



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# RNA-rokotteiden syöpäindikaatiot

Anni Piuhola

Bio-orgaanisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

10.4.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Anni Piuhola

**Otsikko:** RNA-rokotteiden syöpäindikaatiot

**Ohjaaja:** Heidi Korhonen

**Sivumäärä:** 20 sivua

**Päivämäärä:** 10.4.2025

---

RNA-rokotteet ovat lupaava tulevaisuuden hoitomenetelmä syöpää vastaan, sillä ne mahdollistavat yksilöllisen ja kohdennetun hoidon. Viime vuosikymmenten aikana tehdyt tutkimukset, teknologiset innovaatiot sekä COVID 19-pandemian myötä syntyneet harppaukset RNA-rokotteiden kehityksessä ovat mahdollistaneet mRNA:n terapeuttisen potentiaalin löytämisen myös syövän hoidossa.

RNA-rokotteet sisältävät RNA:ta (mRNA) joka on syntetisoitu *in vitro* -transkriptiolla, käyttämällä bakteriofagin RNA-polymeraasia sekä templaatti-DNA:ta, joka koodaa haluttua antigeeniä. mRNA-rokotteiden peruseräteenä on, että antigeenejä koodaavat mRNA-molekyylit toimitetaan kohdesoluihin, joissa ne käynnistävät immuunivasteen. Koska mRNA on luonnostaan epästabiili, sen kuljetukseen hyödynnetään esimerkiksi dendriittisoluja tai lipidinanopartikkeleita, joita voidaan kemiallisesti muokata niiden ominaisuuksien parantamiseksi.

RNA-rokotteiden etuna on se, että niiden käytössä ei ole riskejä infektiioon tai vaaraa integroitumisesta osaksi genomia. Normaalit soluprosessit hajottavat mRNA:ta ja sen *in vivo* -puoliintumisaikaa voidaan säädellä erilaisilla modifikaatioilla. Kliiniset tutkimukset ovat jo osoittaneet lupaavia tuloksia syövän hoidossa, mutta haasteina ovat esimerkiksi immuunivasteen optimointi ja kuljetusmenetelmien kehittäminen. Tulevaisuudessa RNA-rokotteet voivat tarjota tehokkaan ja räätälöitävän vaihtoehdon perinteisille syöpähoidoille.

---

**Avainsanat:** mRNA-rokotteet, syöpä, immunoterapia

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b><i>Johdanto</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>RNA-molekyylien kemiallinen rakenne ja modifikaatiot</i></b> .....	<b>1</b>
2.1	<b>Modifikaatiot</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b><i>mRNA:n kuljetus kohdesoluun &amp; kuljetusjärjestelmien optimointi</i></b> .....	<b>5</b>
3.1	<b>Lipidinanopartikkelit &amp; niiden rakenne</b> .....	<b>5</b>
3.1.1	Ionisoituvat lipidit & niiden kemialliset ominaisuudet .....	6
3.1.2	Apulipidit ja sterolit.....	8
3.1.3	Polyetyleeniglykoli (PEG) .....	8
3.2	<b>Dendriittisolut mRNA:n kuljetuksessa</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b><i>RNA-rokotteiden sovellukset syöpäindikaatioissa</i></b> .....	<b>10</b>
4.1	<b>Kasvainperäisiin antigeeneihin pohjautuvat rokkeet</b> .....	<b>10</b>
4.2	<b>Kasvainspesifisiin antigeeneihin pohjautuvat rokkeet</b> .....	<b>11</b>
4.3	<b>mRNA-rokotteiden kohdesyövät</b> .....	<b>11</b>
<b>5</b>	<b><i>Yhteenveto</i></b> .....	<b>13</b>
<b>6</b>	<b><i>Viitteet</i></b> .....	<b>14</b>

## Lyhenteet

RNA – Ribonukleiinihappo

mRNA – Lähetti-RNA

rRNA – Ribosomaalinen RNA

tRNA – Siirtäjä-RNA

IVT – *In vitro* -transkriptoitu (engl. *In vitro* transcribed)

DNA – Deoksiribonukleiinihappo

UTR – Koodaamaton alue (engl. Untranslated region)

Ψ – Pseudouridiini

ARCA – Anti-reverse cap-analogi

CPP – Soluun tunkeutuva peptidi (engl. Cell penetrating peptide)

circRNA- rengasmainen RNA (engl. Circular RNA)

LNP – Lipidinanopartikkeli

PEG – Polyetyleeniglykoli

MHC I – Luokan I MHC-solu (Engl. Class I Major Histocompatibility Complex)

TAA – Kasvainperäinen antigeeni (Engl. Tumor-associated antigen)

hTERT – Ihmisen telomeraasikäänteisokopioijaentsyymi (Engl. Human telomerase reverse transcriptase)

TSA – Kasvainspesifinen antigeeni (Engl. Tumor-specific antigen)

RCC – Munuaissyöpä (Engl. Renal cell carcinoma)

SCLC – Pienisolainen keuhkosityöpä (Engl. Small cell lung cancer)

NSCLC – Ei-pienisolainen keuhkosityöpä (Engl. Not-small cell lung cancer)

ICI - Immuunitarkistupisteiden estäjä (Immune checkpoint inhibitor)

## 1 Johdanto

Syöpään kohdistuvan immunoterapian tarkoituksena on stimuloida isännän immuunipuolustusta, joka johtaisi kasvaimen kutistumiseen sekä potilaiden kliinisten tulosten parantumiseen.<sup>1</sup> mRNA-pohjaiset syöpärokotteet edustavat syövän immunoterapian uutta aikakautta.<sup>2</sup>

Viime vuosikymmenten aikana uudet teknologiset innovaatiot, tutkimukset ja COVID 19-pandemian aiheuttamat harppaukset RNA-rokotekehityksessä ovat mahdollistaneet mRNA:n terapeuttien potentiaalin löytämisen.<sup>3,4</sup> mRNA:n ajateltiin pitkään olevan liian labiili kuljetettavaksi soluihin tai kudoksiin, ja tutkimuksen painopiste sijoittui lähinnä DNA-rokotteisiin. Pian saatiin kuitenkin selville, että mRNA:n varovaisella käsittelyllä ja esimerkiksi lipidikompleksilla suojaamalla se pystyy ilmentämään spesifisiä proteiineja *in vitro* ja *in vivo*.<sup>3</sup> Ensimmäinen raportoitu onnistunut *in vitro* -transkriptoitu (IVT, In vitro transcribed) mRNA:n käyttö raportoitiin vuonna 1990, kun hiiren injektioitiin reportterigeeni mRNA:ta, ja hiiren havaittiin tuottavan haluttua proteiinia.<sup>3</sup>

