

PAPER DETAILS

TITLE: mRNA ASILARINDA GÜNCEL YAKLASIMLAR

AUTHORS: Kamil BATUR,Hakan YARDIMCI

PAGES: 1-10

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/2074610>



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Kamil BATUR^{1a}
Hakan YARDIMCI^{1b}

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji A.D., Ankara

ORCID^a: 0000-0002-5019-3475
ORCID^b: 0000-0002-5994-5792

*Sorumlu Yazar: Kamil Batur
E-Posta: batur@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 10.11.2021
Kabul Tarihi: 21.02.2022

13 (1): 1-10, 2022
DOI: 10.38137/vftd.1021843

mRNA AŞILARINDA GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

ÖZET. Tarihteki ilk aşının 1796 yılında Edward Jenner tarafından geliştirilmesinden günümüze kadar geçen süreçte birçok hastalığa karşı aşı geliştirilmiştir ve etkili olarak kullanılmıştır. Son yıllarda giderek popülerleşen mRNA aşılarının geçmişi 90'lı yıllara kadar dayanmaktadır. Wolf ve arkadaşlarının 1990 yılında lusiferaz ve beta-galaktosidaz enzimlerini kodlayan mRNA'ları farelere kas içi uygulamalarıyla bu proteinleri in vivo olarak gözlemlenmeleri mRNA aşılarının gelişiminde önemli bir basamak olmuştur. mRNA aşıları bir Cap Bölgesi, 5' ve 3' translyasyona uğramayan bölgeler, açık okuma bölgesi ve Poli A kuyruğundan oluşur. Geleneksel mRNA aşıları ve kendi kendini çoğaltan mRNA aşıları olarak iki gruba ayrılırlar. İki grup da hücre translyasyon mekanizmalarını kullanarak antijen üretir. mRNA'nın stabilitesini ve translyasyon verimini arttırmak için Cap, UTR, Poli A kuyruğu gibi bölgeler ve nükleotid bazlar optimize edilmelidir. mRNA'nın hücre içine iletimi için viral vektörler, peptid, polimer ve lipid tabanlı vektörler kullanılabilir. Hedef bölge sakansı içerir bir pDNA tasarımı ile başlayan üretim süreci, optimizasyon ve kalınlardan arındırma ile devam eder. Son ürün bir taşıma sistemi içerisine dahil edilir ve ürünün proteine çevrilme yeteneği test edilir. mRNA aşıları, genome entegre olmaması, nispeten kolay ve hızlı bir şekilde üretilibilmeleri ve güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturmaları gibi avantajları nedeniyle tercih edilen bir aşı platformu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu derlemede mRNA aşıları ve optimizasyonu hakkında genel bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aşı, Bağışıklık, mRNA, mRNA Aşıları.

CURRENT APPROACHES to mRNA VACCINES

ABSTRACT. Since the development of the first vaccine in history by Edward Jenner in 1796, vaccines against many diseases have been developed and used effectively. The history of mRNA vaccines, which has become increasingly popular in recent years, dates back to the 90s. In 1990, Wolf et al. observed these proteins in vivo by intramuscularly administering mRNAs encoding luciferase and beta-galactosidase enzymes to mice, which was an important step in the development of mRNA vaccines. mRNA vaccines consist of a Cap Region, 5' and 3' non-translated regions, open reading region, and Poly A tail. They are divided into two groups as conventional mRNA vaccines and self-replicating mRNA vaccines. Both groups produce antigens using cell translational mechanisms. In order to increase the stability and translation efficiency of mRNA, regions such as Cap, UTR, Poly A tail and nucleotide bases should be optimized. Viral vectors, peptide, polymer and lipid-based vectors can be used for intracellular delivery of mRNA. The production process, which starts with a pDNA design containing the target region saccharine, continues with optimization and decontamination. The final product is incorporated into a transport system and the ability of the product to be converted into protein is tested. mRNA vaccines emerge as a preferred vaccine platform due to their advantages such as not being integrated into the genome, being relatively easy and fast to produce, and generating a strong immune response. In this review, it is aimed to give general information about mRNA vaccines and their optimization.

Keywords: Immunity, mRNA, mRNA Vaccine, Vaccine.

Makale atf

Batur, K. & Yardımcı, H. (2022). mRNA aşılarında güncel yaklaşımlar. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 13 (1), 1-10. DOI: 10.38137/vftd.1021843

GİRİŞ

Aşılama, enfeksiyöz hastalıklara karşı korunmada en güvenli yollardan biri olarak kabul edilir. Tarihteki ilk aşı, Edward Jenner tarafından 1796 yılında çiçek hastalığına karşı geliştirilmiştir ve hastalığın eradikasyonunda oldukça önemli bir basamak olmuştur. Aşı kavramının ortaya çıkmasıyla birlikte bir çok araştırmacı tarafından günümüze kadar pek çok aşı geliştirilmiştir ve hastalıklara karşı korunmada kullanılmıştır (Desmettre, 2019).

Aşıların geliştirilmesinde oldukça farklı yöntemler mevcuttur. Organizmanın tümünün kullanıldığı canlı zayıflatılmış (attenüe) aşılar, inaktif (ölü) aşılar ve organizmaların ürettiği toksin ile bağışıklık oluşturmayı hedefleyen toksoid aşılar geleneksel aşılar kategorisinde değerlendirilir. Canlı aşıların tekrar virülens kazanma riski, inaktif aşıların etkilerinin zayıf olması ve adjuvanta ihtiyaç duyması gibi geleneksel aşıların pek çok dezavantajının bulunması, araştırmacıları daha modern teknikler geliştirmeye yöneltmiştir. Geleneksel aşılarla kıyasla rekombinant aşı teknolojisi gibi daha modern tekniklerin kullanıldığı biyoteknolojik aşılar, nükleik asit aşıları, vektör aşıları, subunit aşılar, sentetik peptid aşıları, dendritik hücre aşıları gibi aşı çeşitlerini kapsamaktadır. Nükleik asit aşıları, hücrel ve humoral bağışıklığı tetikleme kapasiteleri ve daha düşük maliyetli basit üretim süreçleri nedeniyle canlı zayıflatılmış ve subunit aşılarla karşı etkili bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Nükleik asit aşıları arasında DNA aşıları daha fazla çalışılan bir aşı türü olmasına rağmen son yıllarda mesajcı RNA (mRNA) aşıları giderek popülerleşmektedir (Wadhwa ve ark., 2020).

