

Tanulmányok

NUKLEOZID-MÓDOSÍTOTT MRNS: HOGYAN TOVÁBB?

NUCLEOSIDE-MODIFIED MRNA: WHAT NEXT?

Duda Ernő

az MTA doktora

Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Orvosi Biológiai Intézet, Szeged
dudaerno@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

Amikor Karikó Katalin és Drew Weissman az első cikket közölte arról, hogy az uracilbázisok módosítása a terápiás célra használt mRNS-ben elegendő ahhoz, hogy elejét vegyük a kísérleti állatokban kialakuló gyulladással immunválasznak, ráadásul nagyságrendekkel fokozza az mRNS-ről termelődő fehérje mennyiségét, még a tudományos közvélemény is kevés figyelmet szentelt neki. Derrick Rossi volt egyike azoknak a keveseknek, akik felismerték, hogy a rövid ideig, sok fehérje termelését kiváltó, majd nyomtalanul eltűnő mRNS ideális eszköz az indukált pluripotens őssejtek előállítására. A koronavírus-világjárványban az mRNS-alapú védőoltások elsőpró sikere tette aztán a felfedezést világszerte ismertté. Ez az írás – részben Weissman Nobel-előadása alapján – azt szeretné bemutatni, hogy a kórokozók és daganatos betegségek elleni vakcinák fejlesztésén kívül milyen sokirányú felhasználási lehetőségek állnak még a módosított mRNS-ek előtt. Néhány enzimhiányra visszavezethető örökletes betegség gyógyítására már folynak a kísérletek, de a rosszindulatú betegségek kezelését forradalmasító immunterápiás eljárásokban is bizonyíthatják hasznosságukat: termelje meg a beteg az öt gyógyító ellenanyagokat! Egyre nagyobb gyakorisággal jelennek meg olyan cikkek, amelyek új, szellemes megoldásokkal gazdagítják a módosított mRNS-ek terápiás alkalmazásait.

ABSTRACT

When Katalin Karikó and Drew Weissman published the first paper showing that the modification of uracil bases in therapeutic mRNA was sufficient to prevent an inflammatory immune response in experimental animals, and that it also increased the amount of protein produced from mRNA by orders of magnitude, it received little attention even from the scientific community. Derrick Rossi was one of the few people who recognized that mRNA, which briefly triggers the production of large amounts of protein and then disappears without a trace, was an ideal tool for the production of induced pluripotent stem cells. The overwhelming success of mRNA-based vaccines in the coronavirus pandemic brought the discovery to global attention. This paper, based in part on Weissman's Nobel Lecture, aims to highlight the many applications

of engineered mRNAs beyond the development of vaccines against malignant diseases and different pathogenic agents. Experiments are already underway to cure some hereditary diseases caused by enzyme deficiencies, but they could also prove useful in immunotherapies that could revolutionize the treatment of malignant diseases, allowing patients to produce the antibodies that will cure them. New and ingenious solutions for the therapeutic use of modified mRNAs are being published in an increasing number of articles.

Kulcsszavak: mRNS, védőoltás, iPSC (indukált pluripotens őssejt), örökletes enzimhiánybetegségek, rák immunterápia

Keywords: mRNA, vaccine, iPSC (induced pluripotent stem cells), inheritable enzyme deficiencies, cancer immunotherapy

