

GYÓGYÍTHATÓ-E AZ ALLERGIA mRNS VAKCINÁVAL?

DR. ENDRE LÁSZLÓ

VASÚTEGÉSZSÉGÜGYI KÖZPONT, BUDAPEST

Talán nagyképűségnek tűnik, ha azzal kezdem ezt az ismertetést, hogy én már számítottam arra, hogy valahol valakik megpróbálkoznak majd az allergiák hiposzzenzibilizációs kezelésére¹ kifejlesztett mRNS vakcina használatával. Nem kellett sokat várnom erre. Az *Allergy* 2023 januári számában megjelent egy rövid levél bangkoki szerzők tollából, melyben egerek Der p 1 és Der p 2 mRNS-sel történő sikeres kezeléséről számoltak be². Az igazsághoz hozzátartozik, hogy kilenc szerző között volt két philadelphiai kutató is (*Weissman* és *Pardi*), akik korábban már részt vettek egyéb mRNS vakcinák kidolgozásában és egy kanadai (*Paulo J. C. Lin*) az *Acuitas Therapeutics* cégtől, ahol a lipid nanorészecskéket állították elő.

GENETIKAI ALAPISMERETEK

Ahhoz, hogy megértsük az mRNS-sel történő kezelés lényegét, célszerű felfrissíteni genetikai alapismereteinket. Arra mindnyájan emlékszünk, hogy a DNS két egymással szemben álló csavart láncból áll, és ezekben a guaninnal mindig citozin, az adeninnel pedig timin áll szemben. Az RNS viszont egyláncú spirál és ebben az adenint uracil helyettesíti. Az RNS-ben a szénhidrát a ribóz, a DNS-ben viszont a dezoxiribóz. A „küldönc” (angolul: messenger,

rövidítve: „m”) RNS viszi az információt a DNS-től a riboszómákhoz (ez a folyamat a transzkripció), ott átadja az információt (ez a transzláció), ahol az ott lévő másik fajta RNS (ez a ribosoma RNS, vagy rRNS) ennek alapján létrehozza az aminosav láncot, vagyis a „terméket”. A DNS lánc szerkezetét 1953-ban közölte a *Nature*, az mRNS-t jóval később, 1961-ben fedezték fel. 1978-ban fordult elő először, hogy egy izolált mRNS-t emlősállat sejtjébe juttatva, ott az a kijelölt terméket állította elő³.

Az mRNS-sel történő kezelésnek legalább három előnye van a más nukleinsavval történő kezelésekkal szemben. (1) Nem tud beépülni a gazdaszervezet genomjába, így nem áll fenn a mutagenézis veszélye. (2) Az mRNS-nek csak a gazdasejt citoszoljába kell bejutnia (nem a sejtmagba), ahol át tudja adni az információt a riboszóma RNS-nek, hogy megtörténjen a kívánt protein szintézise. (3) Az mRNS csak ideiglenesen íródik át a gazdasejtbe és viszonylag gyorsan megtörténik a degradációja⁴.

AZ mRNS SEJTBE JUTTATÁSÁNAK NEHÉZSÉGEI

Egyáltalán nem magától értetődően egyszerű dolog az mRNS-t a sejtekbe juttatni. Ugyanis ezek nagy molekulák (a molekulásúlyuk 10^4 és 10^5 Dalton közötti), emellett még negatív töl-

tésűek is, így nem juthatnak keresztül a sejtmembrán ugyancsak anionos természetű kettős lipid rétegén. Ha bejutnak a testünkbe, ott (a DNS és az RNS is) a toll-like receptorok aktiválásával stimulálják a velünk született immunitásunk sejtjeit, mire azok azonnal körülveszik és a nukleáz enzimek segítségével elpusztítják őket. Ezért mindenképpen szükség volt olyan módszerek kidolgozására, amelyekkel kiküszöbölhetőek a most említett nehézségek⁵.

Az előbb leírtakból következő alapszabály, hogy a nukleinsavat „szállító” molekulának mindenképpen kationosnak vagy ionizálhatónak kell lennie (mert a sejtmembrán anionos). Erre a célra (mármint az mRNS „szállítására”) már 2005-től pozitív töltésű anyagokat, elsősorban valamilyen lipidet használnak.