Bir protein kodlayan mRNA'nın vücuda verilmesi yoluyla protein sentezinin gerçekleştirilmesi ilk kez 1990 yılında Wolff ve arkadaşları tarafından denenmiştir. Wolff, lusiferaz ve beta-galaktosidaz enzimlerini kodlayan mRNA'ları farelere kas içi olarak injekte ederek bu proteinlerin aktivitelerini in vivo olarak gözlemlemiştir (Wolff ve ark., 1990). Aşı olarak mRNA kullanımı ise ilk kez 1995 yılında bir kanser aşısı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu aşı ile karsinoembriyonik antijeni (CEA) kodlayan mRNA farelere kas içi verilerek farelerde tümöre karşı bağışıklık oluşturulmuştur (Conry ve ark., 1995).

Boczkowski ve ark. (1996) tarafından, 1996 yılında mRNA ile bağışıklığın nasıl şekillendiği ile ilgili önemli bir çalışma ortaya konulmuştur. mRNA ile inkübe

edilen dendritik hücrelerin mRNA'ları alıp kodlayabildiği ve antijeni MHC molekülleri aracılığı ile T hücrelerine sunarak aktive ettiği gösterilmiştir (Boczkowski ve ark., 1996).

Günümüzde mRNA bazlı aşılar, hayvan modellerinde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve birçoğu klinik geliştirme aşamasındadır. mRNA aşıları Vektöre karşı bağışıklık ve hücre genomuna entegrasyon gibi dezavantajlara sahip olmadan vektör ve DNA aşıları gibi hücrel ve humoral bağışıklığı uyabilir (Iavarone ve ark., 2017). Bu derlemede genel olarak mRNA aşıları ve optimizasyonu hakkında genel bilgiler aktararak güncel aşı çalışmalarına değinilecektir.

mRNA AŞILARININ ÖZELLİKLERİ

Temel olarak, bir başlık görevi gören Cap Bölgesi, 5' ve 3' translyasyona uğramayan bölgeler, açık okuma bölgesi ve Poli (A) kuyruğundan oluşan mRNA aşıları, geleneksel(conventional) mRNA aşıları ve kendi kendini çoğaltan mRNA(self-amplifying) aşıları olmak üzere temelde iki gruba ayrılır. Her ikisi de hücre translyasyon mekanizmalarını kullanarak antijen üretir ve bağışıklık yanıtı oluşturur (Ulmer ve Geall, 2016; Kramps ve Elbers, 2017).

Geleneksel mRNA aşıları yapısal olarak konakçı hücre mRNA moleküllerine benzer ve sadece ilgili antijenik diziyi kodlar. Bunun aksine kendi kendini çoğaltan mRNA aşıları hücre içinde kendini çoğaltmasına imkan veren bir takım faktörler içerecek şekilde modifiye edilmiştir. Kendi kendini çoğaltan mRNA aşıları, tek sarmallı pozitif polariteli (+) RNA molekülü içeren Alfavirüs gibi tasarlanan bir diziyi kodlar. Bu dizi normalde Alfavirüs'te olan yapısal proteinlerin yerine üretilmesi hedeflenen proteinin dizisi ile birlikte yapısal olmayan(NPS) proteinleri içerir (Geall ve ark., 2012).

Alfavirüs tabanlı replikon, 5' ve 3' uçlarında translyasyona uğramayan bölgelerle (UTR'ler) çevrili iki açık okuma bölgesinden(ORF'ler) oluşan diziyi içerir. 5'-ucundaki açık okuma bölgesi 4 adet yapısal olmayan protein (nsPs) ve mRNA yapısını pozitiften (+) negatife (-) çeviren bir viral poliproteini kodlar. Alfavirüs'lere ait olan bu 4 yapısal olmayan proteinlerinin her birinin ayrı bir fonksiyonu vardır (Fros ve Pijlman, 2016). NsP1, mRNA'ya Cap bölgesi eklenmesi için gerekli reaksiyonu katalize eden bir enzimdir. Ayrıca konakçı membranda replikasyon kompleksinin (RC) yerleşmesinde rol oynar.

NsP2, poliproteini ayrı ayrı nsP'lere ayıran proteaz aktivitesine ve replikasyon sırasında RNA dupleksini çözen helikaz aktivitesine sahiptir. NsP3'ün rolü tam olarak aydınlatılamamıştır ancak RC'nin temel bir bileşeni olduğu bilinmektedir. Son olarak RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RDRP) olan nsP4, RC'yi yapılandırır ve tamamlayıcı negatif polariteli (-) RNA ara ürünlerini ve daha sonra pozitif polariteli ve subgenomik (+) mRNA'ları sentezler. Replikondaki ikinci açık okuma bölgesi subgenomik RNA'dan transle edilir ve viral yapısal proteinlerin yerini alan antijeni ifade eder (Geall ve ark., 2012; Fros ve Pijlman, 2016).