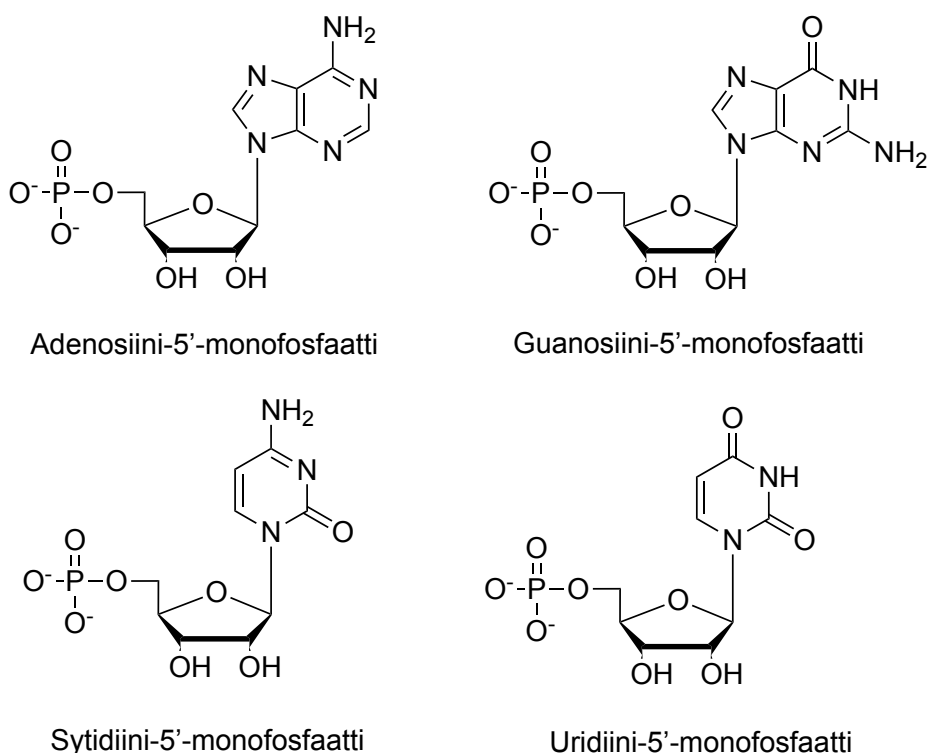
mRNA-rokotteiden peruseriaate on se, että antigeenejä koodaavat mRNA-molekyylit toimitetaan kohdesoluun, jossa ne saavat mahdollisesti aikaan immuunivasteen.<sup>5</sup> Yksi mRNA-rokotteiden isoimmista eduista on sen turvallisuus.<sup>2</sup> mRNA-rokotteet tarjoavat monia etuja perinteisiin rokotteisiin ja DNA-rokotteisiin nähden, sillä mRNA:n käytössä ei ole riskiä infekioon tai sen liittymisestä osaksi genomia. Lisäksi mRNA:n tarvitsee päästä vain solun sytoplasmaan toimiakseen.<sup>1,2</sup> Normaalit soluprosessit hajottavat mRNA:ta ja sen *in vivo* -puoliintumisaikaa voidaan säädellä erilaisilla modifikaatioilla ja kuljetusmenetelmillä. mRNA-rokotteet tarjoavat mahdollisuuden nopeaan ja halpaan tuotantoon.<sup>4</sup>

mRNA-rokotteiden kenttä kehittyi nopeasti saatavilla olevan prekliinisen datan ansiosta. Tässä tutkielmassa keskitymme RNA-rokotteiden etuihin syövän hoidossa, miten rokotteita voidaan kemiallisesti parantaa ja minkäläisten syöpien hoidossa RNA-rokotteita on hyödynnetty.

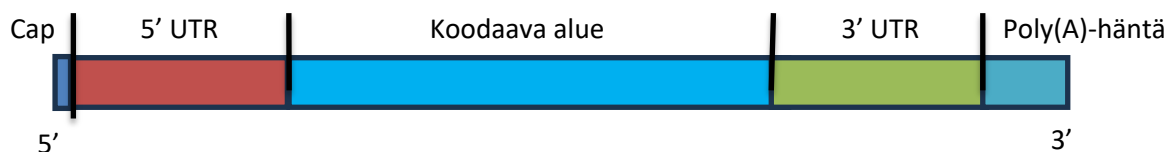
## 2 RNA-molekyyliden kemiallinen rakenne ja modifikaatiot

Ribonukleiinihapot (RNA) ovat polymeerisiä molekyylejä, jotka rakentuvat ribonukleotideista (kuva 1). Soluista löytyy pääosin kolmea erilaista RNA:ta: lähetti-RNA:ta (mRNA), ribosomaalista RNA:ta (rRNA) sekä siirtäjä RNA:ta (tRNA).<sup>6</sup> mRNA on välivaihe proteiinia koodaavan DNA:n ja sytoplasman ribosomien proteiinituotannon välillä, sillä se koodaa solun proteiineja.<sup>4,6</sup> Tyypillinen ihmisen proteiinia

koodaava mRNA:n rakenne sisältää 5'-cap-rakenteen, 5' ei-koodaavan alueen (untranslated region, UTR), koodaavan alueen, 3' UTR:n sekä poly(A)-hännän (kuva 2).<sup>7</sup> Eukaryooteilla 5'-cap-rakenne koostuu guaniinukleotidista, joka on kiinnittynyt mRNA:han epätavallisen 5'-5' trifosfaattisidoksen kautta. 5' UTR on yleensä pituudeltaan noin 170 nukleotidin mittainen, 3' sen sijaan 700:n. Poly(A)-häntä koostuu useista adensiini yksiköistä.<sup>7</sup>



Kuva 1: RNA:n rakentavat ribonukleotidit



Kuva 2: mRNA-ketjun yksinkertaistettu rakenne

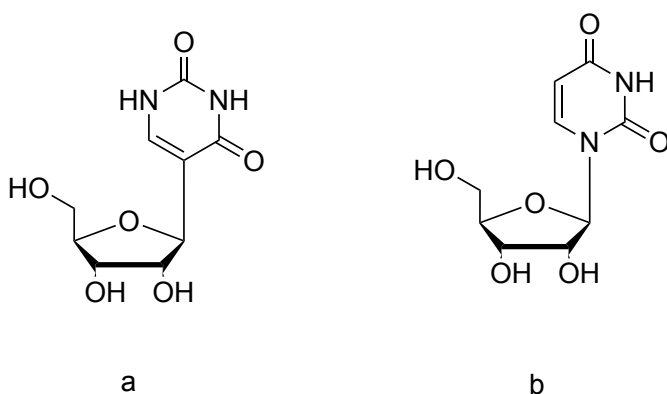
IVT mRNA:ta tuotetaan yleensä soluvapaissa systeemeissä, kuten plasmideissa.<sup>7,8</sup> IVT mRNA:n valmistus soluvapaassa IVT-systeemeissä vaatii lineaarisen templaatti-DNA:n, jonka täytyy sisältää prokaryootin faagipromootori, avoin lukukehys, sekvenssit, jotka vastaavat sääteleviä ei-koodavia alueita (UTR) ja poly(A)-hännän. Jos poly(A)-häntää ei lisätä suoraan DNA-templaattiin, se voidaan lisätä transkription jälkeen entsyymaattisilla reaktioilla rekombinantin poly(A)polymeraasin avulla. Lisäksi mRNA:n 5'-päähen lisätään vielä cap-rakenne, sillä IVT mRNA:n tulee muistuttaa

mahdollisimman paljon luonnollista mRNA:ta. <sup>8</sup> IVT-mRNA:n syntetisointi ei ole nopea prosessi, vaan se sisältää monia välivaiheita sekä kestää useita päiviä. <sup>9</sup>