A LIPIDEK MINT „SZÁLLÍTÓMOLEKULÁK”

A kanadai Protiva Biotherapeutics munkatársai egyszerű és gyors módszert dolgoztak ki liposzómákkal történő kapszulációra⁶. A lipideket feloldották etanolban, a DNS-ből vizes oldatot készítettek, majd ezt a kettőt több lépcsőben, speciális eszközben összekeverték. Az így létrejövő monodiszperz hólyagocskák átmérője 200 nm alatti, a DNS „bekapszulázódásának” aránya pedig 80% feletti volt. Az így létrejövő részecskéket SPLP-nek (stabilized plasmid lipid particles) nevezték.

Heyes és mtsai. ugyancsak 2005-ben, több fajta szaturációjú kationos lipidet állítottak elő aszerint, hogy 0, 1, 2 vagy 3 kettős kötés van egy alkil láncon belül. Megfigyelésük szerint a szaturáció nő 2-től a 0 felé haladva, a fúzióra való képességük (fusogenicity) viszont csökken. Viszont a kevésbé fuzogén részecskék gyorsabban internalizálódnak a sejtben. Szerintük a transzfekeciós modell úgy működik, hogy a kis lipid vezikula fúzióba lép az endoszóma membránjával, és létrejön egy ún. endosomal release, ami a nukleinsav citoplazmában belüli mozgását segíti elő⁷.

2006-ban jelent meg a Nature-ban *Zimmermann* sok szerzős (közte *Heyes* és *Jeffs*,

akik 2005-ben ismertették a kationos lipidkapszulákat) közleménye arról, hogy majmoknak liposzómákba burkoltan adott iRNS kezeléssel szignifikánsan csökkenteni tudták azok koleszterin, low-density lipoprotein és ApoB protein szintjét⁸. A cél az, hogy a bejuttatott lipid mielőbb tűnjön el.

Maier és mtsai 2013-ban ismertették az erre alkalmas lipidjüket (L319-nek nevezték el), melyben az egyik kettős kötetést észter kötéssel helyettesítették⁹.

A LIPID NANORÉSZECSKÉK SZEREPE

Ma már a „szállító molekulák” az esetek legnagyobb részében lipid nanorészecskék (ezekbe „csomagolják” az RNS-t). Az általam ismert szakirodalom szerint ennek első leírása 2007-ből származik. Ezek a nanorészecskék ismételt, szisztémásan adva majmoknak, nem okoztak allergiát vagy toxicitást¹⁰.

Akinc és mtsai. (a massachusettsi és a németországi Alnylam Pharmaceuticals kutatói) 2008-ban egy új, lipidszerű molekulacsoportot írtak le, a lipidoidokat, melyek nemcsak segítik az RNS-t a bejutásban, hanem facilitálják a gén transzkripciót is¹¹.

Talán mások is észrevették már, hogy szeretek (ittthon vagy külföldön dolgozó) magyar szerzőkre is hivatkozni. *Szebeni János és munkatársai* (szinte kizárólag magyarok, igaz, az USA-ban tevékenykednek) a liposzómákkal kiváltott pulmonalis hipertensio állatkísérletes modelljét vizsgálták. Azt figyelték meg, hogy a pulmonalis hipertensio nem jött létre, ha a monodiszperz liposzómák $0,19 \pm 0,1$ μm átmérőjűek (vagyis nagyon kicsik) voltak. Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy (sertéseken) a negatív töltésű liposzóma hólyagocskák komplement-aktiváció révén, masszív kardiopulmonális distresszt okoztak, de a neutrális liposzómák nem váltottak ki hemodinamikai változást. Mindezeket 2000-ben és 2002-ben írták le^{12,13}, vagyis legalább három évvel azelőtt, hogy bárki foglalkozni kezdett volna a liposzómákkal, mint szállító molekulákkal...

VÉDELEM A NUKLEÁZ ENZIMEKTŐL

Képzeld el, hogy odáig eljutottunk, hogy valahogyan sikeresen bejuttattuk a mesterségesen létrehozott mRNS-t a sejtbe. Most jön a másik nehéz feladat, az mRNS-t meg kell védeni a nukleáz enzimektől. *Karikó Katalin és munkatársai* Philadelphiában figyelték meg elsőként 2005-ben, hogy ha az RNS-ben az uridint pszeudouridinnel helyettesítik, akkor nem indul be (vagy sokkal kisebb fokú) a dendritikus sejtek aktivációja és citokin termelése¹⁴.