Virüs benzeri replikon parçacıklarının paketlenmesi, viral yapısal proteinleri birlikte ifade eden hücre kültürleri tarafından yapılabilir. Bu tür replikonların hayvan modellerinde etkili olduğu ve yapılan klinik çalışmalarda immünojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Bernstein ve ark., 2009; Lundstrom, 2014).

mRNA'NIN OPTİMİZASYONU

Son 10 yılda yapılan çalışmalar sayesinde mRNA aşılarının etkinliği konusunda önemli ilerlemeler gerçekleştirilmiştir. Aşıların etkinliğini arttırmak için mRNA üzerindeki bazı yapısal bölgelerin optimize edilmesi gerekir. Nükleosid bazların modifikasyonlarının yanı sıra mRNA'nın baş kısmındaki katabolit aktivatör protein (CAP) adı verilen bölgenin, Poli-A kuyruğu gibi ana yapıyı destekleyen yapıların, translasyona uğramayan bölgelerin (UTR) optimizasyonları mRNA stabilitesini ve gen ekspresyonunu artırır (Schlake ve ark., 2012; Weissman, 2014; Youn ve Chung, 2015). mRNA'nın dayanıklılığını artırmaya yönelik optimizasyonlara ilaveten mRNA tarafından kodlanan antijenin MHC molekülleri üzerinde daha verimli olarak sunulmasını sağlamak için de antijeni kodlayan gen dizisine bir takım yönlendirici diziler eklenebilmektedir (Kreiter ve ark., 2008).

Cap Bölgesi

In vitro sentezlenen mRNA'ya 5'başlık (Cap) eklemek için 2 ana yaklaşım vardır. mRNA aşıları için 5' Cap, in vitro transkripsiyon reaksiyonundan sonra bir Cap enzimi eklenebilir veya in vitro transkripsiyon sırasında Cap analogu dahil edilebilir (Weissman, 2014). İlk yaklaşım Vacciniavirüs enzimlerini kullanmaktır. Bu enzimler ilk olarak m7GpppN Cap ekler ve bunu devamında sondan bir

önceki nükleotide bir 2-O-metil grubu ekleyerek ökaryotik mRNA'larda en sık bulunan Cap yapısıyla benzer bir 5' Cap1 yapısı oluşturur (Schlake ve ark., 2012). In vitro sentezlenen mRNA'ya 5' Cap eklemeye daha yaygın olarak kullanılan ikinci bir yaklaşım ise, in vitro transkripsiyon reaksiyonuna sentetik bir Cap analogu dahil etmektir. Her iki yaklaşımın da avantajları ve dezavantajları vardır. Transkripsiyondan sonra Cap eklenmesi ikinci bir reaksiyon gerektirirken, transkripsiyon sırasında bir Cap analogu dahil etmek yapılan toplam mRNA miktarında bir azalmaya neden olur ve üretilen mRNA'nın bir fraksiyonu bir Cap analogu içermeyecektir (Weissman, 2014).

In vitro transkripsiyon sırasında dahil edilen m7GpppG Cap analogu mRNA'ya bağlanması istenen opsiyonun tersi yönünde bağlanabilir ve bu da translasyon verimini oldukça düşürür (Pasquinelli ve ark., 1995). Bu nedenle son yıllarda ARCA (anti-reverse cap analog) adı verilen ve mRNA'ya sadece bir oryantasyonda bağlanabilen sentetik Cap analog kullanılımını içeren bir yöntem geliştirilmiştir (Jemielity ve ark., 2003). ARCA Cap analogları ile üretilen mRNA'lar standart Cap analoglarına göre üstün bir translasyon verimi sergiler ve Cap0 yapısını oluşturur. ARCA, Cap0 ile karşılaştırıldığında, son nükleo tarafın 3 pozisyonunda ek bir metil grubu içerir. Bu sayede ters yönde üretilen mRNA'ların önüne geçilmiş olur ve dolayısıyla translasyon verimi artar (Zhong ve ark., 2018).

Yakın zamana kadar, en popüler Cap analogu ARCA olarak biliniyordu. Fakat günümüzde CleanCap teknolojisi Cap analogları içerisinde en modern teknik olarak değerlendirilir. Standart Cap analogları ve ARCA Cap analogunun düşük verimi ve yüksek enzim maliyetlerine bir çözüm olması amacıyla geliştirilmiştir. Transkripsiyonunu başlatmak için bir dimer (m7GpppG) kullanan ARCA'nın aksine, CleanCap bir trimer (m7GpppAmG) kullanarak transkripsiyona başlar. CleanCap T7 RNA polimeraz ile kombinasyon halindeyken 5' ucundaki nükleotidlerin kimliği daha esnektir ve bu sayede çeşitli başlangıç dizilerine izin verir. Diğer cap analogları içerisinde CleanCap en düşük immünojeniteye sahip olmasıyla öne çıkar ve ökaryotik hücrelerdeki Cap yapısına benzer bir doğal Cap1 analogu oluşturur (McCaffrey, 2019).

Translasyona Uğramayan Bölgeler

mRNA'nın açık okuma bölgelerindeki başlama

kodonundan önceki ve bitiş kodonundan sonraki translasyona uğramayan kısımlar 5' ve 3' UTR (Untranslated Region) olarak adlandırılır. Bu bölgeler gen ifadesinde çeşitli işlevlere sahiptir. 5' ve 3' UTR'ler mRNA stabilitesi, mRNA lokalizasyonu ve translasyon verimliliği üzerinde etkiye sahiptir (Mugridge ve ark., 2018). 5' ve 3' UTR'ler, mRNA'nın bozulma sürecinde devreye giren ribonükleazlar ile etkileşime girdikleri için bu bölgelerin stabilite üzerine etkisi büyüktür (Tisen ve ark., 2015). mRNA'nın sitoplazmada konumlanmasında daha çok 3' UTR'nin etkili olduğu düşünülmektedir (Zhao ve ark., 1999).