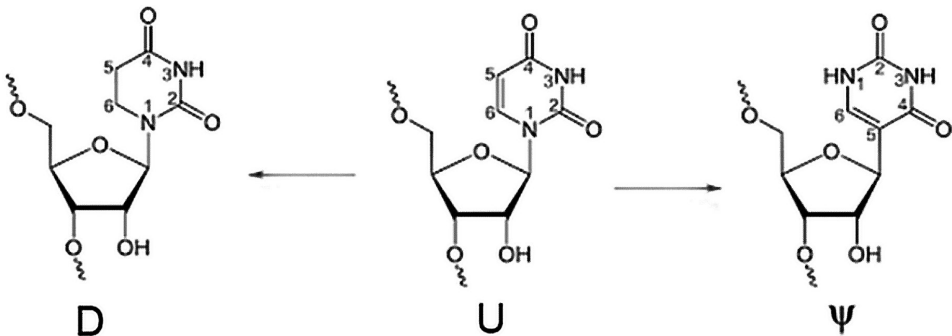
Mielőtt Karikó Katalin és Drew Weissman felfedezte, hogy az uridin helyett pszeudouridint tartalmazó mRNS (messenger RNA, hírvivő ribonukleinsav) élő állatokban nem okoz gyulladást, hanem jelentős mennyiségű fehérje termelődését váltja ki (Karikó et al., 2005), a tudományos közvélemény már teljesen szkeptikus volt az mRNS felhasználhatóságát illetően. Phillip A. Sharp (aki az intronok felfedezéséért Richard J. Robertsszel Nobel-díjat kapott) egyszer kifejtette, hogy az mRNS terápiás alkalmazásra alkalmatlan. Ez a vélekedés annyira elfogadottá vált, hogy amikor Karikóék az eredményeikről szóló cikket próbálták közölni, sem a *Nature*, sem a *Science* nem tartotta a cikket közlésre alkalmasnak.

A koronavírus-járvány berobbanása és az mRNS-vakcinák sikere nélkül valószínűleg ma is csak néhány kutatónak csengene ismerősen Karikó és Weissman neve. Pedig előbbinek soha nem volt a prioritásai között védőoltások kifejlesztése. Vagy húsz éven keresztül Karikó célja az volt, hogy az örökletes enzimhiányos betegségekre találjon gyógymódot. Számos olyan betegséget ismerünk (ilyenek a lizoszomális tárolási betegségek, például mukopoliszaharidózisok, mukolipidózisok, oligoszaharidózisok, mint a Gaucher-, Fabry-, Hurler-, Sanfilippo-, Hunter-, Tay–Sachs-, Niemann–Pick-, Pompe-betegségek stb.), amelyek kiváltó oka az, hogy egyes gének hibás vagy hiányzó kópiái, alléljai miatt nem termelődik egy életfontosságú enzim, vagy nem termelődik belőle elegendő. Ha a gén hibája miatt nem termelődik mRNS, mesterséges mRNS-t kellene bejuttatni a sejtekbe, a sejt el tudná készíteni a megfelelő fehérjét, és az ki tudná fejteni hatását. Csak ez az elmélet nem volt megvalósítható: számos kísérletben az mRNS *in vitro* nagyon szépen működött, de ha nem tenyésztett sejtekbe, hanem állatokba juttatták be, erős gyulladást generált, miközben alig termelődött nyomnyi fehérje.

Egy sok évtizeddel korábbi közlemény (Isaacs–Lindemann, 1957) arról számolt be, hogy a virális nukleinsavak interferontermelést váltanak ki. Az interferonok fertőzés esetén az immunrendszert mobilizáló kis fehérjék – amelyek egyebek mellett gyulladást is kiváltanak. Karikó úgy vélte, hogy – az időközben

felfedezett – mintázatfelismerő receptoroknak (review: Janeway, 2013) lehet szerepük az mRNS által kiváltott gyulladásban is. A mintázatfelismerő receptorokkal az immunrendszer olyan molekuláris mintázatokat érzékel, amelyek különféle kórokozó organizmusokra jellemzőek. Ilyen a Gram-negatív baktériumok lipopoliszaharidja, a bakteriális DNS (deoxyribonucleic acid, dezoxiribonukleinsav), a szaporodó vírus kétszálú RNS-e (ribonucleic acid, ribonukleinsav), a leprát, gümőkórt okozó mikobaktériumok lipopeptidjei, a rovarok, gombák kitinje vagy az egyszéjtű gombák sejtfalának mannoproteinjei.