Egy évvel később *Judge és mtsai.* is hasonló megfigyelést tettek¹⁵. Ők siRNS-sel dolgoztak (hamarosan írom, hogy mi ez), és azt figyelték meg, hogy az RNS által kiváltott immunstimulációt meg lehetett gátolni, ha a dupla szálú RNS egyik szálában az uridint vagy a guanozidot metilálták (vagyis az RNS bontó enzimek számára felismerhetetlenné tették).

Karikó és mtsai. 2008-ban már azt is igazolni tudták, hogy az uridin helyett pszeudouridint tartalmazó mRNS nagyobb mérvű transzlációs kapacitással rendelkezik, mint az „eredeti”¹⁶. Ez a módosított változat biológiailag stabil, alig immunogén, azaz csak egészen kis mértékben indítja be pl. az interferon-alfa termelést (vagyis az mRNS megsemmisítését).

2011-ben *Karikó és mtsai.* rájöttek, hogy ezért a megmaradó kisfokú interferon és proinflammatorikus citokin indukcióért a „szennyezések” (például a módosított uracilt tartalmazó mRNS megkettőződése) a felelősek. Azt is leírták, hogy ez a „szennyezés” egy speciális folyadék-kromatográfiás eljárással (HPLC) eltávolítható, és az így „megtisztított” mRNS már egyáltalán nem immunogén, és a megcélzott sejtben történő transzlációja a nem módosított uridinénak a tíztől ezerszerese közötti lett¹⁷!

Ahhoz, hogy az mRNS-t gyógyszerként lehessen használni, legalább négy nehézséget kellett leküzdeni. A transzlációs készségének fokozásához és a stabilitásának növeléséhez (meg főleg azért, hogy a nukleáz enzimek ne pusztítsák el rögtön a sejtbe jutása után) módosítani kellett valamelyik nukleozidját. Ezért az uridint pszeudouridinnel vagy metil-pszeudouridinnel

helyettesítették. Ha ezt a terméket ezután speciális folyadék-kromatográfiával (HPLC) tisztították, az tovább növelte az általa termeltetett protein tisztaságát, ugyanakkor csökkentette az mRNS (saját maga elleni) immunserkentő tulajdonságát. Ha nem nem-immunogén mRNS-t használnak, azt felismerik a velünk született immunrendszer receptorai (pl. TLR3, TLR7, TLR8 stb.), 1-es típusú interferon termelést indítanak be és meggátolják a transzlációt¹⁴.

A módosított és speciális folyadék-kromatográfiával (HPLC) tisztított mRNS nukleozid lipid nanorészecskékben történt sikeres beinjekciózásáról az első részletes leírás a kanadai Acuitas Therapeutics és a philadelphiai University of Pennsylvania kutatóinak tollából jelent meg 2015-ben⁴. Annak a lehetőségét, hogy az mRNS-t esetleg gyógyításra is fel lehet használni, elsőként egy La Jollában dolgozó kaliforniai kutatócsoport vetette fel 1992-ben a Science-ben¹⁸. *Jirikowski és mtsai.* veleszületetten diabetes insipidusban szenvedő patkányok hypothalamusába injekcióztak vasopressint kódoló mRNS-t, ami után az állatok betegsége néhány órán belül megszűnt és a „gyógyult” állapotuk 5 napig kitartott.

AZ iRNS ÉS A siRNS JELENTÉSE

Ha valaki a téma szakirodalmát böngészi, ott a címekben többször szerepel az iRNS és a siRNS (angol közleményekben iRNA és siRNA) rövidítés. Engem nagyon zavart, hogy nem tudtam, hogy ez mit jelent. Az RNS a ribonukleinsav (RNA: ribonucleic acid), de mi lehet az RNS melletti „i” betű?

1998-ban *Fire és mtsai.* Baltimore-ban megállapították, hogy ha RNS-t juttatnak egy sejtbe, akkor az ott interferál egy endogén gén funkciójával és megszünteti annak a működését. Azt találták, hogy a kettős láncú RNS hatékonyabban interferál a gazda RNS-ével, mint a szimpla szál. Ezt nevezik azóta interferáló RNS-nek, RNSi-nek vagy iRNS-nek¹⁹. Ennek a segítségével lehet kiiktatni a káros anyagokat gyártó géneket, másrészt ezekkel lehet vizsgálni az

ismeretlen gének termékeinek a működését. *Novina és Sharp* erről írta 2004-ben a *Nature*-ben, hogy forradalmi felfedezés²⁰.