Poli A Kuyruğu

Poli (A) kuyruğu, mRNA'nın translasyonunda ve mRNA'nın enzimatik stabilitesinde önemli bir rol oynar. Aynı zamanda, Cap bölgesi eklenmesinde ve mRNA bozulmasının önlenmesinde de görevlidir (Mugridge ve ark., 2018).

Holtkamp ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mRNA'nın dayanıklılığında rol oynayan 3' ucundaki Poli (A) kuyruğunun yapısı ile translasyon verimi arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada 120 baza kadar olan ve adenosin ile biten bir Poli (A) kuyruğunun daha az sayılı ya da adenosin ile bitmeyen bir kuyruğa göre çok daha verimli olduğu belirtilmiştir (Holtkamp ve ark., 2006). Yapılan başka bir çalışmada ise mRNA'nın Poli (A) kuyruk uzunluğundaki 120 baza kademeli bir artışın, protein ekspresyon seviyesini orantılı bir şekilde artırdığı, 120'nin üzerindeki bazların sayısındaki bir artışın ise protein ekspresyonunu daha fazla artırmadığı gösterilmiştir (Kormann ve ark., 2011).

Poli (A) kuyruğu, DNA şablonundaki Poli (A) kuyruğunu kodlayarak veya rekombinant Poli (A) polimeraz kullanılarak transkripsiyondan sonra mRNA'ya eklenebilir. Bununla birlikte, rekombinant poli (A) polimeraz ile poliadenilasyon, değişken poli (A) kuyruk uzunluğu ve dolayısıyla çeşitli uzunluklarda poliadenile mRNA ile sonuçlanır (Wadhwa ve ark., 2020). Bu nedenle, tercih edilen yaklaşım, Poli (A) kuyruk kodlayan DNA şablonlarından transkribe edilen mRNA'lardan iyi tanımlanmış uzunlukta Poli (A) kuyrukların üretilmesidir (Holtkamp ve ark., 2006).

Nükleotid Modifikasyonu

Nükleotid baz modifikasyonu, RNA bazlı aşılara yönelik doğuştan gelen antiviral bağışıklığın etkisini azaltarak aşının etkinliğini artırabilir. Doğal mRNA, PRR'leri uyarabilirken, 2-tiouridin, 5-metilsitidin veya psödouridin gibi baz modifikasyonlarına sahip mRNA, doğuştan gelen bağışıklığın etkilerini sınırlayabilir (Karikó ve ark., 2005). Ek olarak, bu tür değişiklikler mRNA'yı ribonükleazlar tarafından degradasyondan koruyabilir ve böylece antijen ekspresyonunu artırabilir (Yin ve ark., 2014). Bu nedenle, mRNA'nın belirli nükleotid baz modifikasyonları, PRR'lerin etkileşimini ve/veya aktivitesini, dolayısıyla tip I IFN indüksiyonunu modüle ederek mRNA aşılarının etkinliğini artırabilir.

mRNA'daki kodlama bölgelerinin nükleotid içeriği, hücrelerdeki gen ekspresyonunun büyüklüğü üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Örneğin, viral genlerin aksine, memeli genlerinin kodonları üçüncü kodon pozisyonunda sıklıkla bir Guanin (G) veya bir Sitozin (C) sunar ve üçüncü pozisyonunda Adenin (A) veya Timin (T) sunanlara göre daha iyi bir verimlilikle eksprese edilir (Zhong ve ark., 2005).

mRNA'NIN İLETİMİ

mRNA bazlı aşılarda umut verici potansiyeline rağmen, mRNA bazlı aşılarda umut verici potansiyeline rağmen, mRNA'nın sitozole etkili hücre içi iletimi, özellikle sistemik olarak uygulanan mRNA için büyük bir engel oluşturmaya devam etmektedir. mRNA'nın 105-106 Da olan büyük moleküler ağırlığı ve yüksek negatif yük yoğunluğu, mRNA'nın hücrel membranlardan geçişini zorlaştırır (Kowalski ve ark., 2019). Bir iletim sistemi yokluğunda mRNA'nın absorpsiyonunun son derece düşük olduğu ve mRNA'nın yarı ömrünün yaklaşık 7 saat olduğu iyi bilinmektedir (Sharova ve ark., 2009). Dahası mRNA, 5' eksonükleazlar, 3' eksonükleazlar ve endonükleazlar tarafından parçalanmaya oldukça yatkın olan, doğası gereği kararsız bir moleküldür (Houseley ve Tollervey, 2009). Sonuç olarak, iletim sistemleri, mRNA'nın terapötik etki bölgesine in vitro ve in vivo hücre içi iletimi için zorunludur (Deering ve ark., 2014).

Mikroenjeksiyonlar (Golombek ve ark., 2018), RNA yamaları (Koh ve ark., 2018), gen tabancası bazlı uygulama (Tavernier ve ark., 2011), protamin yoğunlaşması (Zhang ve ark., 2018), RNA

adjuvanları (Schlake ve ark., 2012) ve lipidlerden ve/veya polimerlerden oluşan nanopartiküllerde mRNA'nın kapsüllenmesi gibi geliştirilmiş enjeksiyon stratejileri de dahil olmak üzere mRNA iletimini iyileştirmek için farklı stratejiler araştırılmıştır (Mukherjee ve ark., 2019).

Viral Vektörler

mRNA iletimi için genellikle genetiği değiştirilmiş virüsler kullanılır. Bu virüslerin genleri, kısmen veya tamamen model genlerle ikame edilir. Pozitif polariteli RNA virüsleri, konakçı ribozomlar tarafından doğrudan ilgilenilen proteinlere dönüştürülebilen bir genomik sekansa sahiptir. Özellikle, mRNA iletimi için Alfavirüsler (Ehrengruber ve ark., 2011), Pikonavirüsler (Rozovics ve ark., 2012) ve Flavivirüsler (Schott ve ark., 2016) kullanılır. Yüksek fakat geçici gen ekspresyon seviyeleri, geniş konak hücre özgüllüğü, düşük patojenitesi ve güçlü immünojenisitesi nedeniyle Paramyxoviridae ailesine ait Sendai virüsü de tercih edilen vektörler arasındadır (Nakanishi ve Otsu, 2012).