Karikó kísérletei során kiderült, hogy minden mesterséges RNS, poliribonukleotid vagy természetes RNS-féleség *valamennyire* aktiválja az immunrendszert – az egyetlen kivétel az aminosavakat szállító transzferRNS (tRNS) volt. Az a tRNS, amely érése után olyan rendhagyó nukleotidokat is tartalmaz, mint a dihidrouridin vagy a pszeudouridin (1. ábra). Ez adta az ötletet, hogy olyan mRNS-t kellene szintetizálni, amelyben ilyen bázisok helyettesítik az uridint. Az ötlet bevált, a bázismódosított mRNS nem keltett gyulladást, viszont rengeteg fehérje termelését tette lehetővé!



1. ábra. Dihidrouridin, uridin és pszeudouridin

Forrás: a szerző szerkesztése

Weissman volt az, aki védőoltást szeretett volna kifejleszteni, és nem is akármilyen kórokozó, egyenesen a HIV (humán immundeficiencia-vírus) elleni vakcina volt a célja, ez hozta össze Karikóval (aki akkor azt tódította, hogy mRNS-sel bármit meg lehet csinálni). De a koronavírus elleni vakcinát Karikó (aki időközben elvesztette állását a Pennsylvanai Egyetemen) már a BioNTech cég két vezetőjével, Uğur Şahinnal és Özlem Türecivel alkotta meg. A módosított mRNS-alapú oltások olyan hatásos immunválaszt alakítottak ki, amilyenre korábban nem volt példa.

Egy védőoltást akkor minősítenek alkalmasnak, ha a beoltottak között 50% felett van a védettek aránya. A szezonális influenzaoltások hatásfoka például ritkán haladja meg a 70%-ot, és az is jól ismert, hogy a kor előrehaladtával a vakcinák egyre kevésbé tudnak hatásos immunválaszt kiváltani, idősök között a védettség

akár 10–20%-ra is lecsökkenhet. Mindkét szempontból bajnok volt az új technológia: korábban sohasem látott mértékben, a beoltottak 98%-ában alakult ki védettség, és ez az érték még a 70–80 év felettek között is magasnak bizonyult.

Világszerte megindult a kutatás, hogy a legkülönbözőbb kórokozók ellen módosított mRNS-alapú védőoltásokat fejlesszenek ki. A Szegedről elszármazott Pardi Norbert a Pennsylvaniai Egyetemen olyan vakcinák fejlesztésében vett/vesz részt, mint a Zika-vírus, a Lyme-kór, a *krími-kongói vérzések láz vírusa*, egy herpesz-vírus és a SARS-CoV-2 elleni vakcinák (Pardi et al., 2017). Most éppen nagy reményeket fűznek egy olyan védőoltás megalkotásához, amely sokféle, talán valamennyi influenzavírus fertőzése ellen védelmet jelentene. Ugyan nagyon sokféle influenzavírus van, de ezek számos antigénje átfedő. Ezek között vannak olyanok is, amelyek nem nagyon változhatnak meg, mert akkor a vírus elvesztené fertőzőképességét. A különböző influenzatörzsek erősen konzervált peptidjeit kódoló mRNS-szakaszokat kombinálják egyetlen mRNS-sé, ezt lehet majd – reményeik szerint – vakcinaként használni. Ez védettséget tudna kialakítani valamennyi ismert influenzavírus ellen, nem lenne szükség az évenkénti szezonális oltásokra.