## 2.1 Modifikaatiot

mRNA sellaisenaan ei sovellu kliiniseen käyttöön sen pysymättömyyden sekä immunogeenisyyden vuoksi. <sup>10</sup> mRNA:n toimivuus riippuu sen funktionaalisista osista, kuten 5'- ja 3'-UTR:istä sekä koodaavasta alueesta, jonka myötä niillä on myös keskeinen vaikutus mRNA-rokotteiden tehokkuuteen. Rokotteen ominaisuuksia ja turvallisuutta voidaan parantaa kemiallisilla modifikaatioilla, joissa RNA:han lisätään modifioituja nukleotideja korvaamalla jokin neljästä perusnukleotidista sitä vastaavalla modifoidulla muodolla. <sup>5,10</sup>

Pseudouridiini ( $\Psi$ ) on luonnossa esiintyvä modifioitu nukleosidi, joka pystyy korvaamaan mRNA:n rakenteessa uridiinin. Se muodostaa samalla tavalla vetysidoksia adenosiinin kanssa kuin uridiini ja vaikuttaa RNA:n stabiilisuuteen, translaatioon ja immunogeenisyyteen. <sup>5,10</sup>  $\Psi$ -modifioidun mRNA:n käyttö plasmidi- ja viraalivektorien sijaan tarjoaa useita hyötyjä: RNA ei pysty liittymään osaksi genomia tai aiheuttamaan tulehduksellista vastetta. Eräässä tutkimuksessa kävi ilmi, että kaikissa testatuissa nisäkäsjärjestelmissä mRNA:illa, joissa on  $\Psi$ -modifiointi, on suurempi translaatiokapasiteetti kuin niillä, joissa ei ole modifikaatiota. <sup>10</sup> Todennäköinen tekijä parantuneessa translaatiossa  $\Psi$ -modifikaatiolla havaittu on mRNA:iden biologisen stabiilisuuden lisääntyminen.  $\Psi$ :n on myös osoitettu stabiloivan RNA:n sekundäärirakennetta. <sup>10</sup>



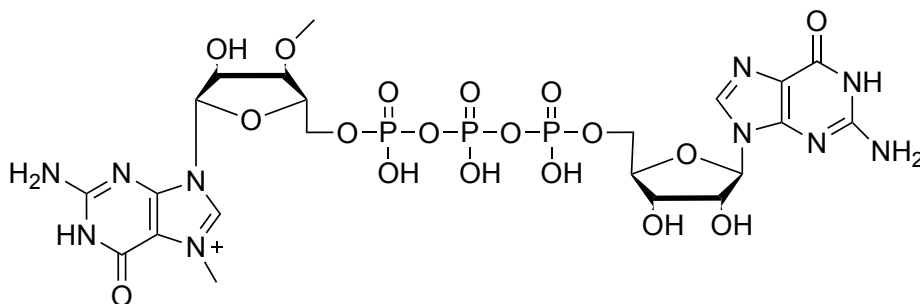
Kuva 3: a) Pseudouridiini b) Uridiini

$\Psi$ :n lisäksi mRNA:n rakennetta voidaan modifioida esimerkiksi fosforotioaattien ja nukleoemästen metylaation avulla. <sup>5,11</sup> Fosforitioaattiryhmä saadaan osaksi mRNA:ta korvaamalla sen fosfodiesterirungon ei-silloittava happi rikillä. Tämän myötä proteiinisynteesi tehostuu jopa 22-kertaisesti. <sup>11</sup> Fosforotioaatteja pystytään käyttämään myös poly(A)-hännän modifioinnissa, joka on

johtanut parempaan stabiilisuuteen sekä translaatiotehokkuuteen.<sup>11</sup> Yleisin mRNA-metylaatio on m<sup>6</sup>A, jolla tarkoitetaan N6-asemassa olevan adenosiinin metylointia.<sup>12</sup> Tämä modifikaatio vaikuttaa mRNA:n translaatioon ja hajoamiseen säätelemällä siihen liittyvien proteiinien toimintaa.<sup>5</sup>

Lähes kaikkiin eukaryoottisten mRNA:iden 5'-päähän lisätään 7-metyyliguanosiinitrifosfaatti (m<sup>7</sup>G) -cap-rakenne transkription aikana. Capin tehtävänä on suojella mRNA:n 5'-päästä 5'-3' eksonukleaaseilta. Sillä on myös tärkeä rooli mRNA:n stabiilisuuden sekä translaation kannalta, sillä se toimii tunnustuskohtana eukaryoottisen translaation aloitustekijä eIF4E:lle.<sup>1</sup> eIF4E:llä on merkittävä rooli syövän hoidossa, sillä cap-rakenteesta riippuvainen translaatio on tärkein tuumorigeneesin, eli kasvaimen muodostumisen, aiheuttaja. Selitys tälle on se, että 5'-terminaalisen mRNA:n cap-rakenteen sitoutuminen eIF4E:hen on cap-riippuvaisen translaation nopeutta rajoittava vaihe. eIF4E:n pitoisuus on myös vaikuttava tekijä translaation säätelyvaiheessa.<sup>13</sup>

Ongelmaksi cap-analogien käytössä on havaittu, että nämä analogit usein liittyvät RNA:han käänteisessä orientaatiossa metyloidun guanosiinin läheisyydessä, mikä heikentää mRNA:n translaatiotehokkuutta.<sup>1</sup> Tämän haasteen ratkaisemiseksi on kehitetty *antireverse* cap -analogeja (ARCA, kuva 4), jotka estävät väärän suuntaisen liitoksen. ARCA stabiloi mRNA:ta ja edistää proteiinisynteesiä sitoutumalla eIF4E:hen.<sup>1</sup>



Kuva 4: ARCA:n rakenne<sup>14</sup>

Cap-rakenteiden isoin ongelma *in vivo* on niiden rakenteesta löytyvät ionisoituvat fosfaattiryhmät, jotka vaikeuttavat mRNA:n kuljetusta ja solun sisäänottoa.<sup>15</sup> Parantaakseen näitä ominaisuuksia, cap-rakenteeseen voidaan kiinnittää TAT-peptidi. TAT-peptidi on yksi lupaavimmista soluun tunkeutuvista peptideistä, (cell penetrating peptide, CPP) ja se saadaan eristettyä HIV-1:stä. CPP:t ovat iso luokka lyhyitä aminohappoketjuja, jotka ovat pisimmälle tutkittuja nukleiinihappojen, proteiinien ja pienien molekyylien kuljettajia. TAT:in lyhyin muoto läpäisee solukalvon tehokkaasti, joka on seurausta sen kationisista ja emäksisistä aminohapoista. Se muodostaa elektrostaattisia vuorovaikutuksia solukalvon pinnalla olevien negatiivisesti varautuneiden glykoproteiinien kanssa, joiden avulla se pääsee tunkeutumaan sisälle soluun.<sup>15</sup>

Näiden modifikaatioiden lisäksi viime vuosikymmenten aikana tutkittu rengasmainen RNA (engl. Circular RNA, circRNA) tarjoaa lupaavan vaihtoehdon RNA-rokotteiden kehitykseen.<sup>16</sup> circRNA:ssa yksijuosteiset RNA:t on syklisoitu päistään sopivaa kemialla käyttämällä. Lineaarisen RNA:n käytössä haasteeksi tulleet pysymättömyys, tehottomuus ja immunogeenisyys pystyttäisiin kiertää circRNA:n avulla. circRNA-rokotteet, jotka sisältävät avoimen lukukehyksen sekä sisäisen ribosomin sisäänpääsykohdan tarjoavat parannetun lähestymistavan turvallisesti, stabiilisti, yksinkertaisella valmistustavalla sekä skaalautuvuudella. Aihe on kuitenkin suhteellisen tuore ja vaatii vielä lisätutkimusta.<sup>16</sup>