Viral vektörlerin kullanılması, diğerlerinin yanı sıra genom entegrasyonu ve olası konak reddi (immünojenite ve sitotoksiste) gibi önemli dezavantajları içerir (Tezel ve ark., 2004). Bu nedenle mRNA iletimi için viral olmayan vektörlere olan ihtiyaç daha ön plandadır (Ramamoorth ve Narvekar, 2015).

Polimer Tabanlı Vektörler

Polimerler, suda çözünebilen ve amino gruplarıyla ilişkili yüksek yoğunluklu pozitif yük sergileyebilen in vitro transfeksiyon için etkinliği kanıtlanmış mRNA taşıyıcılarıdır (Gary ve ark., 2011).

Dietilaminoetil (DEAE) dekstran IVT mRNA iletimi için test edilen ilk polimerdir (Koch, 1973). Fakat günümüzde polyethylenimine (PEI) ve türevleri en yaygın olarak kullanılan katyonik polimerler arasındadır (Ulkoski ve ark., 2019).

Katyonik polimer kullanan mRNA aşısının güvenli ve etkili transfeksiyonu ilk kez, siklodekstrine konjuge edilen 2 kDa PEI'nin intranazal uygulaması ile elde edilmiştir. PEI'ye konjuge edilen siklodekstrin, poliamin omurgasındaki yük yoğunluğunun delokalizasyonunu sağlayarak sitotoksiteyi azaltmıştır ve aynı zamanda protonlanabilen grupları korumuştur. Bu da transfeksiyonun iyileşmesine neden olmuştur (Ilarduya

ve ark., 2010).

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden oluşan polimerik nanopartiküller, örneğin poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), hidrofobik ve pozitif yüklü moleküllerin dahil edilmesi için çok uygundur. İyi kolloidal stabilite, düşük toksisite ve sürekli salım olasılığı sağlarlar. Bununla birlikte, PLGA'nın fizyolojik pH'daki anyonik yapısı nedeniyle mRNA kapsülleme verimliliği çok düşüktür (Rosenkranz ve Sobolev, 2015).

Lipid Tabanlı Vektörler

Lipidlere veya lipid benzeri bileşiklere (lipidoidler) dayalı vektörler, en yaygın olarak kullanılan viral olmayan gen taşıyıcıları sınıfına dahildir (Kowalski ve ark., 2019). Lipozomlar veya lipid nanopartiküller (LNP'ler) oluşturmak için çeşitli sentetik ve doğal yoldan türetilmiş lipidler kullanılmıştır ve bu vektörlerin mRNA bazlı aşıları verimli bir şekilde ilettiği kanıtlanmıştır (Wadhwa ve ark., 2020).

Fosfolipitlerin sulu sistemlerde dağıldığında kendiliğinden birleşerek oluşturduğu kapalı zar yapıları lipozom olarak adlandırılır (Akbarzadeh ve ark., 2013). Lipozomlar, bir çekirdeği çevreleyen hücre zarı yapısını taklit eder ve en az bir fosfolipid tabakasından oluşurlar. Lipid nanoparteküller ise genellikle amin grupları içeren katyonik lipidler kullanılarak formüle edilir. Bu amin gruplarının sağladığı pozitif yük ile katyonik lipidler, polianyonik mRNA'yı kendiliğinden kapsüllemektedir ve bu nedenle mRNA'nın lipofeksiyonu için tek başına veya kombinasyon halinde kullanılmıştır (Hajj ve Whitehead, 2017).

Peptid Tabanlı Vektörler

Peptid bazlı sistemler, mRNA iletimi için sunabileceği avantajlar nedeniyle son dönemlerde ivme kazanmaktadır. Polimerler gibi hem tek başına hem de diğer malzemelerle kombinasyon halinde peptid bazlı uygulama sistemleri denenmiştir. Yakın bir zamanda, daha iyi bir transkripsiyon verimi elde etmek amacıyla, mRNA stabilitesi arttırmak için hem polimer (PLA) bazlı miselleri hem de katyonik bir füzojenik peptidi (RALA) birleştiren yeni bir polimer-peptid hibrit mRNA iletim nanoplatformu tanıtılmıştır. Bu nanopartikülün , mRNA'yı serum nükleaz bozunmasına karşı koruduğu ve DC transfeksiyonu sağladığı bildirilmiştir (Lacroix ve ark., 2020).

ÜRETİM AŞAMALARI

Hem geleneksel hem de kendi kendini çoğaltan mRNA aşları, tıpkı ökaryotik bir mRNA gibi Cap bölgesi, 5' ve 3' translasyona uğramayan bölgeler, açık okuma bölgesi ve Poli (A) kuyruğu gibi yapısal bölgelerden oluşur (Geall ve ark., 2013). Her iki tip mRNA da, doğrusallaştırılmış/lineer bir pDNA şablonundan bir enzimatik transkripsiyon reaksiyonu kullanılarak üretilir (Pardi ve ark., 2013).