A synthetic short (a „short” itt azt jelenti, hogy az RNS-nek csak egy rövid darabkáját szintetizálták) interfering RNS (siRNS) egy jó lehetőség arra, hogy megszüntessék olyan gének működését, amelyek káros terméket állítanak elő. Sajnos a siRNS igen erősen kiváltja a veleszületett immunválaszt, ami a terápiás törekvések gátja lehet.

Vannak azért biztató próbálkozások is. 2005-ben a hepatitis B vírus ellen termeltek egy short interfering RNS-t, amit összekevertek egy speciális liposzómával és így egy stabil nukleinsav-lipid részecskét hoztak létre. Egereknek intravénásan adva sikeresen alkalmazták²¹.

Ugyancsak 2005-ben a Los Angeles-i gyermekkórház orvosai Ewing sarcomában szenvedő egereket kezeltek siRNS-sel. A Ewing sarcoma sejtjei transzferrin receptort expresszálnak. EWS-FLI1 gén ellenes siRNS-t injekciótak sarcomás egerekbe. A vivőanyag ciklodextrint tartalmazó polikation (tehát nem lipid) volt, ez védte meg a EWS-FLI1-et. Melléjük transzferrin is volt „csomagolva”, hogy ez rákötődhessen a daganatsejten lévő transzferrin receptorra és így a „beküldött” siRNS rögtön a daganatsejthez jusson²².

KORONAVÍRUS ELLENI VAKCINA

Ennyi kiváló előzmény után már nem csoda, hogy a koronavírus elleni vakcinát rendkívül gyorsan elő tudták állítani. 2020 januárjában ismerték meg SARS-CoV-2 genomját és 11 hónappal később már patikában volt a Moderna és a Pfizer-BioNTech vakcinája, sőt ebből a 11 hónapból 8-ban a klinikai kipróbálás zajlott.

42 amerikai és német szerző (köztük *Karikó Katalin*) főként a BioNTech és a Pfizer kutatói, 2020 júliusában küldték be a *Nature*-nak azt a cikket, melyben leírják, hogy lipid nanorészecskékbe „csomagolt” módosított mRNS-sel 60 (18–55 éves) egészséges egyénen végeztek vakcinációt a SARS-CoV-2 vírus tüske-

