



Kandidaatintutkielma

mRNA-rokotteet ja niiden tuotanto

Risto Rantanen

Oulun yliopisto

Table of Contents

1. Johdanto	3
2. Rokotteiden historia	3
2.1. mRNA-rokotteiden historia	4
2.2. 2000-luvun mRNA rokotteiden historia	5
3. Perusta	6
3.1. mRNA	6
3.2. patogeenit	7
4. Transportaatio	9
4.1. Transportaatio molekyylit	9
4.2. Kationilipidit	9
4.3. Ionisoituvat lipidit	10
4.4 Muut lipidit	11
4.5. Muut transportaatio molekyylit	11
5. Reitit kohdesoluun	12
5.1. Intradermaalinen injektio	12
5.2. Ihonalainen injektio	13
5.3. Lihaksensisäinen injektio	13
5.4. Suonensisäinen injektio	13
5.5 Intranodaalinen injektio	14
6. mRNA-rokote tyypit	15
6.1. Non-replicating rna	15
6.2. Self-amplifying rna	15
7. COVID-19	16
7.1. Coronavirukset	16
7.2. SARS-Cov-2 solun sisäinen mekanismi immuunivasteen aktivointiin	17
7.3. COVID-19rokotteen toiminta	17
8. mRNA-rokotteiden tuotanto	18
9. mRNA-rokotteiden hyödyt	18
10. mRNA-rokotteiden haitat	19
11. Yhteenveto	21
12.Lähdeluettelo	22

1. Johdanto

mRNA rokotteet ovat tulleet vihdoin jokaisen ihmisen tietoon koronaviruspandemian ja siihen kehitetyn mRNA-rokotteen myötä. Teknologia kuitenkin on ollut olemassa jo pitkään ennen koronavirusta ja maailmaa runnellutta pandemiaa. Sitä on kehitetty monta kymmentä vuotta, ja tällä hetkellä sitä pidetään todella lupaavana vaihtoehtona perinteisten rokotteiden rinnalle. mRNA-rokotteiden tuotanto on ollut haastavaa, mutta viimeaikaiset tapahtumat sekä teknologian kehittyminen ovat näyttäneet, että niiden tuotanto on erittäin tehokasta, ja niitä voidaan käyttää ihmiskunnan vaarallisimpia sairauksia vastaan, kuten COVID-19, Zikavirus ja jopa jotkut syöväet. Tässä tutkielmassa tutustumme tarkemmin mRNA-rokotteiden tuotantoon, teknologiaan, potentiaaliin, sekä myös riskeihin ja ongelmatekijöihin. Aluksi käymme kuitenkin hieman läpi rokotteiden historiaa, sekä mRNA-rokotteiden historiaa, jotta ymmärtäisimme paremmin teknologiaa ja kuinka mullistava siitä voi tulla oikein toteutettuna.

2. Rokotteiden historia

Rokotteiden kehittäjänä pidetään Edward Jenneriä, joka vuonna 1796 oli ensimmäinen, joka onnistui kehittämään saadun immunitetin isorokkoa vastaan. Tapahtuma oli merkittävä, mutta vasta 1800-luvun lopulla ja 1900-luvun alkupuolella tätä päästiin hyödyntämään muiden sairauksien kanssa, kuten esimerkiksi jäykkäkouristuksen, rabioksen ja pernaruton. Näiden rokotteiden ansiosta taudit, jotka aikaisemmin olivat tappavia ja aiheuttivat vakavia oireita ovat saatu melkein katoamaan maapallolta. Tällaisia sairauksia ovat esimerkiksi isorokko sekä polio. Perinteisillä rokotemenetelmillä on siis parannettu miljoonia ihmisiä ja päästy eroon tappavista taudeista, niin miksi tarvitaan uusia rokote menetelmiä? Vaikkakin taudeista on päästy eroon, kuitenkin läheskään kaikkia viruksia ja bakteereita vastaan ei olla pystytty kehittämään tehokasta rokotetta, joka estäisi viruksien tai bakteerien aiheuttamat oireet ja leviämisen. Ihmisen populaation räjähdysmäisen kasvun takia tulevaisuudessa erilaiset patogeenit pystyvät leviämään todella paljon tehokkaammin ja kehittymään nopeammin vaarallisemmiksi. Lisäksi perinteisillä menetelmillä rokotteiden tuottaminen on

liian hidasta populaatioon nähden. mRNA-rokotteet voivat myös mahdollistaa erilaisten hoitomuotojen tuottamisen myös sairauksiin kuten HIV ja syöpä, joita on tutkittu kymmeniä vuosia, mutta tehokasta ja toimivaa hoitomuotoa ei ole vielä löydetty. (Plotkin 2009).

2.1 mRNA-rokotteiden historia

Viitteet mRNA:n käyttöön rokotteina juontavat juurensa vuoteen 1987, jolloin Robert Malone tutkimusryhmänsä kanssa onnistui liittämään mRNA-partikkeleita lipidipartikkelin sisään, ja kun ihmisten soluja sekoitettiin tähän, todettiin että mRNA alkoi tuottamaan proteiineja soluissa. Tätä voidaan pitää ensimmäisenä merkittävänä löytönä kohti mRNA-rokote teknologiaa. Tämän jälkeen tajuttiin, että RNA voisi toimia jonkinlaisena "lääkkeenä" jossain muodossa, mutta kaikki oli vielä täysin hypoteettista. Myöhemmin, vuonna 1988 sama tutkimusryhmä onnistui kuljettamaan mRNA:ta sammakon alkioon. Tapaus oli ensimmäinen kerta, kun mRNA:ta onnistuttiin viemään elävän organismin sisälle niin, että se tuotti proteiineja eikä tuhoutunut. Kuitenkaan nämä tutkimukset eivät johtaneet vielä mRNA:n käyttöön lääketieteessä tai rokotteissa. mRNA oli liian epävakaa ja sen tuotanto oli liian kallista, jotta sitä olisi voitu hyödyntää lääketieteessä. Tutkimuksia mRNA:n kanssa jatkettiin samaan aikaan monissa tutkimusyksiköissä, ja merkittäviä löytöjä tapahtui. Vuonna 1987 Paul Krieg ja Douglas Melton onnistuivat todistamaan, että mRNA:lla voidaan proteiinien tuottamisen lisäksi estää proteiinien tuotantoa geeneissä. Myöhemmin Harvardin yliopistossa tutkimusryhmä Malonen johdolla lisäsi uudenlaisen liposomin mRNA:n kuljettajaksi. Liposomilla oli positiivinen varaus, joka tehosti sen toimintaa negatiivisesti varautuneen mRNA:n kanssa. Liposomit oli kehittänyt tutkija nimeltä Philip Felgner. 1990-luvun alussa tutkimus siirtyä Vical nimiselle yhtiölle, joka sai haltuunsa oikeudet tutkimuksiin, joita Malone ja tutkimusryhmät olivat tehneet. (Wolff *et al.* 1990)