mRNA üretimindeki ilk adım, DNA'ya bağımlı bir RNA polimeraza (örneğin, T7, SP6 veya T3) yüksek bağlanma afinitesine sahip bir promoter sekansı ve spesifik mRNA aşısını kodlayan sekans içeren bir pDNA'nın oluşturulmasıdır. pDNA, bir restriksiyon enzimi ile

doğrusallaştırılır/lineerleştirilir ve DNA'ya bağımlı bir RNA polimeraz kullanılarak bir in vitro transkripsiyon reaksiyonu için bir şablon olarak kullanılır. Enzim, şablonun sonundan çıkana kadar RNA transkriptini uzatarak şablon boyunca hareket eder (Maruggi ve ark., 2019). Şablon DNA daha sonra DNaz ile inkübasyon yoluyla bozulur ve mRNA'nın 5' ucuna enzimatik olarak bir Cap bölgesi [m7Gp3N] eklenir (Martin ve Moss, 1975). Alternatif olarak, tek adımlı bir prosedürde in vitro transkripsiyon reaksiyonu sırasında sentetik bir Cap analogu da eklenebilir (Stepinski ve ark., 2007). 5' uçlu bir yapının varlığı, in vivo verimli bir translasyon için çok önemlidir ve mRNA'yı hücre içi nükleaz sindiriminden

Tablo 1. Çeşitli Faz Aşamalarındaki mRNA Aşları (Wei, 2021).

mRNA Aşısı	Hastalık	Uygulama Yolu	Faz Aşaması	Sponsor
BNT162b2	SARS-CoV-2	Deltoid Kas	Kullanımı Onaylı	Pfizer- BioNTech
mRNA-1273	SARS-CoV-2	Deltoid Kas	Kullanımı Onaylı	Moderna
CV2nCoV/CVnCoV	SARS-CoV-2	İntramuskuler	Klinik Öncesi	CureVac
ARCoV	SARS-CoV-2	İntramuskuler	Faz 3	Walvax Biotechnology
CV7201	Kuduz	Parenteral	Faz 1	CureVaC
CV7202	Kuduz	İntramuskuler	Faz 1	CureVaC
mRNA-H10N8, mRNA-H7N9	İnfluenza	İntramuskuler	Faz 1	Moderna
mRNA-1345	Respiratorik Sinsityal Virüs	İntramuskuler	Faz 1	Moderna
mRNA-1653	Metapnömovirüs ve Parainfluenza Tip-3	İntramuskuler	Faz 1	Moderna
mRNA-1647	Sitomegalovirüs	İntramuskuler	Faz 3	Moderna
mRNA-1893	Zika Virüs	İntramuskuler	Faz 2	Moderna
mRNA-1189	Epstein-Barr Virüs	Parenteral	Klinik Öncesi	Moderna
HIV SAM ve HIV VRP	HIV	İntramuskuler	Klinik Öncesi	Biomedical Primate Research Centre
HIV-I Gag	HIV	Subkutan	Klinik Öncesi	Virology Unit, Institute of Tropical Medicine
SAM Vaccine	Streptococcus	İntramuskuler	Klinik Öncesi	GlaxoSmithKline

korur (Li ve Kiledjian, 2010).

Sentez tamamlandıktan sonra enzimler, kalıntı şablon DNA, kesilmiş transkriptler veya anormal çift sarmallı transkriptler dahil olmak üzere reaksiyon bileşenlerini çıkartılarak mRNA saflaştırılır. Çeşitli kontaminantlar spesifik olmayan doğal savunma mekanizmalarını uyarabilme potansiyeli taşıdığı için mRNA'nın saflaştırılması aşının etkinliği için oldukça önemlidir (Pascolo, 2004; Mu ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar mRNA'nın çift sarmallı RNA (dsRNA) kirleticilerinden arındırılmasının in vivo translasyonu artırabileceğini ve doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunu azaltabileceğini göstermiştir (Karikó ve ark., 2011).

mRNA görünüm, içerik, bütünlük, kalıntı DNA, endotoksin kontaminasyonu ve sterilliği değerlendirmek için testlere tabi tutulur (Muralidhara ve ark., 2016). Bir sonraki basamakta bir iletim sistemi kullanılarak hedef hücrelere teslim edilen mRNA'nın istenen bir protein ürününe çevrilme yeteneğinin doğrulanması gerekir (Kramps ve Elbers, 2017). Bu yaklaşım sayesinde pek çok hastalığa karşı, diğer aşı platformlarına kıyasla daha kısa sürede ve ucuz maliyetle aşı geliştirilmesi mümkün olmuştur (Wadhwa ve ark., 2020). Çeşitli hastalıklara karşı geliştirilmekte olan aşı preparatları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Sonuç olarak, mRNA aşıları neredeyse otuz yıldır var olmasına rağmen, FDA tarafından şu an için sadece SARS-CoV-2 için mRNA aşılarının kullanımı onaylanmıştır. Bu hızlı onay sürecinin, yaşlılar, çocuklar, hamile kadınlar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar gibi hassas gruplar için mRNA bazlı aşılarda güvenliği ile ilgili bazı endişeler yaratmasına rağmen faz 2 ve 3 klinik deneylerinden ortaya çıkan veriler, mRNA aşılarının bu gruplar için güvenli olduğunu göstermiştir (Riley, 2021; Shimabukuro ve ark., 2021). SARS-CoV-2 pandemi sürecindeki mRNA aşılarının başarıları, gelecekte mRNA aşı platformunun diğer bulaşıcı hastalıklara da genişletilebileceğini düşündürmektedir (Wei, 2021). mRNA belirli epitoplara ya da bütün protein antijenini kodlayabildiği için istenilen majör doku uygunluk kompleksi (MHC) moleküllerine göre tasarlanabilmekte ve bu sayede çok çeşitli patojenlere karşı aşı geliştirilebilmektedir (Maruggi ve ark., 2019). Genoma entegre olmaması, kısa sürede üretilmesi, sadece belirli bir süre aktif olması ve güçlü bağışıklık oluşturmaması

gibi avantajları sayesinde gelecekte hem beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimliğinde kullanımı amacıyla yakın gelecekte mRNA aşılarda geliştirilmesi kaçınılmazdır. Hali hazırda çeşitli faz aşamalarında bulunan Kuduz (Aldrich ve ark., 2021), İnfluenza (Feldman ve ark., 2019), Parainfluenza-3 (Shaw ve ark., 2019), Sitomegalovirüs (National Library of Medicine [NLM], NCT05085366), HIV (Pollard ve ark., 2013), Zikavirüs (Richner ve ark., 2017) ve Ebola (Meyer ve ark., 2018) gibi hastalıklara karşı geliştirilen aşı çalışmalarının, klinik deneyleri tamamlaması neticesinde yakın gelecekte kullanımı onaylanarak mRNA aşı platformunun yeni üyeleri olarak karşımıza çıkması muhtemeldir.