### 3 mRNA:n kuljetus kohdesoluun & kuljetusjärjestelmien optimointi

Erilaiset modifikaatiot ovat ehdottomia mRNA:n stabiloimiseksi sekä translaatiotehokkuuden optimoimiseksi. Modifikaatioista huolimatta, mRNA täytyy saada kuljetettua kohdesolun sytoplasmaan ehjänä.<sup>1</sup> mRNA-molekyylillä on negatiivisesti varautunut makromolekyylillä, jonka soluunottoa vaikeuttaa solukalvon elektrostaattinen repulsio sekä mRNA:ta hajottavat RNAasit.<sup>17</sup> mRNA:n kuljetukseen suositetaan ensisijaisesti ei-viraalisia lähestymistapoja viraalisten sijaan, sillä ne ovat halvempia, helpompia tuottaa isommassa skaalassa ja mahdollisesti myös turvallisempia.<sup>1</sup>

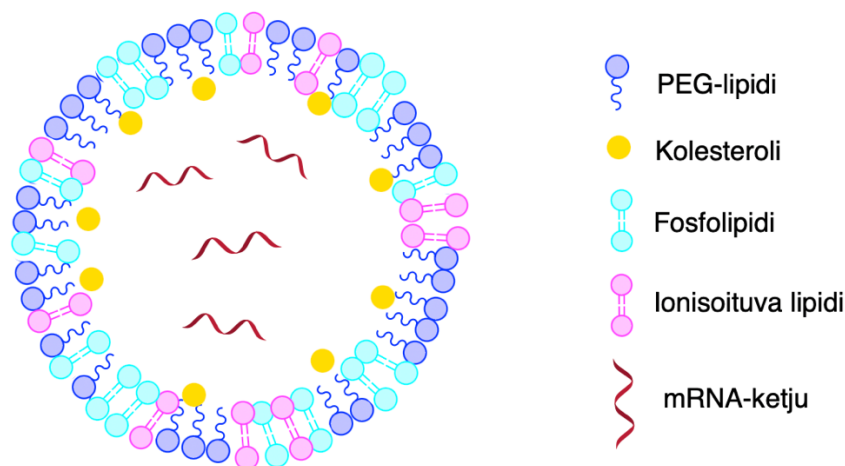
Yksinkertaisimmillaan mRNA saadaan injektointia elimistöön intramuskulaarisesti, ihonalaisesti tai ihonsisäisesti.<sup>18</sup> Ihonalaisesti injektointi aiheuttaa sekä humoraalisen että soluvälitteisen immuunivasteen ja sen kanssa on havaittu tehokasta translaatiota. Sen käyttö ei ole kuitenkaan ongelmattonta mRNA:n lyhyen puoliintumisaikojen ja negatiivisen varauksen takia. Tämän vuoksi on täytynyt kehittää kuljetusmenetelmiä, jotka suojaavat mRNA:ta ja saavat kuljetettua sen solun sisälle.<sup>18</sup>

#### 3.1 Lipidinanopartikkelit & niiden rakenne

Lipidipohjaiset vektorit ovat kaikista yleisin käytetty ei-viraalinen kuljetusmenetelmä.<sup>18</sup> Lipidit ovat amfipaattisia molekyylejä, eli niillä on sekä hydrofobinen että hydrofiilinen osa. Lipidit koostuvat kolmesta domeenista: polaarista päästä, hydrofobisesta hännästä sekä näiden kahden osan yhdistävästä linkkeristä.<sup>19</sup> Tehokkaimmin lipidipohjaisista kuljetusmenetelmistä mRNA-rokotteiden kuljetuksessa toimivat lipidinanopartikkelit (LNP) tai liposomit.<sup>18</sup>

LNP:t ovat pallomaisia molekyylejä, jotka koostuvat tyypillisesti ionisoituvista lipideistä, apulipideistä sekä polyetyleeniglykolista.<sup>3,20</sup> LNP:iden valmistaminen perustuu suurimmilta osin itsejärjestäytymiseen, sillä lipidikomponentit järjestäytyvät spontaanisti intermolekulaaristen

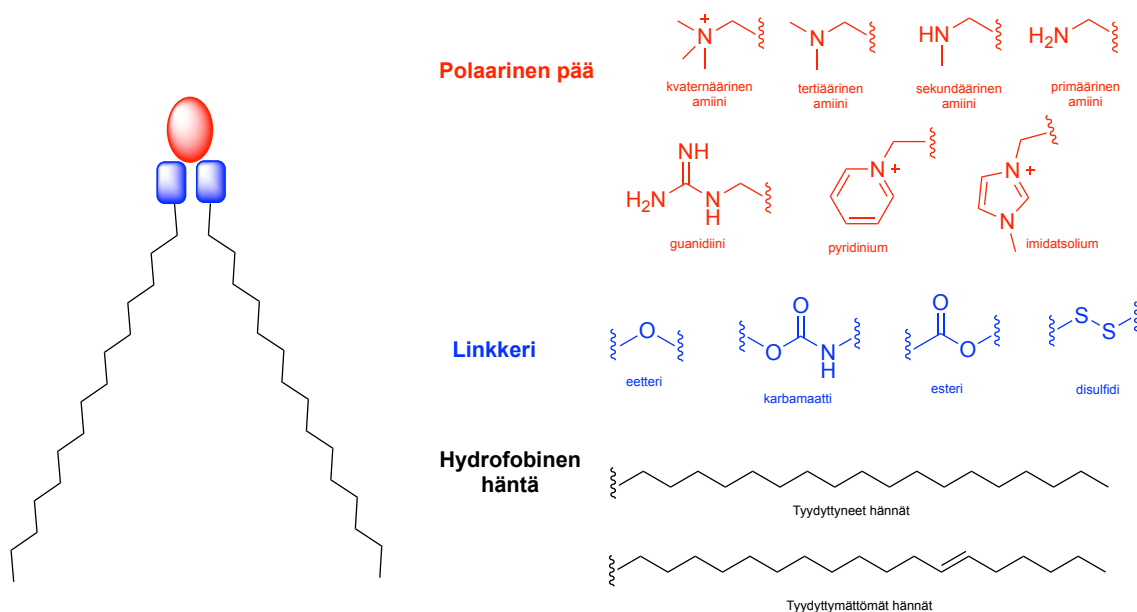
vuorovaikutusten kautta nanorakenteiksi.<sup>17</sup> LNP:iden muodostuminen alkaa elektrostaattisella assosiaatiolla negatiivisesti varautuneen nukleiinihapon sekä positiivisesti varautuneiden lipidien kesken. Tämän jälkeen LNP:t kasvavat van der Waals -vuorovaikutusten avulla. Valmistusprosessi suoritetaan yleensä sekoittamalla voimakkaasti vesipohjaisia komponentteja sekä lipidejä keskenään.<sup>17</sup>



Kuva 5: Lipidinanopartikkelin rakenne.<sup>21</sup> Kuva on muokattu avoimen julkaisun artikkelista jonka on julkaissut American Chemical Society Nano Lettersin puolesta ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC BY-NCND) *Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery*, Yulia Eygeris, Siddharth Patel, Antony Jozic and Gaurav Sahay. Nano Letters 2020, (2020), 4543-4549, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386> Copy-right © 2020 American Chemical Society.