1990-luvulla tutkimus mRNA:n parissa sai merkittävän rahoituksen ja ensimmäistä kertaa tutkittiin mahdollisuutta kehittää siitä rokote. Tavoitteena oli tehdä influenssa rokote, mutta tämä hylättiin lähes heti koska tuotanto oli todella kallista. Vuonna 1993 Ranskassa ryhmä

tutkijoita onnistuikin näyttämään, että mRNA liposomipartikkelin sisällä soluun vietyä tuotti spesifin immuunireaktion hiirellä. Kuitenkaan tutkimukset eivät johtaneet eteenpäin. Seuraava merkittävä tutkimus mRNA-rokotteiden historiassa alkoi vuonna 1996, kun Eli Gilboa kehitti idean, että ihmisen valkosoluja otettaisiin verestä, ja niihin lisättäisiin synteettistä mRNA:ta, joka osaisi tunnistaa syöpäsolut. Valkosolut pistettäisiin takaisin ihmiseen ja näin ollen ihmisen immuunipuolustus osasi tuhota syöpäsoluja. Tämä vaikutti toimivalta, mutta ei koskaan päässyt läpi rokote testausta ja näin ollen unohdettiin. Kuitenkin Gilboan tutkimuksella oli merkittäviä vaikutuksia mRNA rokotteiden kehittämisessä, koska sen ansiosta CureVac ja BionTech aloittivat tutkimuksena mRNA: parissa (Boczkowski *et al.* 1996)

2.2 mRNA 2000-luvun historia

Curevac:in ja BionTechin ideana oli, että soluja ei otettaisi ulos ihmiskehosta, vaan mRNA injektoidaisiin suoraan ihmiseen, jolloin prosessi olisi tehokkaampi ja nopeampi. Yksi 2000-luvun suurimpia löytöjä mRNA-tekniikan kannalta oli, kun Kariko ja Weissman onnistuivat modifioimaan mRNA-sekvenssiä siten, että kehon immuunipuolustus ei tuhoa mRNA:ta. He myös käyttivät RNA:sta löytyvää pseudouridiinia, modifioitua nukleotidiä, joka esti kehoa tunnistamasta ulkoa tulevaa mRNA:ta vihollisena. Kariko ja Weissman ovat myös perustajajäseniä Moderna:ssa, joka on nykyään yksi maailman suurimmista mRNA:han keskittyvistä yhtiöistä. Nimi Moderna tulee myös tästä löydöstä (Modified RNA) (Kariko *et al.* 2005).

Toinen kriittinen tekijä mRNA rokotteiden historiassa on ollut se, että miten mRNA saadaan kuljetettua kohdesoluihin tehokkaasti. Jo 1980-luvulla tajuttiin, että lipidipartikkelit mahdollistavat tämän, mutta tehokas kuljetusmuoto löytyi vasta paljon myöhemmin. Vuonna 2012 Pieter Cullis alkoi tutkia erilaisten lipidipartikkelien toimintaa mRNA:n kuljettana. He testasivat monia erilaisia lipidiyhdistelmiä, ja tulivat siihen tulokseen, että kaikista tehokkain ja turvallisin lipidi tähän oli LNP, lipidinanopartikkeli. Tällainen partikkeli pystyi kuljettamaan

mRNA:ta tehokkaasti, ja sen avulla mRNA pystyttiin varastoimaan huomattavasti pitempiä aikoja, mikä helpotti mRNA-rokotteiden varastointia ja tutkimista huomattavasti. 2000-luvun alussa kehitettiin myös uusi tapa tuottaa näitä lipidinanopartikkeleita. LNP-kuljetus ja -tuotantoprosessi oli kehitetty, joka teki mRNA-lääkkeiden, rokotteiden ja injektioden tuotannosta nopeampaa, turvallisempaa ja tehokkaampaa. Nykyään jokainen mRNA:han pohjautuva lääke tuotetaan tämän prosessin mukaisesti. Vaikka mRNA-rokotteita onkin tutkittu jo yli neljäkymmentä vuotta, voidaan sanoa, että mRNA-lääketeollisuus on alkanut vasta viimeisen kahden vuosikymmenen aikana. Vasta 2000-luvulla saatiin teknologia tarpeeksi pitkälle, että mRNA-lääketeollisuuteen voitiin saada kunnon rahoitusta, joka johti todellisiin tuloksiin ja tuotantoon. Kuitenkaan ennen Covid-19 pandemiaa yksikään mRNA-rokote ei ollut saanut myyntilupaa. Koronan puhjettua kuitenkin Modernan ja BioNTechin mRNA-rokotteille myönnettiin hätämyyntilupa, ja rokotteita on jaettu maailmanlaajuisesti. Viimeaikaisten tapahtumien jälkeen voidaan odottaa, että mRNA-rokotteet tulevat yleistymään tulevaisuudessa huomattavasti (Aldrich *et al.* 2021).

3. Perusta

mRNA-rokotteiden vaikutus perustuu mRNA:han, joka siirretään solun sisälle tuottamaan tiettyä kohdeproteiinia, joka näin ollen aiheuttaa kehossa immuunivasteen patogeeniä vastaan. Tämä tapahtuma koostuu monesta eri vaiheesta, partikkelista ja biokemiallisesta reaktiosta. Jotta prosessista saataisiin tarkempi kuvaus, käyn läpi prosessin eri partikkelit, vaiheet ja mekanismit.

3.1 mRNA

mRNA, eli lähetti-RNA on yksijuosteista RNA:ta, jonka tehtävä on kuljettaa DNA:sta lähtenyt transkripti solun sytoplasmaan. mRNA koostuu nukleotideista, jotka muodostavat nukleiinihappoketjun. RNA:n nukleotidit ovat adeniini, guaniini, sytosiini ja urasiili. Uraasiili

korvaa RNA:ssa DNA:n tyymiin. Nukleotidit liittyvät nukleiiniketjuksi fosfaattiosan kiinnittyessä fosfodiesterisidoksen välityksellä sokeriosan 5'-hiileen. Nukleotidit muodostavat kodoneita, kolmen nukleotidin osia, jotka kukin koodaavat spesifistä aminohappoa. Näitä alueita kutsutaan mRNA:n koodaaviksi alueiksi. Tapahtumaa, jossa mRNA muuttuu proteiiniksi, kutsutaan translaatioksi. Tähän kuitenkin tarvitaan myös siirtäjä-RNA:ta ja ribosomaalista RNA:ta. mRNA:sta löytyy myös ei koodaavia alueita, jotka ovat mRNA:ssa ennen aloituskodonia ja lopetuskodonin jälkeen. Ei koodaavilla alueilla on useita rooleja, jotka liittyvät geenien ilmentymiseen ja vaikuttavat mRNA:n vakauteen, paikallistumiseen sekä translaation tehostumiseen tai sen estämiseen. mRNA:lla on myös poly-A-häntä, joka koostuu useista peräkkäisistä adeniininukleotideista. Adeniininukleotideja voi olla peräkkäin kymmenistä satoihin, ja hännän tehtävänä on estää mRNA:ta hajoamasta (Shurjo 2022).