A BioNTech eredeti küldetése rosszindulatú betegségek terápiája volt, rákos betegségek ellen kifejlesztett védőoltások fejlesztése. Ezen a téren dolgoznak ma is, vannak is biztató eredményeik, elsősorban azokkal a vakcinákkal, amelyek a tumorszövetben immunstimuláló citokin fehérjék termelődését váltják ki. Számos daganat esetében az immunrendszer nem aktiválódik kellőképpen, toleranciát mutat a tumorsejtekkel szemben. Ennek lehet oka a tumor antigének alacsony koncentrációja, vagy a citotoxikus T-sejtek aktiválódásának gátlása. A citokinek, ezek a kis moltömegű fehérjék (interleukin-12, interferon alfa, granulocita-monocita kolóniasztimuláló faktor, IL-15 sushi stb.) odavonzzák és/vagy aktiválják a tumorba behatoló immunsejteket (citotoxikus limfocitákat, természetes ölüssejteket, M1-makrofágokat stb.), és ez az a hatás, amely sok esetben a kóros folyamat fékezéséhez, megállításához vezet.

De az mRNS bizonyította, hogy más célokra is felhasználható. A regeneratív (helyreállító) medicina, a károsodott sejtek, szövetek, szervek pótlására irányuló tudományág nagy ígérete volt az embrionális őssejtek (ESC) felhasználása. Ezeknek a sejteknek az a különlegessége, hogy – megfelelő körülmények között – in vitro is átalakíthatók minden olyan sejtípusá, amely a felnőtt szervezetben előfordul. De az embrionális őssejtek felhasználásának számos módszertani, és főleg etikai akadály van.

Ekkor jött a nagy áttörés: Jamanaka Sinja (Sinya Jamanaka) és munkatársai (Takahashi et al., 2007, Nobel-díj 2012) bizonyították, hogy szinte bármilyen testi sejtet át lehet alakítani őssejtté (ún. indukált pluripotens őssejtté, iPSC-vé), ha el tudjuk érni, hogy négy, génaktivitást szabályozó fehérje, transzkripciós faktor egy ideig működésbe lépjen. A fehérjék bejuttatása nehézkes, ha viszont az őket kódoló géneket juttatjuk be, azok ott maradnak, pedig nem lenne rájuk szükség a további-

akban. Különbéféle trükkökkel lehet csak elérni, hogy a fehérjék rövid ideig, de csak rövid ideig termelődjenek a sejtekben. Derrick Rossi, egy kitűnő kanadai őssejtkutató volt az első, aki Karikóék 2005. évi cikkére felfigyelt. Felismerte, hogy a módosított mRNS az ideális eszköz: bejut a sejtbe, kiváltja a fehérjék termelődését, de rövidesen elbomlik: kiváltja a sejtek összejté alakulását, de semmilyen hosszabb távú hatása nincs (Warren et al., 2010). Rossi volt a Moderna (*Modified RNA*) cég kitalálója, akit aztán a cég megtollasodása után a pénzt begyűjtő alapítók lapátra tettek.

Természetesen Karikó eredeti célját is több kutatócsoport próbálja megvalósítani, az enzimhiányos betegségben szenvedők gyógyítását a megfelelő mRNS-ek bejuttatásával. A vakcinákból jól ismert lipid nanorészecskék, amelyek kifejlesztésében óriási érdeme van Pieter Cullis kanadai laboratóriumának (Cullis–Hope, 2017), könnyen célba juttathatók, ha felszínüket olyan molekulákkal módosítják, amelyek egy-egy sejt típusra jellemző felszíni molekulákkal lépnek kapcsolatba (például: receptorok ligandjai, sejtadhéziós molekulák, glikoproteineket felismerő lektinek, felszíni fehérjék ellen termelt ellenanyagok vagy azok rövidebb származékai, mint Fab, scFv, minibody stb.).

