J. M. (2012). Silent substitutions predictably alter translation elongation rates and protein folding efficiencies. *Journal of molecular biology*, 422(3), 328-335.
50. Stray, S. J., Air, G. M. (2001). Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis. *Virus research*, 77(1), 3-17.
51. Timonius E. (1713) An account of history, of the procuring the small pox by incision, or inoculation: as it has for some time been practised at Constantinople. Izvadaka pisma Emanuela Timoniusa iz Konstantinopola, Prosinac 1713. *Philosophical Transaction 1714*; 29:72–82
52. Voet, D. and Voet, J.G. (2010) *Biochemistry*. 4th Edition, Wiley, Hoboken.
53. Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C., Thakur, A. (2020). Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics*, 12(2), 102.
54. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.
55. Weissman, D., Pardi, N., Muramatsu, H., Karikó, K. (2013). HPLC purification of in vitro transcribed long RNA. In *Synthetic messenger RNA and cell metabolism modulation* (pp. 43-54). Humana Press, Totowa, NJ.

56. Wrapp, D., i sur. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263.
57. Wu, B., i sur. (2013). Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell*, 152(1-2), 276-289.
58. Wu, B., i sur. (2014). Molecular imprinting as a signal-activation mechanism of the viral RNA sensor RIG-I. *Molecular cell*, 55(4), 511-523.
59. Wu, M. Z., Asahara, H., Tzertzinis, G., Roy, B. (2020). Synthesis of low immunogenicity RNA with high-temperature in vitro transcription. *Rna*, 26(3), 345-360.
60. Xia, H., Jiang, Y., Cheng, R., Yu, B., Lu, X., Wu, H., Zhu, B. (2020). In vitro transcription using psychrophilic phage VSW-3 RNA polymerase. *bioRxiv*..
61. Zhang, K., Hodge, J., Chatterjee, A., Moon, T. S., Parker, K. M. (2021). Duplex Structure of Double-Stranded RNA Provides Stability against Hydrolysis Relative to Single-Stranded RNA. *Environmental Science & Technology*, 55(12), 8045-8053.
62. Zhao, X., Chen, J., Qiu, M., Li, Y., Glass, Z., & Xu, Q. (2020). Imidazole-based synthetic lipidoids for in vivo mRNA delivery into primary T lymphocytes. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(45), 20083-20089.
63. Zhong, Z., i sur. (2018). mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano today*, 23, 16-39.

5. Životopis

Rodio sam se 12. svibnja 2000. u Puli. Završio sam osam godina osnovnoškolskog obrazovanja u Osnovnoj školi Vodnjan – Scuola Elementare Dignano, te šest godina u Osnovnoj glazbenoj školi Ivana Matetića Ronjgova Pula. Završio sam još četiri godine srednjoškolskog obrazovanja u Gimnaziji Pula, Prirodoslovno-matematički smjer, i četiri godine u Srednjoj glazbenoj školi Ivana Matetića Ronjgova Pula te maturirao kao glazbenik klavirist. Tokom srednjoškolskog obrazovanja dvaput sam sudjelovao znanstvenom kampu S3 – Summer School of Science u Višnjanu. 2019. godine upisao sam smjer Molekularna biologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2021. godine odradio sam praksu na Zavodu za biljnu fiziologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek i asistentice Sandre Vitko, mag. biol. exp. i praksu na Zavodu za animalnu fiziologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Sofije Ane Blažević i asistentata Tomislava Gojaka, mag. biol. exp. i Marka Glogoškog, mag. oecol. et prot. nat. 2022. godine započeo sam s praksom po mentorstvom prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić i dr. sc. Andreje Škiljaica. Ovim radom završavam treću godinu studija.