3.2 Patogeenit

mRNA-rokotteiden kohteena ovat yleensä patogeenit, kuten virukset. Virukset ovat pieniä organismeja, joilla ei ole omaa aineenvaihduntaa, ja näin ollen ne tarvitsevat isäntäsolun lisääntyäkseen. Viruksia eivät ole eläviä organismeja, mutta ne sisältävät geneettistä informaatiota sekä proteiineja. Virukset infektioivat erilaisia organismeja, kuten kasveja ja eläimiä. Viruspartikkelit koostuvat nukleiinihappogenomista ja sitä ympäröivästä kapsidista. Joillakin viruksilla on myös lipideistä muodostuva kuori, jota kutsutaan "kirjekuoreksi". Tämä muodostuu yleensä isäntäsolussa.

Viruksen replikaatiosykli ja vaiheet vaihtelevat suuresti eri virusten kesken, mutta ne voidaan jakaa yleisesti kuuteen eri vaiheeseen. Ensimmäinen vaihe on kiinnittyminen. Tässä vaiheessa viruksen kapsidiproteiinit kiinnittyvät isäntäsolun pinnan reseptoreihin. Toinen vaihe on penetraatio. Penetraatiossa viruspartikkelit kulkeutuvat solun sisälle yleensä joko endosytoottisesti tai solukalvon fuusioitumisen kautta. Kolmas vaihe on "uncoating". Viruksen kapsidi hajoaa, jolloin viruksen nukleiinihappogenomi pääsee vapaaksi soluun. Neljäs vaihe on replikaatio, jossa viruksen genomi moninkertaistuu solun sisällä. Replikaatiossa tapahtuu viruksen mRNA-synteesi, viruksen proteiinisynteesi ja proteiinin kokoaminen. Viides vaihe on kokoaminen. Kokoamisessa viruspartikkelit muodostuvat uusiksi

viruksiksi. Viimeinen ja kuudes vaihe on vapautuminen, jossa virukset vapautuvat isäntäsolusta. Tämä tapahtuu yleensä solun hajoamisen aikana, jolloin solukalvo hajoaa ja solu kuolee ja viruspartikkelit pääsevät vapaaksi infektoimaan uusia soluja. Tämän prosessin aikana viruksella yleensä muodostuu uudestaan lipidikuori, niin sanottu "envelope".

Virukset voidaan jakaa ryhmiin niiden geneettisen materiaalin mukaan. DNA-virukset sisältävät DNA:ta, ja niiden lisääntyminen tapahtuu solun tumassa. RNA-virukset sisältävät RNA:ta, ja niiden lisääntyminen tapahtuu solun sytoplasmassa. Käänteisen transkriptin omaavat virukset ovat kolmas ryhmä, ja niiden geneettinen materiaali koostuu yleensä joko positiivisesta RNA-juosteesta (ssRNA) tai kaksijuosteisesta DNA:sta (dsDNA). Näille tyypillistä on se, että ne lisääntyvät käänteisen transkriptin avulla (reverse transcriptase) (Kietzmann, 2022).

Toinen tutkimukseen liittyvä patogeeni johon mRNA-rokotteita koitetaan hyödyntää, on syöpäsolu. Syöpäsolu ovat soluja, jotka jakautuvat loputtomasti muodostaen kasvaimia. Syöpäsolu syntyvät kehossa, kun geenit, jotka ovat vastuussa solun jakautumisesta vahingoittuvat. Syöpäsolujen kehittyminen on monimutkainen prosessi. Mutaatiot geneeissä vaikuttavat tähän, ja osa niistä voi olla periytyviä, kun taas osa on ympäristön aiheuttamia. Jotta solu muuttuu syöpäsoluksi, on sen kuitenkin käytävä monta eri geneettistä mutaatiota. Syöpäsoluille tyypillistä on, että ne käyttävät telomeraasientsyymiä hyödykseen, joka estää syöpäsolun ikääntymisen, ja näin ollen se voi jakautua hallitsemattomasti pitkiäkin aikoja. Telomeraasientsyymi kasvattaa solun telomeerejä. Normaalisti solun telomeerit lyhenevät joka jakaantumisen jälkeen ja lopulta solu kuolee. Syöpäsoluille tyypillisiä piirteitä on hallitsematon kasvu, lähes loputon ikä, kyky tunkeutua viereisiin soluihin ja eri kudoksiin. Syöpäsolu osaavat myös välttää kehon immuunipuolustusta, joka tekee niistä erittäin vaarallisia (Weinberg 2006).

4. Transportaatio

mRNA:n transportaatio kohdesoluun on ollut yksi suurimmista haasteista mRNA-pohjaisten rokotteiden kehityksessä. Jotta mRNA saadaan kohdesoluun, sen pitää ohittaa monia solun ulkopuolella ja sisäpuolella olevia esteitä. mRNA:ta pitää ensinnäkin suojella hajoamiselta fysiologisissa nesteissä. mRNA:n pitää pysyä myös väistämään mononukleaaristen fagosyyttien väliintulo, ja kolmanneksi mRNA:n pitää löytää kohdesolu. Kohdesoluun vapautumisen jälkeen mRNA:n pitää pystyä vapautua endosomeista, jotta se pääsee sytoplasmaan, jossa translaatio tapahtuu (Hajj & Whitehead 2017).

4.1 Transportaatiomolekyylit

On todettu, että tehokkaimmat tulokset transportaatiossa saadaan laittamalla mRNA lipidi partikkelien sisälle transportaatiota varten. Tämä suojaa mRNA:ta kehon puolustusmekanismeilta, ja ohjaa sen kohti oikeaa kohdesolua. Transportaatiota on testattu monilla erilaisilla lipideillä, kuten kationilipideillä, ionisoiduilla lipideillä, sekä muilla erityyppisillä lipideillä. On todettu, että jotkin lipidityypit toimivat paremmin eri tarkoituksissa, riippuen siitä, mikä on kohdesolu ja mikä tavoiteltu vaikutus on (Uchida *et al.* 2020).

4.2 Kationilipidit

Kationilipideillä on aina positiivinen varaus niiden pääryhmässä. Tällaisia lipidejä ovat esimerkiksi 1,2-di-O-oktadenyyli-3-trimetyyliammonium-propaani (DOTMA). DOTMA on kvartäärinen ammoniumlipidi, jota voidaan käyttää mRNA:n kuljetuksessa monille eri solutyypeille. DOTMA:aa on käytetty tutkimuksissa esimerkiksi mRNA:an kuljetuksessa pernaan erityyppisiä syöpäsoluja vastaan. Samaa transportaatio mekanismia on kokeiltu

myös akuuttia dissimiloitunutta enkefalomyeliittiä vastaan, joka on autoimmuunisairaus. DOTMA pohjainen mRNA-rokote pohjautuu siihen, että se lisää antigeeni spesifisten CD4⁺ solujen tuotantoa, joka johtaa tehostuneeseen immunosuppressioon ja näin ollen vähentää akuutin dissimiloituneen enkefalomyeliitin oireita (Felgner *et al.* 1993).