### 3.1.1 Ionisoituvat lipidit & niiden kemialliset ominaisuudet

Ionisoituviissa lipideissä on myös havaittavissa lipideille ominaiset rakenteet: polaarinen pää, linkkeri sekä hydrofobinen häntä.<sup>17</sup> Ionisoituvien lipidien polaarinen pää on yleensä positiivisesti varautunut. Polaarisella päällä on tärkeä tehtävä mRNA:n nappaamisessa partikkelin sisään, LNP:n stabiloinnissa, solukalvon vuorovaikutuksissa sekä endosomaalisen vapauttamisen helpottamisessa.<sup>22</sup> Se on myös tärkeässä roolissa koko lipidin rakenteessa, sillä se määrittää lipidin varauksen sekä polaarisuuden.<sup>22</sup> Nämä ominaisuudet ovat taas suoraan verrannollisia lipidin liukoisuuteen, vuorovaikutuksiin kalvojen kanssa sekä fysiologisiin vaikutuksiin.<sup>22</sup> Tyypillinen pääryhmä koostuu amiineista, guanidiinista ja heterosyklisistä ryhmistä (kuva 6).<sup>17</sup>



Kuva 6: Havainnollistava kuva ionisoituvasta lipidistä & sen komponenteista. Kuva on muokattu lähteestä [13]: Adapted with permission from *Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery*, Yulia Eygeris, Mohit Gupta, Jeonghwan Kim, et al. *Accounts of Chemical Research* 2022, (55), 2-12, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544>. Copy-right © 2022 American Chemical Society.

Linkkerit sijaitsevat yleensä polaarisen pään ja häntäketjujen välissä, mutta joskus jopa keskellä häntäketjua.<sup>22</sup> Ionisoituvat lipidit voivat sisältää yhden tai useamman linkkerin.<sup>17</sup> Linkkeri vaikuttaa ionisoituvien lipidien sytotoksisuuteen, stabiilisuuteen sekä hajoamiseen ja ne voivat olla joko biohajoavia tai -hajoamattomia. Yleensä kuitenkin suositaan biohajoavia linkkereitä niiden nopean *in vivo* -poistumisen takia, joka vähentää mahdollisten sivuvaikutusten ilmentymistä.<sup>17</sup>

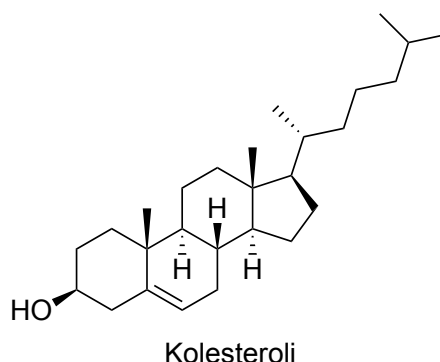
Esterisidos on yksi yleisimmistä linkkereinä käytettävistä biohajoavista ryhmistä, koska se katkeaa helposti esteraaien toimesta.<sup>22</sup> Tämän ansiosta LNP:t poistuvat helposti kehosta, mikä vähentää myrkyllisyyden riskiä ja parantaa turvallisuutta kliinisessä käytössä. Estereitä on myös helppo syntetisoida perinteisillä orgaanisen kemian tekniikoilla, ja se voidaan funktionalisoida ilmentämään haluttuja ominaisuuksia, kuten pH-herkkyyttä tai bioyhteensopivuutta. Esterin sijainnilla on merkitystä sen ilmentämiin ominaisuuksiin, sillä esimerkiksi esterin sijoittaminen keskelle häntäketjua voi mahdollisesti edesauttaa lipidien hajoamista.<sup>22</sup>

Tyypillisessä ionisoituvassa lipidissä on 1–4 hydrofobista häntää, joista jokainen koostuu 8–20 hiiliatomista.<sup>17</sup> Hydrofobisella hännällä on vaikutusta moneen ionisoituvien lipidien ominaisuuteen, kuten  $pK_a$ -arvoon, fuusion edistämiseen sekä lipofiilisyyteen. Nämä ominaisuudet vaikuttavat suoraan LNP:iden muodostumiseen sekä niiden käyttötehoon.<sup>17</sup>

Jokaisella ionisoituvien lipidien rakenteella on siis merkitystä LNP:iden ominaisuuksiin niin sen muodostumisen kuin biologisten ominaisuuksien kannalta. Niiden jokainen rakenneosaa täytyy suunnitella tarkasti, jotta mRNA saadaan suljettua sen sisään sekä kuljetettua turvallisesti sekä tehokkaasti kohdesoluun.<sup>17</sup> Ionisoituvien lipidien kokonaisvaltainen ymmärrys auttaa seuraavan sukupolven ionisoituvien lipidien suunnitteluun, ja tätä myötä parempien lipidinanopartikkelien kehitykseen.<sup>17</sup>

### 3.1.2 Apulipidit ja sterolit

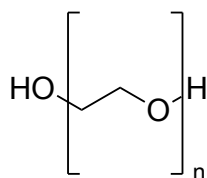
LNP:t tarvitsevat apulipideitä stabiloimaan sen rakennetta, lisäämään yhteensopivuutta veren kanssa ja parantamaan kuljetuksen tehokkuutta.<sup>23</sup> Yksi useimmiten käytetyistä apulipideistä on kolesteroli (kuva 7).<sup>17</sup> Kolesteroli on nelirenkainen, hydrofobinen molekyyli, jota esiintyy eukaryoottien solukalvoissa. Sitä esiintyy sekä vapaana että esteröityneenä muotona.<sup>24</sup> Kolesterolin tehtävä lipidinanopartikkelien rakenteessa on stabiloida rakennetta mukauttamalla membraanin jäykkyyttä ja eheyttä. Kolesterolin molekulaarinen geometria voi vaikuttaa kuljetuksen tehokkuuteen sekä LNP:n biohajoamiseen.<sup>19</sup>



Kuva 7: Kolesterolin rakenne

### 3.1.3 Polyetyleeniglykoli (PEG)

PEG-ankkuroidut lipidit ovat tärkeässä roolissa LNP:issa, sillä ne kontrolloivat nanopartikkelien puoliintumisaikaa sekä solunottoa.<sup>17</sup> LNP:n muodostuessa PEG-ketjut sijoittuvat nanopartikkelien ulkoreunoille, niiden suuren koon ja hydrofiilisyyden takia. PEG:t vaikuttavat LNP:n kokoon, tarjoavat partikkelille suojaavan polymeerisen kerroksen, estävät partikkelien aggregaatiota sekä funktionalisoivat partikkelin pinnan. Funktionalisoitujen PEG-lipidien ansiota nanopartikkelin on mahdollista biokonjugoitua esimerkiksi ligandien tai biomakromolekyylien kanssa.<sup>17,25</sup>



Polyetyleeniglykoli

Kuva 8: PEG:in perusrakenne

PEG:in molekyyli­massa sekä polydispersiteetti ovat tärkeässä asemassa biologisen yhteensopivuuden sekä suojaavan käyttäytymisen kannalta.<sup>25</sup> PEG liukenee myös hyvin orgaanisiin liuottimiin, jonka myötä sitä on helppo modifioida. Myös PEG:in alhainen myrkyllisyys sekä vesiliukoisuus ovat hyviä ominaisuuksia biologisia sovelluksia ajatellen. PEG:in liittäminen LNP:hen parantaa nanopartikkelin vesiliukoisuutta, jonka myötä partikkelin fysikaalinen stabiilius sekä lämpöstabiilius paranevat.<sup>23</sup>