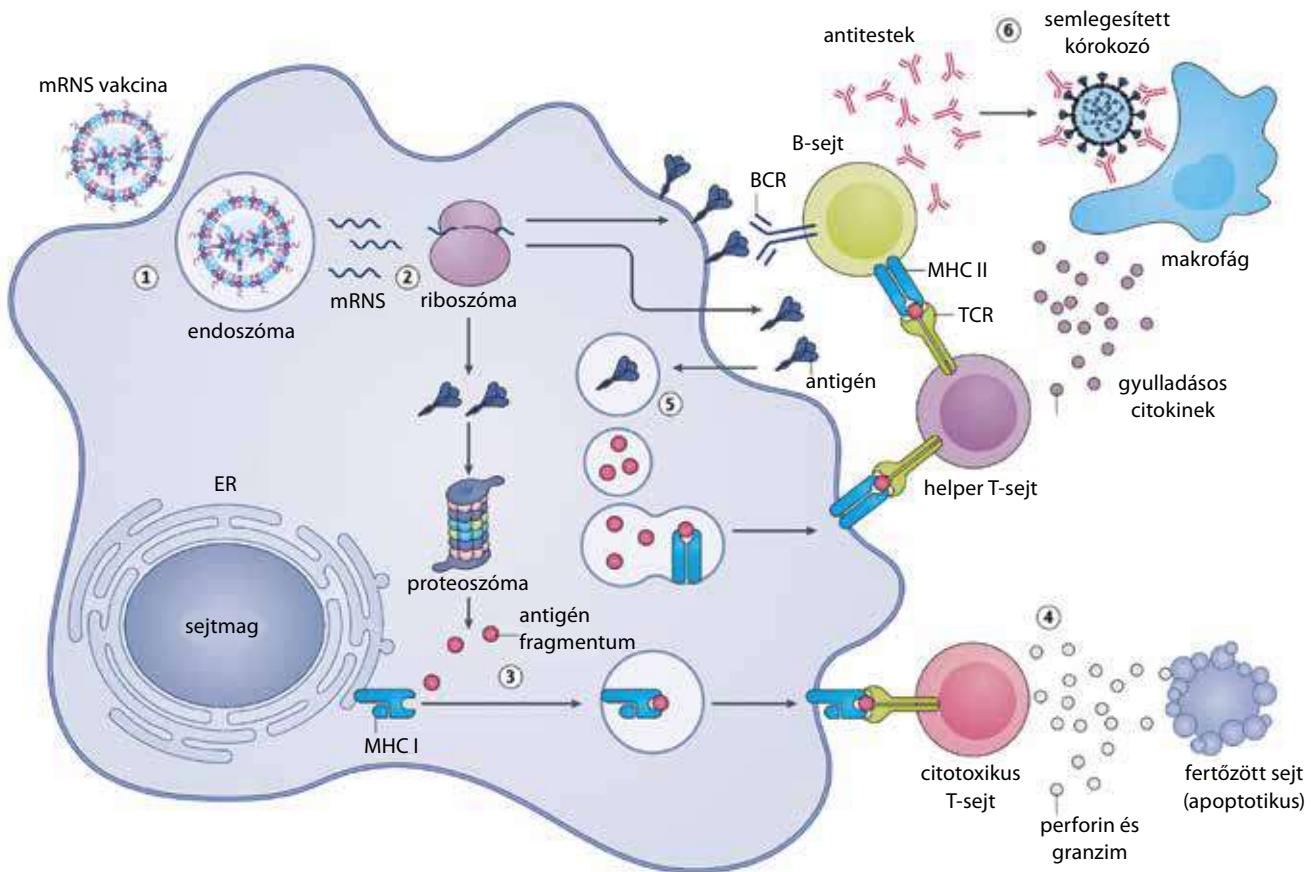
fehérje receptorkötő doménjével. Ez nagyon erős ellenanyag termelést váltott ki, emellett a CD4 és CD8 lymphocita válasz is erőteljesen megjelent. Súlyos mellékhatás nem volt²³.

Az ezt követő évben egy 34 kutatóból álló munkacsoport – köztük 5 magyar kutató (*Tom-báczy István, Laczkó Dorottya, Karikó Katalin, Krammer Flórián, Igyártó Z. Botond*, de egyik sem magyarországi munkahelyen) – megerősítette azt a megfigyelést, hogy a használt lipid nanorészecske nagyon erős immunválaszt vált ki, nagyon jó adjuváns. Az ellenanyag termelés mellett follicularis T helper sejteket hívott elő, aktiválta a centrum germinativum B sejtjeit, hosszú életű plazma sejteket és memória B sejteket indukált²⁴.

Ugyancsak 2021-ben *Chaudhary és mtsai.* összefoglalták a vakcina sikerességének titkát (1. ábra)⁵. Ehhez (nem csak szerintük) az kellett, hogy már évekkorábban rájöttek, hogy a világgjárványt okozó vírushoz nagyon hasonló MERS-CoV-nek és SARS-CoV-nek a fő antigénje a tüskefehérje, melynek kifestésével annak immunogenitását maximalizálni lehet. Mindezek figyelembe vételével a Moderna például kettő (!) nap alatt létrehozta a megfelelő mRNS-t (mRNA-1273) és 66 nap után már kezdődhetett is a fázis 1-es vizsgálatsorozat. Különösen szokatlan ez a gyorsaság, ha összehasonlítjuk azzal, hogy a mumpsz elleni oltóanyag kidolgozása 4 évig tartott (ami szintén rövidnek számít). Persze az sem ártott, hogy csak az Egyesült Államok 1,95 milliárd dollárt adott a Pfizer-BioNTech-nek és másik 2,48-at a Modernának... Lényegében a koronavírus pandémiának „köszönhető”, hogy az mRNS-sel történő kezelést és *Karikó Katalin* nevét megismerte a nagyvilág.

KARIKÓ KATALIN SZEREPE ÉS ELISMERÉSE

Karikó Katalin elismertségét jelzi, hogy már 2019-ben (még a világgjárvány kitörése előtt), őt hívták meg vendégszerkesztőnek a *Molecular Therapy* mRNS-sel, mint terápiás lehetőséggel foglalkozó különszámának az összeállítására²⁵.