Toinen yleinen kationi lipidi, jota käytetään, on 1,2-dioleoyli-3-trimetyyliammonium-propaani (DOTAP). DOTAP:iin pohjautuvien kationilipidien on todettu olevan tehokkaita erilaisia viraalisia, bakteeripohjaisia ja sieni-infektioita vastaan. Lisäksi DOTAP:iin pohjautuvien lipidien on todettu olevan tehokkaita kuljetusmolekyylejä erilaisia syöpiä vastaan. Transportaation tehokkuutta voidaan lisätä myös konjugoimalla fibronektiiniä lipidin nanopartikkeleihin, joka toimii solun adhesioproteiininä, ja tehostaa endosyyttistä nopeutta (Kranz *et al.* 2016).

Muita yleisiä kationi lipidejä ovat dimetyylidioktadesyyliammonium bromidi (DDAB), joka sen lisäksi että se toimii kuljetus molekyylinä, stimuloi synnynnäistä immuunivastetta. Myös BHEM-kolesteroliksi kutsuttu kationilipidiä on käytetty, ja sen on todettu olevan hyvä kuljetusmolekyylillä mRNA-pohjaisten syöpähoitojen kanssa (Hilgers & Snippe 1992).

4.3 Ionisoituvat lipidit

Ionisoituvat lipidit ovat lipidejä, jotka ovat protonoituneet matalassa pH:ssa. Se tekee niistä positiivisesti varautuneita. Ne kuitenkin pysyvät neutraaleina fysiologisessa pH:ssa, mikä on hyödyksi mRNA:n kuljetuksessa kehossa, koska neutraaleilla lipideillä on vähemmän vuorovaikutuksia anionisten solukalvojen kanssa. Kun ionisoituvat lipidit kulkeutuvat endosomeihin ne saavat positiivisen varauksen endosomien pH:n myötä, joka tehostaa solukalvon destabilisaatiota, ja näin ollen helpottaa nanopartikkelien siirtymistä endosomeista ulos (Meng *et al.* 2021).

Esimerkiksi N^1 , N^3 , N^5 -tris(3-(didodesyyliamino) propyyli) bentseeni-1,3,5-trikarboksiamidi (TT3) on ionisoituva lipidi joka voi kuljettaa mRNA:ta, joka koodaa SARS-CoV-2 antigeenejä (Zeng *et al.* 2020).

Zwitterionisia ionisoituvia lipidejä voidaan myös käyttää mRNA:n kuljetukseen. Tällaisten lipidien käyttö tehostaa endosomista poistumista, joka johtaa tehokkaaseen proteiinin ilmenemiseen ja geenien muokkaukseen. Tällaiset lipidit osana mRNA:ta indusoivat sytolyttisen t-lymfosyytti vasteen ja estävät kasvainten kasvua (Miao *et al.* 2019)

4.4 Muut lipidit

Katoinisten ja ionisoituvien lipidien lisäksi lipidinanopartikkeli mRNA-yhdisteet sisältävät muitakin lipidejä, kuten fosfolipidejä (fosfatidyylikoliini ja fosfatidyylietanoliamiini), kolesterolia ja polyetyleen glykolia (PEG-lipidejä). Nämä lipidit lisäävät partikkelien vakautta, toleranssia ja biodistributiota. Esimerkiksi 1,2-distearoyyli-sn-glysero-3-fosfokoliini (DSPC), jolla on sylinterin muotoinen geometria, auttaa DSPC molekyylien muodostavaa lamelaarista vaihetta, joka vakauttaa lipidinanopartikkelien rakennetta. DSPC:tä on käytetty COVID-19 rokotteissa (Koltover *et al.* 1998).

4.5 Muut transprotaatiomolekyylit.

Mrna:ta on myös koitettu injektoida muiden molekyylien kuin lipidejen kanssa. 1980-luvulla tutkimus aloitettiin injektoimalla pelkästään paljasta mRNA:ta. Tämä kuitenkin todettiin tehottomaksi tavaksi, koska mRNA tuhoutui ennen kuin se pääsi kohdesoluun saakka. Paljasta mRNA:ta koitettiin myös siirtää elektroporaatiolla. Elektroporaation aiheuttama sähkövirta lisää solukalvon läpäisevyyttä, ja näin ollen sen ajateltiin tehostavan mRNA:n vaikutusta.

Elektroporaation vaikutus oli kuitenkin pieni ja molemmat tavat todettiin tehottomiksi (Campillo-Davo *et al.* 2021).

5 Reitit kohdesoluun

Eri reittejä kohdesoluun on tutkittu, ja on todettu, että mRNA:n injektioireitillä on suuri merkitys siihen, kuinka hyvän immuunivasteen injektio antaa. Yleisimmät injektioireitit ovat intradermaalinen, ihonalainen, lihaksen sisäinen, suonensisäinen ja intranodaalinen (Verbeke *et al.* 2019).

5.1 Intradermaalinen injektio

Intradermaalinen injektio injektoidaan suoraan dermikseen, joka on tiheää sidekudosta. Dermiksessä on paljon antigeenejä ilmaisevia soluja (APC) ja dermaalaisia dendriittisiä soluja (DC), sekä makrofageja. Nämä solut voivat ottaa lipidinanopartikkelit sisälleen ja tuottaa injektioitua mRNA:ta. Dermiksessä on myös paljon verisuonia ja imusuonia, jotka helpottavat mRNA-injektion transportaatiota imusolmukkeisiin, jossa ne voivat aktivoida T- ja B-soluja. Intradermaalisen injektiohyviä puolia on, että sen on todettu aiheuttavan tehokkaan vasta-aine reaktion, mutta intradermaalisessa injektiossa on paljon ongelmia. Sen tiedetään aiheuttavan pahoja sivuvaikutuksia, kuten turvotusta ja kipua injektio kohdissa, sekä monimuotoista punavihoittumaa ja kutinaa (Kashem *et al.* 2017).

5.2 Ihonalainen injektio

Ihonalaisessa injektiossa lipidinanopartikkelit injektoidaan suoraan ihonalaiseen kerrokseen epidermin ja dermiksen alapuolelle. Ihonalainen kerros koostuu suurimmiltaan osin rasvakudoksesta, ja siellä on vain vähän valkosoluja. Ihonalainen injektio aiheuttaa vähemmän kipua ja erilaisia sivuvaikutuksia, mutta ihonalaisen kudoksen absorptiivisuus on huono, joka voi johtaa mRNA:n ennenaikaiseen hajoamiseen (Gradel *et al.* 2018).