KAYNAKLAR

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102.
- 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. (2021). Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. *Vaccine*, 39(8), 1310–1318.
- Deering, R. P., Kommareddy, S., Ulmer, J. B., Brito, L. A. & Geall, A. J. (2014). Nucleic acid vaccines: Prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines. In *Expert Opinion on Drug Delivery* Vol. 11, Issue 6, pp. 885–899.
- Desmettre P. (2019). Veterinary Vaccines in the Development of Vaccination and Vaccinology. *History of Vaccine Development*, 30,329-338.
- Ehrengruber, M. U., Schlesinger, S. & Lundstrom, K. (2011). Alphaviruses: Semliki forest virus and sindbis virus vectors for gene transfer into neurons. *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 4 (SUPPL.57).
- Feldman, R. A., Fuhr, R., Smolenov, I., Ribeiro, A., Panther, L., Watson, M., Senn, J. J., Smith, M., Almarsson, Örn, Pujar, H. S., Laska, M. E., Thompson, J., Zaks, T. & Ciaramella, G. (2019). mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine*, 37(25), 3326–3334.
- Gary, D. J., Lee, H., Sharma, R., Lee, J. S., Kim, Y., Cui, Z. Y., Jia, D., Bowman, V. D., Chipman, P. R., Wan, L., Zou, Y., Mao, G., Park, K., Herbert, B. S.,

- Konieczny, S. F. & Won, Y. Y. (2011). Influence of nano-carrier architecture on in vitro siRNA delivery performance and in vivo biodistribution: Polyplexes vs micelleplexes. *ACS Nano*, 5(5), 3493–3505.
- Geall, A. J., Mandl, C. W. & Ulmer, J. B. (2013). RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. In *Seminars in Immunology* (Vol. 25, Issue 2, pp. 152–159). Academic Press.
- Golombek, S., Pilz, M., Steinle, H., Kochba, E., Levin, Y., Lunter, D., Schlensak, C., Wendel, H. P. & Avci-Adali, M. (2018). Intradermal Delivery of Synthetic mRNA Using Hollow Microneedles for Efficient and Rapid Production of Exogenous Proteins in Skin. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 11, 382–392.
- Grudzien-Nogalska, E., Stepinski, J., Jemielity, J., Zuberek, J., Stolarski, R., Rhoads, R. E. & Darzynkiewicz, E. (2007). Synthesis of Anti-Reverse Cap Analogs (ARCAs) and their Applications in mRNA Translation and Stability. In *Methods in Enzymology* Vol. 431, pp. 203–227.
- Hajj, K. A. & Whitehead, K. A. (2017). Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 2).
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö. & Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 4009–4017.
- Houseley, J. & Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. In *Cell* Vol. 136, Issue 4, pp. 763–776.
- Iavarone, C., O'hagan, D. T., Yu, D., Delahaye, N. F. & Ulmer, J. B. (2017). Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 16(9), 871–881.
- 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.
- Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. & Weissman, D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 142.
- Koh, K. J., Liu, Y., Lim, S. H., Loh, X. J., Kang, L., Lim, C. Y. & Phua, K. K. L. (2018). Formulation, characterization and evaluation of mRNA-loaded dissolvable polymeric microneedles (RNApatch). *Scientific Reports*, 8(1).
- Kormann, M. S. D., Hasenpusch, G., Aneja, M. K., Nica, G., Flemmer, A. W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Mays, L. E., Illenyi, M., Schams, A., Griesse, M., Bittmann, I., Handgretinger, R., Hartl, D., Rosenecker, J. & Rudolph, C. (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature Biotechnology*, 29(2), 154–159.
- Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L. & Anderson, D. G. (2019). Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. In *Molecular Therapy* Vol. 27, Issue 4, pp. 710–728.
- Kramps, T. & Elbers, K. (2017). Introduction to RNA vaccines. In *Methods in Molecular Biology*.
- Kreiter, S., Selmi, A., Diken, M., Sebastian, M., Osterloh, P., Schild, H., Huber, C., Türeci, Ö. & Sahin, U. (2008). Increased Antigen Presentation Efficiency by Coupling Antigens to MHC Class I Trafficking Signals. *The Journal of Immunology*, 180(1), 309–318.
- Lacroix, C., Humanes, A., Coiffier, C., Gigmès, D., Verrier, B. & Trimaille, T. (2020). Polylactide-Based Reactive Micelles as a Robust Platform for mRNA Delivery. *Pharmaceutical Research*, 37(2).
- Li, Y. & Kiledjian, M. (2010). Regulation of mRNA decapping. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(2), 253–265.
- Martin, S. A. & Moss, B. (1975). Modification of RNA by mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine 7) methyltransferase from vaccinia virions. *Journal of Biological Chemistry*, 250(24), 9330–9335.
- Maruggi, G., Zhang, C., Li, J., Ulmer, J. B. & Yu, D. (2019). mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Molecular Therapy*, 27(4), 757–772.
- McCaffrey, A. P. (2019). RNA Epi-transcriptome: Role of the 5' Cap. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 39(5).
- 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.
- Mugridge, J. S., Collier, J. & Gross, J. D. (2018). Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'–3' mRNA decay. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(12), 1077–1085.
- Mukherjee, A., Waters, A. K., Kalyan, P., Achrol, A. S., Kesari, S. & Yenugonda, V. M. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next generation drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. In *International Journal of Nanomedicine* Vol. 14, pp. 1937–1952.
- Muralidhara, B. K., Baid, R., Bishop, S. M., Huang, M., Wang, W. & Nema, S. (2016). Critical considerations for