1. ábra: Az mRNA vakcinák az antigénprezentáló sejtek transzfekcióján keresztül váltanak ki immunitást. (1) Az injektált mRNA vakcinák endocitózis útján az antigénprezentáló sejtekbe kerülnek. (2) Az endoszómából való kiszabadulás és a citoszolba jutás után megtörténik a transzláció, és az mRNA kódja alapján a riboszóma antigénfehérjét szintetizál. Az antigénfehérje többféle módon stimulálhatja az immunrendszert. (3) Az intracelluláris antigént a proteaszóma komplex kisebb fragmentumokra bontja, majd ezeket a fragmentumokat a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) I. osztályú fehérjékhez kapcsolva mutatják be a sejt felszínén citotoxikus T-sejteknek. (4) Az aktivált citotoxikus T-sejtek citolitikus molekulákat (pl. perforin és granzim) szekretálnak, és megölik a fertőzött sejteket. (5) Ezenkívül a szekretált antigéneket a sejtek felvehetik, az endoszómákban belül lebontják, majd az MHC II. osztályú fehérjék segítségével a sejt felszínén bemutatják a helper T-sejteknek. (6) A helper T-sejtek elősegítik a keringő kórokozók kiürülését azáltal, hogy a B-sejteket semlegesítő antitestek termelésére serkentik, és a makrofágokat gyulladásos citokineken keresztül aktiválják. (BCR: B-sejt receptor; ER: endoplazmatikus retikulum; TCR: T-sejt receptor) (Chaudhary és mtsai. nyomán)⁵

Karikó elismertségének további jelzője (a sok megérdemelt kitüntetés mellett), hogy 2021 októberében a Nature Reviews szerkesztősége az ő véleményét kérte ki (majd közölte Research Highlights című rovatában) a koronavírus elleni mRNA alapú vakcinákkal kapcsolatban²⁶. Itt kihangsúlyozta, hogy ezek a klinikailag nagyon sikeres vakcinák csak annak eredményeként jöhettek létre, hogy bennük az uridint előtte módosították.

Ugyancsak 2021-ben, a Cell Systems folyóirat szerkesztősége három, e téren működő elismert kutatót kérdezett meg, hogy mit várnak a jövőben az mRNA-tól, mint gyógyszertől²⁷. Karikó Katalin szerint passzív immunizációra alkalmas ellenanyagokat lehet majd

előállítani a segítségével, de talán a károsodott ereket is meg lehet majd javítani ezzel a módszerrel. A csontvelőben lévő őssejtekbe juttatva az mRNA-t, sok más betegséget (pl. HIV, sarlósejtes anaemia) is gyógyíthatnak talán. Kathryn Whitehead szerint egy sor fertőző betegség ellen lehet majd vakcinát előállítani, de talán a haemophilia és a sarlósejtes anaemia gyógyítására is jó lesz majd. Roy van der Meel úgy vélte, hogy a koleszterin szint tartós csökkentésére is alkalmas lesz, emellett a májat is regenerálhatja és anyagcsere betegségeket is gyógyítani lehet majd vele.

Érdekes, hogy egyikük sem reménykedett abban, hogy talán az allergiás betegségek oki kezelésére is megfelelő lehet.

mRNS AZ ALLERGIA IMMUNKEZELÉSÉRE

Ezt követően, 2023 januárjában az Allergy-ben jelent meg a referátum elején említett közlemény, melyben arról számolnak be, hogy egerekben atka allergén ellenes blokkoló ellenanyagokat tudtak létrehozni mRNS vakcinációval².

Ehhez először előállították a háziporatka Der p 1 és Der p 2 antigénjének a hipoallergén változatát, majd az ezt kódoló mRNS darabka nukleozidját módosították. Ezt a módosított mRNS-t nanoméretű lipidburokba csomagolták és ennek 20 µg-jával immunizáltak egereket (i.m. injekció a 0., 3. és 6. héten). Ezt követően mindkét allergén ellen termelődtek IgG1 és IgG2 típusú ellenanyagok, allergén-specifikus IgE viszont egy esetben sem. Ezek a „blokkoló” ellenanyagok képesek voltak megakadályozni a basophil aktivációt, valamint azt, hogy az IgE rákapcsolódjon a kezeletlen Derp1 és Derp2 antigénre. A kezelés biztonságosságát jelzi, hogy a leírt módon történő immunizálást követően egyik egér sem kapott anaphylaxiás sokkot a Der p 1 vagy a Der p 2 intramuszkuláris injekciójától². Azt egyelőre még nem volt lehetőségük vizsgálni, hogy az előzetesen „allergiássá tett” egerek allergiája megszűnik-e a most általuk (a világon elsőként) leírt kezeléstől.