5.3 Lihaksensisäinen injektio

Lihaksensisäinen injektio nimensä mukaan injektoidaan suoraan lihaskudokseen. Lihaskudos sisältää paljon suuria verisuonia ja hyvän verisuoniverkoston, joka tarkoittaa, että sieltä löytyy myös paljon erilaisia valkosoluja (APC, B-solut). Tämän ansiosta mRNA pääsee heti kohdesoluihinsa. Sen lisäksi verisuoniverkosto helpottaa mRNA:n pääsyä imusolmukkeisiin, jonka tiedetään helpottavan paremman immuunivasteen tuottoa. Lihaksensisäisen injektion sivuvaikutukset ovat myös lievempiä kuin aikaisempien esiteltyjen injektoiden. Lihaksensisäisiä pistoksia on käytetty perinteisten rokotteiden kanssa jo pitkään, minkä ansiosta niistä on paljon tietoa ja varsinkin paikallisten sivuvaikutusten tunnistaminen ja hoito on jo korkealla tasolla (Lindsay *et al.* 2019).

5.4 Suonensisäinen injektio

Suonensisäinen injektio vie lipidinanopartikkelit suoraan verenkiertoon. Suonensisäisesti voidaan antaa suuriakin määriä injektioita kerrallaan, ja tämän takia yleensä suonensisäisesti annetut injektiot tuottavat suurimman määrän haluttua kohdeproteiiniä. Suonensisäisesti annetut injektiot kuitenkin vievät suurimman osan mRNA:sta maksan soluille (hepatosyyteille, kupferin soluille ja maksan endoteelisoluille.) Tämän takia, jos kohteena on

maksa tai perna, suonensisäinen injektio on tehokkain vaihtoehto. Suonensisäisissä injektioissa on myös paljon ongelmia. Veren eri proteiinit ja entsyymit vaikuttavat haitallisesti mRNA:n kuljetukseen, jolloin suuri osa mRNA:sta ei koskaan pääse kohdesoluun, vaan tuhoutuu matkalla. Suonensisäisten injektioiden on myös todettu aiheuttavan vakavia sivuvaikutuksia, kuten pernan vammautumista, lymfosyyttien hajoamista ja ehtymistä sekä veritulppia (Kranz *et al.* 2016).

5.5 Intranodaalinen injektio

Intranodaalisessa injektiossa injektiokohta on suoraan imusolmukkeisiin. Tämän tavan tiedetään olevan tehokas, koska imusolmukkeissa olevat APC:t, t-solut ja b-solut voivat heti alkaa tuottamaan haluttua proteiinia mRNA:sta. Vaikkakin tämän metodin tiedetään olevan tehokas, sen käyttö on todella hankalaa ja vähäistä. Prosessi on monimutkainen ja injektion pitää olla todella tarkka, jotta se menee suoraan imusolmukkeisiin. Lisäksi ihmisillä tällainen injektio vaatii ultraäänen käyttöä, joten se ei ole kovin käytännöllistä suuressa mittakaavassa (Senti & Kündig 2015).

6. mRNA-rokotetyypit

Tällä hetkellä on kahta erilaista mRNA rokotetta: non-replicating mRNA (NRM) ja self-amplifying mRNA (SAM).

6.1 Non-replicating mRNA

NRM eli non-replicating mRNA rokote koostuu mRNA:sta, jonka on tarkoitus syntetisoida patogeenin proteiiniä, joka aiheuttaa immuunivasteen. mRNA koostuu 3' pään UTR-alueesta (Untranslated region), halutusta antigeenin sekvenssistä, 5' pään UTR-alueesta, sekä poly-A hännästä. NRM-rokotteita on tutkittu jo pitkään ja niistä on tälläkin hetkellä käynnissä monia prekliinisiä tutkimuksia. Viimeaikaisten tutkimusten ja löytöjen ansiosta (modifioidut nukleotidit, sekvenssin optimointi, lipidien käyttö kuljetukseen) tällaisen rokotteen aiheuttama antigeenivastus on saatu suuremmaksi. Ainoa ongelma näissä on se, että tarpeeksi hyvän immuunivasteen saamiseksi tarvitaan monesti monta peräkkäistä injektiota, ja näitä pitää jatkaa, jotta immuunivaste pysyy tarpeeksi korkealla tasolla (Pardi *et al.* 2018).

6.2 Self-amplifying mRNA

Self-amplifying mRNA-rokotteet toimivat hieman eri tavalla. Ne pohjautuvat alphavirukseen, joka on positiivisen juosteen omaava virus. SAM-rokotteet koostuvat samalla tavalla 3' pään UTR-alueesta, 5' pään UTR-alueesta, halutusta antigeenin sekvenssistä sekä poly-A hännästä. Näiden lisäksi SAM-rokotteista löytyy viruksen RNA pätkiä, jotka mahdollistavat neljän muun proteiinin tuotannon. Nämä proteiinit muodostavat solussa RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin (RDRP), joka mahdollistaa halutun antigeenin tuotannon silloin kun haluttu antigeeni pääsee solun sisälle. Tämä aiheuttaa huomottavasti korkeamman antigeenin ekspression, minkä takia immuunivasteeseen ei tarvita yhtä paljon peräkkäisiä injektioita (Lundstrom 2018).

7. Covid-19

Vuonna 2020 alkoi 2000-luvun suurin ja tappavin pandemia COVID-19, jonka aiheuttaa vakava akuutti hengityssyndrooma Koronavirus 2(SARS-CoV-2). Pandemia jatkuu edelleen, vaikka sitä vastaan on käytetty monia erilaisia ehkäiseviä toimenpiteitä. COVID-19 tapauksia on todettu yli 500 miljoonaa maailmalla, ja kuolleita on jo yli 6 miljoonaa. COVID-19 taudin oireet vaihtelevat suuresti täysin huomaamattomista oireista fataaleihin oireisiin. Yleisimpiä oireita ovat kuume, kuiva yskä ja väsymys. Todella vaarallinen virus on etenkin vanhemmille ihmisille, ja noin 75 % kuolleista onkin yli 65-vuotiaita. Virus leviää todella herkästi, ja tämän takia se onkin aiheuttanut suuria ongelmia terveydenhuollon kapasiteetille lähes jokaisessa maassa. Onkin arvioitu, että Koronaviruksesta johtuvia kuolemia on oikeasti n. 10–20 miljoonaa, johtuen siitä, että terveydenhuolto ei ole pystynyt hoitamaan muitakaan sairauksia yhtä tehokkaasti kuin aiemmin. COVID-19 leviää hengitysteiden kautta, kun ihmiset hengittävät sisään pieniä partikkeleita ilmasta, jotka sisältävät virusta (Worldometers.info 2022).