- developing nucleic acid macromolecule based drug products. In *Drug Discovery Today* Vol. 21, Issue 3, pp. 430–444.
- Nakanishi, M. & Otsu, M. (2012). Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Current Gene Therapy*, 12(5), 410–416.
- National Library of Medicine (2021). A Study to Evaluate the Efficacy, Safety, and Immunogenicity of mRNA-1647 Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in Healthy Participants 16 to 40 Years of Age. Erişim tarihi: 21 Aralık 2021, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05085366>
- Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D. & Karikó, K. (2013). In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides. *Methods in Molecular Biology*, 969, 29–42.
- Pascolo, S. (2004). Messenger RNA-based vaccines. In *Expert Opinion on Biological Therapy* Vol. 4, Issue 8, pp. 1285–1294.
- Pollard, C., Rejman, J., De Haes, W., Verrier, B., Van Gulck, E., Naessens, T., De Smedt, S., Bogaert, P., Grooten, J., Vanham, G. & De Koker, S. (2013). Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Molecular Therapy*, 21(1), 251–259.
- Ramamoorthi, M. & Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in gene therapy - An overview. In *Journal of Clinical and Diagnostic Research* Vol. 9, Issue 1, pp. 01–06.
- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., Julander, J. G., Tang, W. W., Shresta, S., Pierson, T. C., Ciaramella, G. & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*, 169(1), 176.
- Riley, L. E. (2021). mRNA Covid-19 Vaccines in Pregnant Women. *New England Journal of Medicine*, 384(24), 2342–2343.
- Rosenkranz, A. A. & Sobolev, A. S. (2015). Polyethylenimine-based polyplex nanoparticles and features of their behavior in cells and tissues. In *Russian Chemical Bulletin* (Vol. 64, Issue 12, pp. 2749–2755).
- Rozovics, J. M., Chase, A. J., Cathcart, A. L., Chou, W., Gershon, P. D., Palusa, S., Wilusz, J. & Semler, B. L. (2012). Picornavirus modification of a host mRNA decay protein. *MBio*, 3(6).
- Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M. & Kallen, K. J. (2012). Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biology*, 9(11), 1319–1330.
- Schott, J. W., Morgan, M., Galla, M. & Schambach, A. (2016). Viral and synthetic RNA vector technologies and applications. In *Molecular Therapy* (Vol. 24, Issue 9, pp. 1513–1527).
- Sharova, L. V., Sharov, A. A., Nedorezov, T., Piao, Y., Shaik, N. & Ko, M. S. H. (2009). Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Research*, 16(1), 45–58.
- Shaw, C., Lee, H., Knightly, C., Kalidindi, S., Zaks, T., Smolenov, I. & Panther, L. (2019). 2754. Phase 1 Trial of an mRNA-Based Combination Vaccine Against hMPV and PIV3. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Supplement_2), S970–S970.
- Shimabukuro, T. T., Kim, S. Y., Myers, T. R., Moro, P. L., Oduyebo, T., Panagiotakopoulos, L., Marquez, P. L., Olson, C. K., Liu, R., Chang, K. T., Ellington, S. R., Burkel, V. K., Smoots, A. N., Green, C. J., Licata, C., Zhang, B. C., Alimchandani, M., Mba-Jonas, A., Martin, S. W., Meaney-Delman, D. M. (2021). Preliminary Findings of mRNA Covid-19 Vaccine Safety in Pregnant Persons. *New England Journal of Medicine*, 384(24), 2273–2282.
- Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N. N., De Smedt, S. C. & Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: How to control protein expression. In *Journal of Controlled Release* Vol. 150, Issue 3, pp. 238–247.
- Tezel, A., Dokka, S., Kelly, S., Hardee, G. E. & Mitragotri, S. (2004). Topical delivery of anti-sense oligonucleotides using low-frequency sonophoresis. *Pharmaceutical Research*, 21(12), 2219–2225.
- Tisen, X., Xuegui, L., Dejie, J., Zhao, H., X. & Zhongmin, D. (2015). Mechanism of 5'-to-3' degradation of eukaryotic and prokaryotic mRNA. In *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* (Vol. 37, Issue 3, pp. 250–258).
- Tros de Ilarduya, C., Sun, Y. & Düzgüneş, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 40, Issue 3, pp. 159–170.
- Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C. & Thakur, A. (2020). Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics*, 12(2).
- Wei, J. (2021). The Development of mRNA Vaccines for Infectious Diseases : Recent Updates. 5271–5285.
- Weissman, D. (2014). mRNA transcript therapy. *Expert Review of Vaccines*, 14(2), 265–281.
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R. & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. In *Nature Reviews Genetics* Vol. 15, Issue 8, pp. 541–555.

- Youn, H. & Chung, J. K. (2015). Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. In Expert Opinion on Biological Therapy Vol. 15, Issue 9, pp. 1337–1348.
- Zhang, R., Men, K., Zhang, X., Huang, R., Tian, Y., Zhou, B., Yu, C., Wang, Y., Ji, X., Hu, Q. & Yang, L. (2018). Delivery of a modified mRNA encoding IL-22 binding protein (IL-22BP) for colon cancer gene therapy. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(7), 1239–1251.
- Zhao, J., Hyman, L. & Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 405–445.
- Zhong, F., Cao, W., Chan, E., Tay, P. N., Cahya, F. F., Zhang, H. & Lu, J. (2005). Deviation from major codons in the Toll-like receptor genes is associated with low Toll-like receptor expression. *Immunology*, 114(1), 83–93.