Az allergiák immunterápiájának hatékonyságát klinikai adatokkal (pl. mérséklődnek vagy megszűnnek a panaszok, kevesebb tüneti gyógyszerre lesz szükség, csökken a bőrpróba pozitivitás mértéke), valamint néhány laboratóriumi paraméter változásával tudjuk lemérni. Sikeres esetben például 10-szeresre vagy akár 100-szorosra nő a blokkoló IgG1 és IgG4 szintje, vele együtt nő az IgA1 és IgA2 szintje is, negatívvá válik a basophil aktivációs teszt és erősen csökken vagy megszűnik az allergén által kiváltott *in vitro* degranuláció. Ennek ellenőrzésére a basophil sejtek felszínén megjelenő CD63 expressziót használják. A Th2-es immunválasz citokinjeinek a szintje csökken, a Th1-es citokineké nő²⁸.

Mint az egyik – ebben a referátumban is ismertetett – cikkből kiderült, a lipid nanoré-

szecskékkel mint adjuvánsokkal történő aktív immunizáció mindezen változások létrehozására képes²⁴.

Mivel a világ lakosságának közel 20%-a (több mint 1 milliárd ember) allergiás valamilyen, ez óriási piac a gyógyszergyárak számára, ezért jó esélyünk van arra, hogy nagyon rövid időn belül nemcsak egereken lehet majd eredményes allergén immunterápiát végezni. ■

IRODALOM

1. Calderon MA, Casale T, Cox L et al. Allergen immunotherapy a new semantic framework from the European Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL. Consensus report. *Allergy* 2013; 68: 825-828.
2. Jitthamstaporn S, Inthong R, Audomsun D, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines yield robust blocking antibody responses against major house dust mite allergens. *Allergy* 2023; 78 : 315-318.
3. Kariko K. Developing mRNA for therapy. *Keio J Med* 2022; 71(1): 31.
4. Pardi N, Tuyishime S, Kariko K, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release* 2015; 217: 345-351.
5. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Rev* 2021; 20: 817-838.
6. Jeffs LB, Palmer LR, Ambegia EG, et al. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm Res* 2005; 22: 362-372.
7. Heyes J, Palmer L, Bremner K, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release* 2005; 107: 276-287.
8. Zimmermann TS, Lee ACH, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006; 441: 111-114.
9. Maier MA, Jayaraman M, Matsuda S, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Amer Soc Gene Cell Ther* 2013; 21(8): 1570-1578.
10. Heidel JD, Yu Z, Liu JYC, et al. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5715-5721.
11. Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 561-569.
12. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, et al. Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H319-328.
13. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, et al. Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic PEG liposomes: experimental and clinical studies. *J Liposome Res* 2002; 12: 165-172.
14. Kariko K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005; 23: 165-175.

15. Judge AD, Bola G, Lee ACH, et al. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 2006; 13: 494-505.
16. Kariko K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 2008; 16(11): 1833-1840.
17. Kariko K, Muramatsu H, Ludwig J, et al. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research* 2011; 39(21): e142.10.1093
18. Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, et al. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science* 1992; 255: 996-998.
19. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
20. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature* 2004; 430: 161-164.
21. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HGV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1002-1007.
22. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, et al. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005; 65: 8984-8992.
23. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and Th1T cell responses. *Nature* 2020; 586: 594-599.
24. Alameh MG, Tombácz I, Bettini E, et al. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity* 2021; 54: 2877-92.
25. Karikó K. Editorial. In vitro-transcribed mRNA therapeutics: out of the shadows and into the spotlight. *Molec Therap* 2019; 27: 691-692.
26. Karikó K. Modified uridines are the key to a successful message. *Nature Rev* 2021; 21: 619.
27. Karikó K, Whitehead K, van der Meel R. What does the success of mRNA vaccines tell us about the future of biological therapeutics? *Cell Systems* 2021; 12: 757-758.
28. Shamji M, Layhadi JA, Sharif H, et al. Immunological responses and biomarkers for allergen-specific immunotherapy against inhaled allergens. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2021; 9: 1769-1778.