Hála a rekombináns DNS-technológiának, számos hiánybetegségben szenvedő beteg számára már korábban is elérhető volt az enzimpótlás (ERT, enzyme replacement therapy), genetikailag módosított sejtek által előállított, tisztított enzimek formájában. Ez ugyan nagyon költséges, de nagyon jól működik például a lizoszomális tárolási betegségek esetében, mert ezek az enzimek sejtről sejtre át tudnak adódni. Nem megoldott viszont olyan sejtmagi enzimek sejtbe juttatása, amelyeknek a sejten belüli transzportját (célba jutását) nem tudjuk megoldani. Jó példa ezekre a betegségekre a Kabuki-kór, a Siderius típusú szellemi fogyatékoság vagy a Rett-szindróma. Az előbbi kettőben a gének epigenetikai módosítását végző enzimek (H3K4 hiszton-lizin N-metiltranszferáz, illetve a H3K20 hiszton demetiláz), az utóbbi esetében az epigenetikai módosításokat felismerő fehérje (metil-CpG kötő fehérje 2) hiányzik. Ezek a sejtmagi fehérjék nem jutnak be a keringsből a sejtekbe. Ilyenkor jöhet segítségünkre az mRNS: a sejtben termelődő fehérje transzportja a természetes úton magától oldódik meg, megtalálja helyét a magban, és elvégzi feladatát.

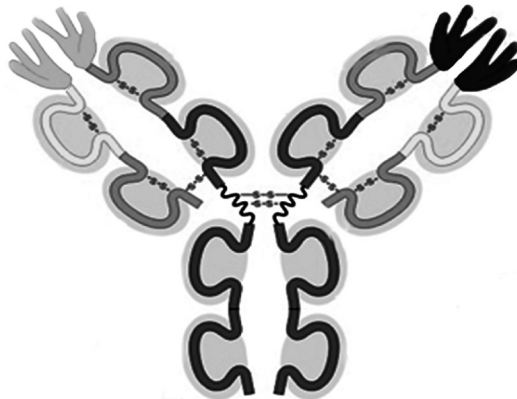
Az elmúlt évtizedben a rosszindulatú betegségek gyógyításában szinte forradalmi változást jelentett az immunterápia (ICI, immune checkpoint inhibition) alkalmazása. Gyakran az az oka annak, hogy az immunrendszer tehetetlen az elfajult sejtekkel szemben, hogy a tumor mikro környezetében (a véletlenül fellépő mutációk következtében) olyan fehérjék termelődnek, amelyek megakadályozzák a tumort pusztító T-sejtek működését, vagy kiváltják azok inaktíválódását, vagy beindítják az immunsejtek programozott halálát. Ennek következtében a hatásos immunválasz elmarad, pedig az immunrendszer megfelelően aktiválódott.

Az immunterápia lényege, hogy a betegbe olyan (monoklonális) ellenanyagokat juttatunk, amelyek hatástalanítják a tumor mikro környezetét által termelt fehér-

jéket (ilyen például a programozott halál receptorának ligandja, a PD-1L), vagy lehetetlenné teszik a T-sejtek felszínén kifejeződő receptorok (CTLA-4, PD-1) jelfolyamatának beindulását, így az immunsejt inaktíválódását vagy programozott halálát. Az immunterápia gyakran olyan reménytelen betegek teljes gyógyulását is képes kiváltani, akik szervezetében az áttétek eltávolítása már sebészileg megoldhatatlan. A fékeiktől megszabadított immunrendszer testszerte azonosítja és elpusztítja a tumorsejteket.

Ezek a gyógyszerek módfelett drágák, hiszen a fejlesztési költségeken kívül maga az előállítás is nagy ráfordítást igénylő *high-tech* feladat: egy több száz aminosavból álló molekulát kell hibátlan konformációban előállítani, reprodukálhatóan, megfelelő módosításokkal (például glikozilációval), tömeges mennyiségben. Itt ismét szerephez juthat az mRNS. Ha nem magát a monoklonális ellenanyagot juttatjuk be a betegek sejtjeibe, hanem csak ennek mRNS-ét, akkor a hatóanyag tökéletes konformációban, természetes glikozilációval, folyamatosan termelődik a beteg szervezetében. Persze az mRNS rövid élettideje miatt itt is szükség lesz újabb és újabb „oltásokra”. Nem mellesleg, az mRNS beoltása egy egyszerű orvosi rendelőben is megoldható, míg az ellenanyagok infúziója már kórházi körülményeket és jóval több időt igényel.