7.1 Koronavirukset

COVID-19 taudin aiheuttava virus SARS-CoV-2 kuuluu Koronavirusten ryhmään. Se on positiivinen yksijuosteinen RNA virus (+ssRNA). Koronavirukset ovat melko suuria, pallomaisia viruksia ja niiden pinnalla on paljon pintaproteiineja, joiden avulla ne tarttuvat soluihin. Koronavirukset koostuvat kaksoislipidi kalvosta, solukalvon proteiineista, nukleiinikapsidista ja sen sisällä olevasta yksijuosteisesta positiivisesta RNA-juosteesta. Koronavirusten replikaatio koostuu kuudesta vaiheesta. Aluksi koronavirus tarttuu soluun sen piikkiproteiineilla, jonka jälkeen se siirtyy solulimaan, jossa virus syntetisoi sen RNA-polymeraasin. Viruksen positiivisesta yksijuosteisesta RNA:sta tuotetaan negatiivisia vastakappaleita, joiden avulla tuotetaan viruksen muut tarvittavat proteiinit, sekä lisää positiivisia RNA-juosteita. Tämän jälkeen viruksen N-proteiinit kiinnittyvät RNA:han ja M-proteiinien avulla virus siirtyy endoplasmakalvostoon. Siellä virus järjestäytyy uudelleen ja

muodostaa kaksoislipidi kerroksensa. Lopulta virus siirtyy golgin vesikkeliin avulla takaisin solujen välitilaan, jonka kautta se voi infektoida uusia soluja (Kietzmann 2022).

7.2 SARS-Cov-2:n solun sisäinen mekanismi immuunivasteen aktivointiin

Ihmisen immuunipuolustus on tehokas ja se jo itsestään pystyy omilla mekanismeillaan taistelemaan viruksia ja muita patogeeneja vastaan. Jotta rokote voidaan tuottaa on tärkeää tietää kuinka virus toimii kehossa, ja kuinka sitä vastaan keho kehittää immuniteetin. Tiedetään, että SARS-CoV-2 siirtyy solun sisälle tarttumalla piikkiproteiineilla solun kalvon pinnalla oleviin proteiineihin (ACE2). Tämän jälkeen virus lisääntyy kehossa kuten yllä mainitut koronavirukset. Samaan aikaan kuitenkin osa viruksista kohtaa makrofageja tai dendriittisiä soluja, jotka fagosyyttisesti syövät viruksia. Makrofagit hajottavat viruksia, ja viruksen partikkelit kulkeutuvat T-auttaja soluihin, jotka taas kommunikoivat B-solujen kanssa. Aktivoidut B-solut lisääntyvät ja erilaistuvat plasma- tai muisti- B-soluiksi. Plasmasolut kehittävät SARS-CoV-2 spesifisiä vasta-aineita. (IgM, IgG ja IgA). Vasta-aineet estävät SARS-CoV-2 viruksen liittymisen solukalvon reseptoreihin (ACE2), ja näin ollen virus ei pysty enää infektoimaan soluja ja lisääntymään (Ghaffari, Meurant & Ardakani 2020).

8. mRNA-rokotteiden tuotanto

Pandemian alkaessa huomattiin nopeasti, että sitä vastaan tarvitaan nopeasti tehokas rokote, jotta sen leviäminen ja kuolemantapaukset voitaisiin estää. Tammikuussa 2020 Moderna ja BioNTech-Pfizer ilmoittivat kehittäneensä mRNA-rokotesekvenssin, joka voisi toimia rokotteenä COVID-19:ta vastaan. 11 kuukautta tämän jälkeen molemmat rokotteet olivat läpäisseet 3 ensimmäistä vaihetta rokotetestauksesta, ja saivat hätämyyntiluvan maailmalla. Näin tehokasta rokotteen kehitysprosessia ei olla koskaan aikaisemmin nähty, ja tämä oli todella lupaavaa mRNA-rokotteita kohtaan. Maailmalla tiedostetaan nykyään, että globaaleja pandemioita tulee olemaan tulevaisuudessa, ja mitä nopeampaa rokotteiden kehittäminen ja

tuotanto on, sitä valmiimpia niitä vastaan ollaan taistelemaan. Rokotteen nopean kehitysprosessin syy on se, että mRNA-rokotteita on huomattavasti helpompi kehittää, ja niiden tuotanto on todella tehokasta. mRNA-rokotteissa koodataan vain tiettyjä viruksen proteiineja, joten laboratorio-olosuhteissa niiden kehittäminen on helpompaa, eikä siihen tarvita erityisiä laitteita tai turvallisuusprotokollia, koska laboratoriossa ei käsitellä aktiivista virusta. Tuotanto tapahtuu myös täysin ilman eläviä soluja, jolloin kontaminoitumisen riski on pieni ja prosessissa ei tarvita bioreaktoreita. Sen lisäksi että tuotanto on tehokasta, sitä on helppo muuttaa muita rokotteita kohtaan, koska mRNA sekvenssin muokkaaminen on nopea ja yksinkertainen prosessi (Pardi *et al.* 2013).

8.1 Covid-19-rokoteen toiminta

Molemmat COVID-19 mRNA rokotteet (Moderna, BionTech-Pfizer) toimivat samalla tavalla. Rokote annetaan lihaksensisäisenä injektiona. Rokotteen sisältämä mRNA koodaa SARS-CoV-2 viruksen sisältämää S-piikkiproteiinia. mRNA:n kuljettamiseen käytetään aikaisempien kerrottujen lipidien yhdistelmää, LNP-partikkelia. Tämä koostuu ionisoituvista lipideistä, PEG-lipideistä ja kolesterolista. Näiden ansiosta mRNA saadaan kuljetettua kohdesoluun tehokkaasti ja turvallisesti. Soluun päästyä mRNA vapautuu partikkelista solulimaan, jossa se alkaa tuottamaan haluttua S-piikkiproteiinia. Tämän jälkeen APC:t tunnistavat piikkiproteiinin, joka aktivoi kehon immuunipuolustuksen ja T-auttajasolut (CD4+). T-auttajasolut aktivoivat T- ja B-soluja, jotka aiheuttavat immuunivasteen S-piikkiproteiinia vastaan. B-solut tuottavat vasta-aineita piikkiproteiinia vastaan, joiden ansiosta virus ei kehoon tullessa pääse enää leviämään soluihin. B-muistisoluihin jää jälki piikkiproteiineista, joten kun oikea COVID-19 infektio koittaa infektoida soluja, solut tunnistavat S-piikkiproteiinin ja estävät sen kiinnittymisen solun pinnalla oleviin reseptoreihin (ACE2) (Ghaffari *et al.* 2020).

9. mRNA-rokotteiden hyödyt

mRNA-rokotteet ovat todella lupaava, uusi tapa tuottaa rokotteita. Todella hyödyllisen siitä tekee rokotteen tuottamisen prosessin nopeus. mRNA-rokotteiden tuottaminen parhaimmillaan voi kestää alle vuoden, kuten COVID-19 rokotteen kanssa 11 kuukautta.

Perinteisten rokotteiden tuottaminen voi kestää jopa 10–15 vuotta. mRNA-rokotteiden tuottaminen on myös huomattavasti halvempaa kuin perinteisten rokotteiden, joka helpottaa rokotteiden levittämistä ympäri maailmaa. mRNA-rokotteita on myös helpompi muokata. Niiden muokkaus tapahtuu muokkaamalla nukleinihappoketjua, joka on yksinkertainen ja nopea prosessi. Tämän ansiosta rokotteita voidaan muokata nopeasti virusten muuntautuessa, tai jos huomataan että rokote aiheuttaa vakavia sivuvaikutuksia. mRNA-rokotteiden tuottaminen on myös turvallisempaa ja vaati vähemmän turvallisuusprotokollia laboratoriossa, koska siinä ei käsitellä eläviä viruksia ollenkaan.