### 3.2 Dendriittisolut mRNA:n kuljetuksessa

Dendriittisolut (dendrite cells, DCs) ovat tehokkaimpia antigeenejä esitteleviä soluja. Ne omaavat pitkulamaisia, hermosolujen tuojahaarakkeita muistuttavia ulokkeita, joiden tehtävänä on osallistua patogeenien fago-, endo- ja pinosytoosiin. Dendriittisolut tarjoavat mielenkiintoisen mahdollisuuden mRNA:n kuljettamiseen rokotteissa. Kun dendriittisolut on kuormattu mRNA:lla, ne kääntävät sen täyspitkiksi proteiineiksi, jotta epitoopit voidaan prosessoida ja esitellä MHC I -molekyyleille.<sup>3</sup>

mRNA:lla kuormattuja dendriittisoluja on käytetty kliinisissä kokeissa, joissa on ollut mukana potilaita immunogeenisilla tai heikosti immunogeenisilla kasvaimilla.<sup>3</sup> Teoriassa kasvaimiin liittyviin epitoopeihin kohdistuvat hoidot sisältävät riskin myrkyllisistä sivuvaikutuksista, mutta mRNA:lla kuormattuja dendriittisoluja sisältävät rokotteet ovat olleet yleisesti turvallisia. Kohdeantigeenit ovat olleet kasvaimiin liittyviä antigeenejä (tumor-associated antigens, TAAs), kuten ihmisen telomeraasikänteiskopioijaentsyymi (hTERT) sekä Wilmsin kasvain (WT), joita on havaittu niin kiinteissä syöpäkasvaimissa kuin hematologisissa syövissä.<sup>3</sup>

Tähän mennessä transfektoituja, eli mRNA:lla kuormattuja dendriittisoluja sisältävät mRNA-rokotteet ovat ainoita mRNA-pohjaisia soluterapiarokotteita, jotka ovat päässeet faasi III asti.<sup>26</sup> Yleisesti kliiniset kokeet, joissa on käytetty mRNA:lla transfektoituja dendriittisoluja, ovat osoittaneet kasvainspesifisten immuunivasteiden syntyä, vaikka kliininen aktiivisuus ei ole ollut rohkaisevaa. Kuitenkin nykyinen tapa, jolla dendriittisoluja tuotetaan, on hankala ja kallis, jonka vuoksi tutkimukset keskittyvät toistaiseksi muihin kuljetusmenetelmiin.<sup>26</sup>

## 4 RNA-rokotteiden sovellukset syöpäindikaatioissa

mRNA-pohjaiset rokkeet tarjoavat täysin uudenlaisen lähestymistavan syöpärokotteiden kehittämiseen. SARS-CoV-2-mRNA-rokotteen kaupallistaminen johti suureen kiinnostukseen kohdistaa kyseistä teknologiaa muihinkin sairauksiin.<sup>3</sup> Lisääntynyt tutkimus sekä kliiniset sovellukset ovat osoittaneet, että mRNA-rokotteilla on lukuisia etuja muihin rokotteisiin nähden. mRNA-rokotteet ovat turvallisia, eivät ne ole infektoivia kuten DNA- tai viruspohjaiset rokkeet.<sup>5</sup>

Syöpärokotteiden tarkoituksena on parantaa kasvainspesifistä immuniteettia vaikuttamalla keskeisiin kohdeproteiineihin, kuten kasvainperäisiin antigeeneihin ja syövän neoantigeeneihin.<sup>5</sup> Verrattuna perinteisiin rokotusmenetelmiin, mRNA-rokotteiden avulla voidaan tarjota personalisoitua hoitoa. Jokainen potilas translatoi rokotteen mukana tulleen mRNA:n proteiineiksi, jotka prosessoidaan ja esitellään jokaiselle yksilöllisellä tavalla.<sup>3</sup>

### 4.1 Kasvainperäisiin antigeeneihin pohjautuvat rokkeet

TAA:t ovat antigeeniluokka, joka esiintyy huomattavasti isommissa määrin kasvaimissa kuin normaalissa kudoksessa.<sup>2</sup> Tämä tekee niistä oivan kohteen syöpärokotteille. Esimerkiksi kemoterapiaan ja radioterapiaan verrattuna TAA:ihin perustuvat rokkeet tarjoaisivat tehokkaamman ja vähemmän sivuvaikutuksia aiheuttavan hoitomuodon syöpää vastaan.<sup>2</sup>

TAA:ihin kohdistuvia mRNA-rokotteita on tutkittu gliooman hoidossa.<sup>27</sup> Glioomat ovat aivojen tukikudosten kasvaimia, jotka ovat yleensä pahanlaatuisia. Glioomat ovat usein oireettomia, ja ne saadaan diagnosoitua 80 %:ssa tapauksissa vasta kun ne ovat edenneessä vaiheessa, eikä niitä voida enää poistaa kirurgisesti. Muut hoitomenetelmät, kuten kemoterapia, eivät yleensä tuota hoitovastetta glioomiin.<sup>27</sup> On kuitenkin huomattu, että syöpärokotteet ovat vähentäneet merkittävästi glioblastoomien kehittymistä, joka on luonut pohjan mRNA-pohjaisen rokotteen kehitykselle. Uusia gliooman liittyviä antigeenejä on etsitty, ja tutkimuksissa on törmätty neljään potentiaaliseen antigeeniin mRNA-rokotteiden kehityksen kannalta.<sup>27</sup>

TAA:ihin kohdistuvat mRNA-rokkeet eivät ole kuitenkaan ongelmattomia.<sup>2</sup> TAA:t eivät välttämättä tuota halutun suuruista T-soluvastetta ja immunotoleranssia kliinisessä immunoterapiassa. Lisäksi joidenkin TAA:iden ilmentyminen normaaleissa soluissa saattaa aiheuttaa sivuvaikutuksia.<sup>2</sup>

## 4.2 Kasvainspesifisiin antigeeneihin pohjautuvat rokotteet

Kasvainspesifiset antigeenit (Tumor-specific antigens, TSAs) ovat proteiineja tai peptidifragmentteja, jotka ovat joko pelkästään kasvainsolujen tuottamia tai vaihtoehtoisesti erittäin ylituotettuja kasvainsolujen toimesta normaaleihin soluihin verrattuna.<sup>2</sup> Tällaiset antigeenit syntyvät syöpägeenisistä prosesseista, kuten mutaatioista ja translaation jälkeisistä modifikaatioista.<sup>2</sup>

Neoantigeenit ovat kasvainspesifisiä antigeenejä, jotka esiintyvät syöpäsolujen pinnalla.<sup>2</sup> Neoantigeenit ovat ideaaleja kohteita immunoterapeuttisille hoitomuodoille, sillä niitä ei esiinny ollenkaan normaaleissa kudoksissa. Ne ovat kasvainkohtaisia, jonka myötä ne pystyvät kiertämään toleranssi- ja autoimmuuniteettiongelmat, jotka usein liittyvät jaettujen kasvaintigeenien kohdistamiseen.<sup>2</sup>