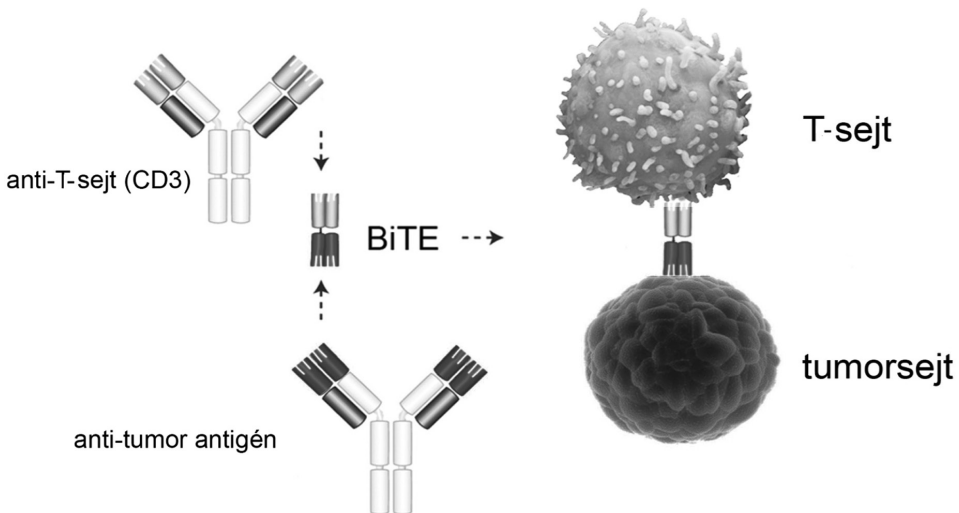
A sejtek által bemutatott tumor antigének és a T-sejt ezt felismerő receptora közötti kölcsönhatás gyakran nem elég erős, vagy a tumorsejtek antigénbemutató képessége elveszett (ez egy véletlen mutáció, amely jelentős szelekciós előnyt biztosít az elfajult sejt számára). Ilyenkor a daganat sejtjeinek szaporodását kevésbé vagy egyáltalán nem tudják kontrollálni a T-sejtek. Ekkor tud beavatkozni a tudomány! A rákkutatás egyik új találmánya a bispecifikus ellenanyag felhasználása (2. ábra).



2. ábra. Bispecifikus ellenanyag: a világosabb, illetve sötétebb színnel jelölt részek a változó doménben az antigént felismerő hurkok (CDR-ek)

Forrás: a szerző szerkesztése

A bispecifikus antitest egy olyan immunoglobulin, amelyik egyik antigénfelismerő helyével erősen kötődik a tumorsejt valamelyik felszíni fehérjéjéhez (nem is igényel feltétlenül bemutatott antigént, egy felszíni antigén is megteszi), míg másik karjával a citotoxikus T-limfocita CD3-fehérjét ismeri fel (ez a T-sejt receptorának egyik alegysége). Ezáltal mint egy kerítőtű, összehozza a kivégzésre ítélt tumorsejtet a hóhérával. Előnyösebb a teljes ellenanyag helyett csak az antigénfelismerő doméneket összekötve egy kis molekulát előállítani, ez a BiTE (bispecific T cell engager, bispecifikus T-sejt-kapcsoló molekula) (Löffler et al., 2003). A két sejt fizikai közelsége aktiválja a T-sejtet, perforint termel, amely feloldja a tumorsejt membránját, bejuttatva a sejtbe a granzimet, amely beindítja a sejthalált (3. ábra).



3. ábra. BiTE: a bispecifikus T-sejt-kapcsoló molekula. Az ellenanyagok rövid, antigént felismerő szakaszainak fúziójával alakul ki a sejt-sejt kapcsolatot létrehozó, minimális méretű molekula.