9.1 mRNA-rokotteiden haitat

Vaikkakin mRNA-rokotteet ovat lupaava, turvallinen tulevaisuuden tapa tehdä rokotteita, löytyy niistä vielä tällä hetkellä paljon haittapuolia. Yksikään mRNA-rokote ei ole vielä läpäissyt normaalia rokotteiden testaus ja hyväksyntä prosessia, ja saanut markkinointilupaa. Normaalisti uuden rokotteiden pitää käydä läpi kolmivaiheinen testaus prosessi, jossa rokotetta arvioidaan ja testataan sen turvallisuuden ja tehokkuuden puolesta. Modernan ja BioNTceh-Pfizerin tuottamat mRNA rokotteet ovat saaneet myyntiluvat, mutta nämä ovat tulleet hätäluvan kautta. Maailman tilanteen takia rokote oli saatava nopeasti käyttöön, joten testaamisen sijaan rokote ohitti kolmannen vaiheen testauksen ja sai hätämyyntiluvan. Tämän jälkeen sille on kyllä myönnetty myyntilupa, koska siitä on pystytty keräämään niin paljon tietoa, kun sitä on käytetty maailmanlaajuisesti. Tällainen prosessi ei ole optimaalinen rokotteiden myyntiluvan myöntämiselle. Esimerkiksi Johnson & Johnsonin kehittämä COVID-19 rokote ei saanut hätämyyntiluvan jälkeistä myyntilupaa, koska sen todettiin potentiaalisesti aiheuttavan verenhiyytymiä (FDA 2022).

mRNA-rokotteiden on myös todettu aiheuttavan enemmän akuutteja sivuvaikutuksia kuin perinteisten rokotteiden. Akuutteina sivuvaikutuksina pidetään sivuvaikutuksia, jotka alkavat heti rokotteiden antamisesta ja kestävät maksimissaan 48 tuntia, jonka aikana ne häviävät itsestään. Modernan mRNA-rokotteiden on todettu aiheuttavan väsymystä (9,7%), lihaskipuja

(8,9%), nivelkipuja (5,2%) ja päänsärkyä (4,5%). BioNTech-Pfizerin rokotteessa nämä luvut olivat pienemmät (väsymystä 3,8 %:lla ja pääkipua 2 %:lla), mutta kuitenkin merkittävät. Näiden sivuvaikutusten uskotaan johtuvan lipidinanopartikkeleista, ja niiden aiheuttamasta paikallisesta immuunivasteen aiheuttamasta tulehduksesta (Rosenberg *et al.* 2021).

Toinen kiistelty asia mRNA-rokotteissa on se, että kuinka kauan rokotteen aiheuttama immuunivaste kestää. Tutkimuksissa on todettu, että rokotteen aiheuttama immuunivaste kestää ainakin 6 kuukautta. Näissä tutkimuksissa on kuitenkin mitattu ainoastaan rokotteen aiheuttamien vasta-aineiden tasoja. Tiedetään kuitenkin, että SARS-CoV-2 muuntautuu nopeasti, ja että rokotteen tehokkuus variantteja vastaan on heikompi. Yhdessä tutkimuksessa todettiin, että rokotteen tehokkuus oli laskenut 91,8 %:sta 75 %:iin (Rosenberg *et al.* 2021).

Vaikkakin mRNA-rokotteiden tuottaminen ja muokkaaminen on tehokasta ja nopeaa, rokotteiden hinta tällä hetkellä on huomattavasti korkeampi kuin perinteisten rokotteiden. Tämä hankaloittaa maailmanlaajuisia rokotteen levittämistä, koska mailla ei ole varaa ostaa rokotteita niin paljon, jolloin rokotekattavuus jää heikommaksi. mRNA-rokotteiden ongelmana on myös se, että niiden säilyttämisen tarvitaan todella kylmiä lämpötiloja, jopa -70 celsiusta. Tämä hankaloittaa säilyttämistä ja varsinkin rokotteiden jakelua.

mRNA-rokotteiden pitkäaikaisia vaikutuksia on myös mahdotonta arvioida. Rokotteita on käytetty ja testattu vasta niin vähän aikaa, että on mahdotonta sanoa, kuinka ne vaikuttavat pitkällä aikavälillä. Kuitenkin monet asiat puoltavat sitä, että pitkäaikaisia sivuvaikutuksia ei tule. mRNA-rokotteita on testattu noin kymmenen vuotta ihmisillä pienemmissä mittakaavoissa eri sairauksiin. Kuitenkaan minkään näköistä pitkän aikavälin sivuvaikutus profiilia ei ole tullut ilmi yhdessäkään mRNA-rokotteessa. Yleensä pitkäaikaiset sivuvaikutukset tulevat näkyviin kahden kuukauden sisällä rokotteen antamisesta. Myös mRNA:n luonne tieteellisestä näkökulmasta puoltaa sitä faktaa, että pitkäaikaisia sivuvaikutuksia ei tule. Se ei integroidu ihmisen omaan genomiin, ja se toimii vain solulimassa. Se myös hajoaa parin kuukauden aikana (Pardi *et al.* 2018).

10. Yhteenveto

Vielä viisi vuotta sitten lähes kukaan ei tiennyt mRNA-rokotteista, vaikka niiden käyttöä lääketieteessä on tutkittu jo yli 40 vuotta. Historian aikana on tehty merkittäviä harppauksia ja viime aikoina vihdoinkin teknologia on löytänyt tiensä siihen pisteeseen, että mRNA-rokotteet ovat todellisuutta. COVID-19 on johtanut tietä uuteen rokoteteknologiaan, joka voi mullistaa rokoteteollisuuden täysin. Tällä hetkelläkin tutkitaan jo mahdollisuuksia käyttää mRNA-teknologiaa esimerkiksi zikavirusta, ebolaa ja HIV:tä vastaan. Näihin sairauksiin on koitettu löytää hoitokeinoja jo todella pitkään, ja mRNA-rokotteet voivat olla se tapa, millä ihmiskunta selviää taistelusta näitä vastaan.

Vaikka mRNA-rokotteet ovat kehittyneet paljon, ja niitä on markkinoitu pelastuksena COVID-19:tä vastaan, on teknologialla vielä pitkä matka täydellisyyteen. Kuten aiemminkin on mainittu rokotteiden immunitetti ei ole täydellinen eikä se estä leviämistä täydellisesti, koska virukset muuntautuvat ja rokotteen kehittämät antigeenit eivät viruksen muuntautumisen takia aiheuta enää tarpeeksi hyvää immuunivastetta. Myös lipidinanopartikkelien aiheuttamat akuutit sivuvaikutukset ovat ongelma. Kuitenkin nämä ongelmat jo tiedostetaan, ja teknologian kehittyessä eteenpäin näihin ongelmiin löytyy vielä parempia sovelluksia, jotka entisestään helpottavat mRNA-rokotteiden tuotantoa ja laatua. Tulevaisuuden näkymät mRNA-rokotteille ovat paremmat kuin koskaan. Tutkimuksiin käytetään tällä hetkellä enemmän rahaa kuin koskaan, ja on vain ajan kysymys, milloin eri sairauksien hoitoon aletaan käyttämään mRNA-rokoteteknologiaa (Zeng *et al.* 2020).