Neoantigeeneillä on kaksi alaryhmää: jaetut sekä yksilölliset neoantigeenit. Jaetut neoantigeenit ovat tiettyjen kasvaintyyppien tai potilaiden keskuudessa yleisiä mutaatiopohjaisia antigeenejä, joita ei löydy kuitenkaan normaalista genomista.<sup>28</sup> Kyseisiä jaettuja antigeenejä on tunnistettu, ja tätä voitaisiin käyttää hyödyksi rokotteen kehittämisessä. Potilaat, jotka sairastavat samaa syöpätyyppiä kuin ne potilaat, joilta löytyy näitä yleisesti ilmeneviä antigeenejä, voitaisiin rokottaa kyseistä syöpää vastaan. Yksilölliset neoantigeenit ovat taas spesifisiä kullekin ihmiselle ja kasvaimelle. Saman syövän kasvaimet voivat olla hyvinkin erilaisia keskenään, puhtaasti personalisoitu lähestymistapa rokotteisissa olisi paras metodi. Näin varmistetaan vaste jokaiseen yksittäiseenkin syöpään.<sup>28</sup>

Neoantigeenipohjaisten mRNA-rokotteen potentiaalia tukee niiden kyky tuottaa spesifinen ja vahva immuunivaste. Varhaisen vaiheen kliiniset kokeet ovat antaneet näyttöä rokotteen tuottamista T-solujen vasteesta sekä kliinisistä eduista, kuten syövän uusiutumisen riskin väheneminen.<sup>2</sup>

## 4.3 mRNA-rokotteen kohdesyövät

**Munuaissolusyöpä** (Renal cell carcinoma, RCC) on yksi yleisimmistä syövästä maailmassa.<sup>5</sup> RCC luokitellaan immunogeeniseksi kasvaimeksi, jonka myötä sitä voitaisiin hoitaa immunoterapeuttisesti tällä hetkellä suositun leikkaushoidon sijasta. Onkin todettu, että RNA:lla transfektoidut dendriittisolut ovat turvallinen, *in vivo* kasvainspesifisiä polyklonaalisia T-soluja aktivoiva sekä täysin toteutettavissa oleva hoitomuoto RCC:hen. On myös todettu mRNA-rokotteen, joka koostui kuutta eri TAA:ta koodavista RNA:ista, lisäävään T-solvastetta useita TAA epitoppeja vastaan. Tämä on myötävaikuttanut kokonaiseloonjäämisen pidentymiseen potilailla, joilla on metastaattinen, eli etäpesäkkeitä aiheuttanut RCC.<sup>5</sup>

**Aivokasvaimilla** tarkoitetaan kasvaimia, jotka kasvavat kallonsisäisesti, ja ne ovat yksi yleisimmistä syistä kuolemaan johtavissa syöpätapauksissa.<sup>5</sup> Tällä hetkellä aivokasvaimia hoidetaan tyypillisesti joko leikkaamalla tai sädehoidolla. Aivojen monimutkaisen rakenteen sekä mahdollisten etäpesäkkeiden takia, leikkaushoidolla ei saada välttämättä haluttua lopputulosta. Tämän seurauksena kasvaimia on yritetty hoitaa immunoterapialla, ja kuten aiemmin mainittu lupaavia tuloksia on havaittu.

**Melanooma** aggressiivinen kasvain, joka syntyy iholla melaniinia tuottavissa pigmenttisoluissa eli melanosyyteissa.<sup>5</sup> Melanoomakasvaimet ovat alttiita muodostamaan etäpesäkkeitä, tehden melanoomasta erittäin hengenvaarallisen syöpätyypin. Melanoomaa hoidetaan myös yleisimmin leikkaushoidolla sekä kemoterapialla. Immunoterapiset hoitomuodot ovat myös yleisesti käytettyjä melanooman hoidossa, sillä melanooman pinnalla esiintyy kolmenlaisia proteiineja, jotka voidaan esitellä MHC I -molekyylin pinnalla immuunipuolustukselle. Myös kaupallista FixVac-rokotetta on tutkittu FIRST-IN-HUMAN kliinisessä tutkimuksessa pitkälle edenneillä melanoomapotilailla. Kyseistä rokotetta voidaan injektoida suonensisäisesti neljää mutatoimatonta TAA:ta vastaan. Rokote on ollut turvallinen ja osoittanut alustavasti antikasvainvastetta joko yksinään tai yhdistettynä immuuni-inhibiittorin kanssa.<sup>5</sup>

Länsimaissa yleisin miehillä esiintyvä pahanlaatuinen sairaus on **eturauhassyöpä**.<sup>5</sup> Cancer Statisticsin artikkelin (2022) mukaan eturauhassyöpä on yleisin diagnosoitu syöpä sekä toiseksi yleisin kuolemantapauksia aiheuttavissa syöpätapauksissa. Eturauhasen poiston lisäksi eturauhassyövän hoitoon käytetään myös esimerkiksi kemoterapiaa ja sädehoitoa. Eturauhassyöpää on mahdollista hoitaa myös immunoterapialla, ja esimerkiksi kaksi rokotetta, CV9103 sekä CV9104 ovat tällä hetkellä saatavilla eturauhassyöpöpotilaille.<sup>5</sup> Näissä rokotteissa on käytetty hyväksi RNaActive<sup>®</sup> -teknologiaa, joka on CureVacin kehittämä teknologia-alusta, joka parantaa mRNA-molekyylien pysyvyyttä, proteiinintuotantoa ja immuunivastetta.<sup>5,29</sup> RNaActive<sup>®</sup>:n käyttö perustuu protamiiniin, joka on luonnossa esiintyvät kationinen peptidiseos.<sup>30</sup> Protamiini sitoutuu voimakkaasti negatiivisesti varautuneisiin molekyyliin, kuten RNA:han, ja suojaa RNA:ta entsyymaattiselta hajoamiselta sekä edistää sen kulkeutumista soluihin.<sup>30</sup> RNA CV9103 ja CV9104 -rokotteiden on todettu olevan erittäin spesifisiä, turvallisia ja tehokkaita eturauhassyövän hoitoon.<sup>5</sup>

**Keuhkosyöpä**, joka on yleisin kuolemaan johtava syöpä koko maailmassa, voidaan jakaa kahteen histologiseen alatyypin: pienisoluisen keuhkosyöpään (small cell lung cancer, SCLC) ja ei-pienisoluisen keuhkosyöpään (not-small cell lung cancer, NSCLC).<sup>5</sup> RNA-rokotteita NSCLC:n hoitoon on päässyt jo klinisiin kokeisiin asti, näistä esimerkkinä RNaActive<sup>®</sup> -teknologiaan perustuva CV9201-rokote. Kyseinen rokote koodaa viittä NSCLC-antigeeniä ja sen todettiin olevan hyvin siedetty sekä tuottavan havaittavan immuunivasteen.<sup>5</sup>

## 5 Yhteenveto

RNA-rokotteet ovat viime vuosina nousseet merkittäväksi tutkimuskohteeksi syövän hoidossa, sillä ne tarjoavat mahdollisuuden yksilöllisesti räätälöityihin ja tehokkaisiin immunoterapeuttisiin hoitoihin. mRNA-rokotteet perustuvat *in vitro* -syntetisoituun RNA:han, joka ohjaa solujen proteiinintuotantoa ja aktivoi immuunijärjestelmää. Soluihin toimitettu RNA-molekyyli ohjaa haluttujen antigeenien tuotantoa, mikä aktivoi immuunijärjestelmää hyökkäämään syöpäsoluja vastaan. Tämä lähestymistapa mahdollistaa spesifisten syöpäantigeenien tunnistamisen ja eliminoimisen ilman riskiä integroitumisesta osaksi genomia.

Teknologian kehitys ja uuden tutkimuksen tekeminen, erityisesti COVID-19-pandemian vauhdittamana, ovat edistäneet RNA-rokotteiden soveltamista myös syövän hoidossa. RNA-rokotteiden tuotanto on nopeaa ja joustavaa, sillä niiden saanto IVT:n avulla on runsasta. Rokotteita voidaan räätälöidä eri syöpätyyppeihin sopiviksi ja niiden turvallisuusprofiili on erinomainen. Lisäksi mRNA-rokotteiden tehokkuutta voidaan säädellä erilaisilla kemiallisilla modifikaatioilla, jotka lisäävät niiden stabiiliutta ja translaatiotehokkuutta solussa.

mRNA-rokotteiden kehittäminen ei ole kuitenkaan mutkatonta. mRNA:n negatiivinen varaus, luonnollinen epävakaus ja immuunijärjestelmän mahdollinen reaktio vieraaseen mRNA:han tuottavat ongelmia. Näitä ongelmia on pyritty ratkaisemaan erilaisilla modifikaatioilla sekä kuljetusmenetelmillä. Kuljetusmenetelmistä keskeisimmiksi vaihtoehtoiksi ovat nousseet lipidinanopartikkelit ja dendriittisolut, jotka suojaavat mRNA:ta hajotukselta sekä kuljettavat sen tehokkaasti ja spesifisesti kohdesoluun.

mRNA-rokotteita on tutkittu laajalti useiden syöpätyyppien, kuten aivokasvainten, melanooman, keuhkosityöpien sekä munuaissyövän, hoidossa. Esimerkiksi munuaissyövän hoidossa mRNA-rokotteet ovat osoittaneet kykyä aktivoida kasvainspesifistä immuunivastetta sekä pidentää potilaiden elinikää. Gliomien eli aivokasvainten kohdalla mRNA-rokotteet ovat tarjonneet uudenlaisen lähestymistavan erityisesti silloin, kun leikkaushoito tai kemoterapia eivät ole olleet riittäviä.

Vaikka RNA-rokotteet ovat tuottaneet lupaavia tuloksia eri syöpätyyppien hoidossa, niiden laajamittainen käyttöönotto vaatii edelleen lisätutkimusta ja kehitystyötä. Haasteina ovat edelleen immuunivasteen optimointi, tehokkaampien kuljetusmenetelmien kehittäminen sekä pitkäaikaisvaikutusten arviointi. Tulevaisuudessa RNA-rokotteet voisivat tarjota uuden, yksilöllisen ja tehokkaan vaihtoehdon syövän hoitoon, joko yksinään tai yhdistettynä muiden immunoterapioiden kanssa.

## 6 Viitteet

1. McNamara, M. A., Nair, S. K. & Holl, E. K. RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy. *Journal of Immunology Research* vol. 2015 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2015/794528> (2015).
2. Yao, R., Xie, C. & Xia, X. Recent progress in mRNA cancer vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2307187> (2024).
3. Sayour, E. J., Boczkowski, D., Mitchell, D. A. & Nair, S. K. Cancer mRNA vaccines: clinical advances and future opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41571-024-00902-1> (2024).
4. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243> (2018).
5. Mei, Y. & Wang, X. RNA modification in mRNA cancer vaccines. *Clinical and Experimental Medicine* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01020-5> (2023).
6. Tharun, S. & Parker, R. Turnover of mRNA In Eukaryotic Cells. *RNA* doi:10.1016/B978-008043408-7/50035-6. (2001)
7. Niazi, S. K. & Magoola, M. mRNA and Synthesis-Based Therapeutic Proteins: A Non-Recombinant Affordable Option. *Biologics* 3, 355–379 (2023).
8. Gómez-Aguado, I. *et al.* Nanomedicines to deliver mRNA: State of the art and future perspectives. *Nanomaterials* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano10020364> (2020).
9. McKenzie, R. E., Minnell, J. J., Ganley, M., Painter, G. F. & Draper, S. L. mRNA Synthesis and Encapsulation in Ionizable Lipid Nanoparticles. *Current Protocols* 3, (2023).
10. Karikó, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular Therapy* 16, (2008).
11. Liu, A. & Wang, X. The Pivotal Role of Chemical Modifications in mRNA Therapeutics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.901510> (2022).

12. Lan, Q. *et al.* The critical role of RNA M6A methylation in cancer. *Cancer Research* vol. 79 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2965> (2019).
13. Shanmugasundaram, M., Senthilvelan, A. & Kore, A. R. Recent Advances in Modified Cap Analogs: Synthesis, Biochemical Properties, and mRNA Based Vaccines. *Chemical Record* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1002/tcr.202200005> (2022).
14. Grudzien-Nogalska, E. *et al.* Synthesis of Anti-Reverse Cap Analogs (ARCAs) and their Applications in mRNA Translation and Stability. *Methods in Enzymology* vol. 431 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)31011-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)31011-2) (2007).
15. Piecyk, K. *et al.* Effect of HIV-1 TAT Peptide Fusion on 5 mRNA Cap Analogs Cell Membrane Permeability and Translation Inhibition. *Bioconjugate Chemistry* 31, (2020).
16. Niu, D., Wu, Y. & Lian, J. Circular RNA vaccine in disease prevention and treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01561-x> (2023).
17. Eygeris, Y., Gupta, M., Kim, J. & Sahay, G. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Accounts of Chemical Research* 55, (2022).
18. Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C. & Thakur, A. Opportunities and challenges in the delivery of mrna-based vaccines. *Pharmaceutics* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102> (2020).
19. Hou, X., Zaks, T., Langer, R. & Dong, Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0> (2021).
20. Let's talk about lipid nanoparticles. *Nature Reviews Materials* vol. 6 99 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00281-4> (2021).
21. Eygeris, Y., Patel, S., Jozic, A., Sahay, G. & Sahay, G. Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. *Nano Letters* 20, (2020).
22. Xu, Y., Golubovic, A., Xu, S., Pan, A. & Li, B. Rational design and combinatorial chemistry of ionizable lipids for RNA delivery. *Journal of Materials Chemistry B* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d3tb00649b> (2023).

23. Cheng, X. & Lee, R. J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 99 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022> (2016).
24. Dinh, T. & Thompson, L. Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination. in *Encyclopedia of Food and Health* 60–69 doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00150-1. (Elsevier Inc., 2015).
25. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. & Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 49 Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.200902672> (2010).
26. Nair, S. K. *et al.* Ex vivo generation of dendritic cells from cryopreserved, post-induction chemotherapy, mobilized leukapheresis from pediatric patients with medulloblastoma. *Journal of Neuro-Oncology* 125, (2015).
27. Ma, S. *et al.* Recognition of Tumor-Associated Antigens and Immune Subtypes in Glioma for mRNA Vaccine Development. *Frontiers in Immunology* 12, (2021).
28. Aldous, A. R. & Dong, J. Z. Personalized neoantigen vaccines: A new approach to cancer immunotherapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 26, (2018).
29. Rausch, S., Schwentner, C., Stenzl, A. & Bedke, J. mRNA vaccine CV9103 and CV9104 for the treatment of prostate cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 10, (2014).
30. Jarzebska, N. T., Mellett, M., Frei, J., Kündig, T. M. & Pascolo, S. Protamine-based strategies for RNA transfection. *Pharmaceutics* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060877> (2021).