Forrás: a szerző szerkesztése

Az immunterápiához hasonlóan a bispecifikus ellenanyag előállításának, minőségkontrolljának a költségei miatt a kezelés ára itt is meglehetősen borsos, és gazdaságosabb lehet az mRNS bejuttatása a beteg szervezetébe. Ebben az esetben is a beteg maga állítja elő a gyógyító immunoglobulint tökéletes konformációban, megfelelő mennyiségben, ameddig szükség van rá, ahogy Karikóék kísérletében az egerek is megtették (Stadler et al., 2017). Itt is további előny, hogy egy egyszerű oltás kevesebb időt és kevésbé igényes infrastruktúrát igényel, mint az infúzió.

A nukleozidmódosított mRNS terápiás felhasználása alig pár évre tekint vissza. Ez az írás nem kívánt átfogó szakirodalmi összefoglalást adni, csak szemléltetni

szerette volna azokat a sokszínű, gyakran roppant szellemes megoldásokat, amelyekkel ez a technológia különböző betegségcsoportok gyógyításához hozzá tudott járulni. És ez a lista várhatóan hónapról hónapra bővülni fog.

IRODALOM

- Cullis, Pieter R. – Hope, Michael J. (2017): Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy*, 25, 7, 1467–1475. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.013, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498813/>
- Hotz, Christian – Wagenaar, Timothy R. – Gieseke, Friederike et al. (2021): Local Delivery of mRNA-Encoded Cytokines Promotes Antitumor Immunity and Tumor Eradication across Multiple Preclinical Tumor Models. *Science Translational Medicine*, 13, 610, Eabc7804. DOI: 10.1126/scitranslmed.abc78, <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abc7804>
- Isaacs, Alick – Lindemann, Jean (1957): Virus Interference. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 147, 258–267. DOI: 10.1098/rspb.1957.0048. Reprint: *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 1988. 38, 5, 258–319, <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/canjclin.38.5.280>
- Janeway, Charles A. (2013): Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54, 9, 1–13.
- Karikó Katalin – Buckstein, Michael – Ni, Houping et al. (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. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.06.008, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761305002116>
- Karikó Katalin – Weissman, Drew (2007): Naturally Occurring Nucleoside Modifications Suppress the Immunostimulatory Activity of RNA: Implication for Therapeutic RNA Development. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 10, 5, 523–532. <https://tinyurl.com/3tk8s9y>
- Löffler, Anja – Gruen, Michael – Wuchter, Christian et al. (2003): Efficient Elimination of Chronic Lymphocytic Leukaemia B Cells by Autologous T Cells with a Bispecific Anti-CD19/Anti-CD3 Single-Chain Antibody Construct. *Leukemia*, 17, 5, 900–909. DOI: 10.1038/sj.leu.2402890
- Pardi Norbert – Hogan, Michael J. – Pelc, Rebecca S. et al. (2017): Zika Virus Protection by a Single Low-Dose Nucleoside-Modified mRNA Vaccination. *Nature*, 543, 7644, 248–251. DOI: 10.1038/nature21428
- Stadler, Christiane R. – Bähr-Mahmud, Hayat – Celik, Leyla et al. (2017): Elimination of Large Tumors in Mice by mRNA-Encoded Bispecific Antibodies. *Nature Medicine*, 23, 7, 815–817. DOI: 10.1038/nm.4356, <https://www.nature.com/articles/nm.4356>
- Takahashi, Kazutoshi – Tanabe, Koji – Ohnuki, Mari et al. (2007): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131, 5, 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407014717>
- Warren, Luigi – Manos, Philip D. – Ahfeldt, Tim et al. (2010): Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 5, 618–630. DOI: 10.1016/j.stem.2010.08.012, <https://tinyurl.com/5b8jdmr5>