11. Lähteet

Aldrich C., Leroux-Roels I., Huang K.B., Bica M.A., Loeliger E., Schoenborn-Kellenberger O., Walz L., Leroux-Roels G., Von Sonnenburg F., Oostvogels L. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. *Vaccine*. 2021 February 22;39(8):1310-1318. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.12.070. Epub 2021 January 22. PMID: 33487468; PMCID: PMC7825876.

Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1996 August 1;184(2):465-72. doi: 10.1084/jem.184.2.465. PMID: 8760800; PMCID: PMC2192710.

Campillo-Davo D, De Laere M, Roex G, Versteven M, Flumens D, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI, Anguille S, Lion E. The Ins and Outs of Messenger RNA Electroporation for Physical Gene Delivery in Immune Cell-Based Therapy. *Pharmaceutics*. 2021 March 16;13(3):396. doi: 10.3390/pharmaceutics13030396. PMID: 33809779; PMCID: PMC8002253.

FDA. (2022) <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/covid-19-vaccines> haettu 12.06.2022 haettu 26.7.2022

Felgner J., Martin M., Tsai Y., Felgner P.L. Cationic lipid-mediated transfection in mammalian cells: "Lipofection". *Journal of Tissue Culture Methods* 15, 63–68 (1993).

Ghaffari A, Meurant R, Ardakani A. COVID-19 Serological Tests: How Well Do They Actually Perform? *Diagnostics (Basel)*. 2020 July 4;10(7):453. doi: 10.3390/diagnostics10070453. PMID: 32635444; PMCID: PMC7400479.

Gradel A.K.J., Porsgaard T., Lykkesfeldt J., Seested T., Gram-Nielsen S., Kristensen N.R., Refsgaard H.H.F. "Factors affecting the absorption of subcutaneously administered insulin: effect on variability." *Journal of diabetes research* 2018 (2018).

Hajj K., Whitehead K. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Natural Review Mater* 2, 17056 (2017).

Hilgers L.A. & Snippe H. "DDA as an immunological adjuvant." *Research in immunology* 143.5 (1992): 494-503.

Kariko 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, 165-175.

Kashem S.W., Haniffa M., Kaplan D.H. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of Immunology*. 2017 April 26;35:469-499. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052215. Epub 2017 February 6. PMID: 28226228.

Kietzmann, T. (2022) *Virology-kurssin aineisto*. Oulun yliopisto.

Koltover I., Salditt T., Rädler J., Safinya C. (1998) An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes to DNA release and delivery. *Science*

Kranz L., Diken M., Haas H., Kreiter S., Loaqui C., Reuter K., Meng M., Fritz D., Vascotto F., Hefesha H., Grunwitz C., Vormehr M., Husemann Y., Selmi A., Kuhn A., Buck J., Derhovannessian E., Rae R., Attig S., Diekmann J., Jabulowsky R., Heesch S., Hassel J., Langguth P., Grabbe S., Huber C., Tureci Ö., Ugur S. "Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy." *Nature* 534.7607 (2016): 396-401.

Lindsay K.E., Bhosle S.M., Zurla C., Beyersdorf J., Rogers K.A., Vanover D., Xiao P., Araínga M., Shireff L.M., Pitard B., Baumhof P., Villinger F., Santangelo P.J. Visualization of early events in mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET–CT and near-infrared imaging. *Natural Biomedical Engineering* 3, 371–380 (2019)

Lundstrom, Kenneth. "Self-replicating RNA viruses for RNA therapeutics." *Molecules* 23.12 (2018)

Meng, C., Chen, Z., Li, G., Welte, T., & Shen, H. (2021). Nanoplatfoms for mRNA therapeutics. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000099.

Miao L., Li L., Huang Y., Delcassian D., Chahal J., Han J., Shi Y., Sadtler K., Gao W., Lin J., Doloff J.C., Langer R., Anderson D.G. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Natural Biotechnology* 37, 1174–1185 (2019)

Pardi N., Hogan M., Porter F., Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Natural Reviews Drug Discovery* 17, 261–279 (2018)

Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Karikó, K. (2013). In Vitro Transcription of Long RNA Containing Modified Nucleosides. In: Rabinovich, P. (eds) *Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation*. *Methods in Molecular Biology*, vol 969.

Plotkin SA. Vaccines: the fourth century. *Clinical Vaccine Immunology*. 2009 Dec;16(12):1709-19. doi: 10.1128/CVI.00290-09. Epub 2009 Sep 30. PMID: 19793898; PMCID: PMC2786381.

Rosenberg E.S., Holtgrave D.R., Dorabawila V., Conroy M., Greene D., Lutterloh E., Backenson B., Hofer D., Morne J., Bauer U., Zucker H.A. New COVID-19 Cases and Hospitalizations Among Adults, by Vaccination Status — New York, May 3–July 25, 2021. *MMWR Morb Mortal Weekly Report* 2021; 70:1306–1311. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7037a7external> icon.

Senti G. and Kündig T.M. "Intralymphatic immunotherapy." *World Allergy Organization Journal* 8 (2015)

Satoshi U., Federico P., Chantal P., Cabral H., *Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery*. *Molecular Pharmaceutics* (2020)

Thomas S.J., Moreira E.D. Jr., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez M.G., Polack F.P., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Xu X., Roychoudhury S., Koury K., Bouguermouh S., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W. Jr., Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Yang Q., Liberator P., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Gruber W.C., Jansen K.U.; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *New England Journal of Medicine*. 2021 November 4;385(19):1761-1773. doi: 10.1056/NEJMoa2110345. Epub 2021 September 15. PMID: 34525277; PMCID: PMC8461570.

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

Weinberg, Robert A., and Robert A. Weinberg. *The biology of cancer*. WW Norton & Company, 2006.

Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., & Felgner P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8. doi: 10.1126/science.1690918. PMID: 1690918.

Worldometers.info/coronavirus. Haettu 26.7.2022

Zeng, C., Hou, X., Yan, J., Zhang, C., Li, W., Zhao, W. & Dong, Y. (2020). Leveraging mRNA Sequences and Nanoparticles to Deliver SARS-CoV-2 Antigens In Vivo. *Advanced Materials* 2020 Oct;32(40):e2004452. doi: 10.1002/adma.202004452. Epub 2020 September 2. PMID: 32875709; PMCID: PMC8191860.

Zeng, C., Zhang, C., Walker, P.G., Dong, Y. (2020). Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg.