

УДК 616-006.04

Персонализированные мРНК-вакцины в онкологии: возможности, сложности и перспективы

А. А. Ибрагимова¹, А. А. Федоров¹, К. М. Кириленко², Е. Л. Чойнзонов¹, Е. В. Денисов¹, М. Р. Патышева^{1*}

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

²Центр системной биоинформатики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

*E-mail: patysheva_mr@onco.tnims.ru

Поступила в редакцию 31.05.2025

Принята к печати 06.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27707

РЕФЕРАТ Противоопухолевые вакцины на основе мРНК представляют собой инновационный подход к лечению онкологических заболеваний. Противоопухолевые мРНК-вакцины структурно основаны на специфических опухолевых антигенах, что позволяет активировать иммунную систему пациента для борьбы с раковыми клетками. На сегодняшний день проводятся клинические испытания мРНК-вакцин против различных типов опухолей, включая меланому, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак молочной железы и другие. Благодаря безопасности и гибкости применения, эти препараты имеют значительный потенциал для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований и увеличения продолжительности жизни пациентов. В обзоре представлена информация о развитии технологии производства препаратов на основе мРНК, алгоритме создания персонализированных противоопухолевых мРНК-вакцин, практических аспектах их применения, а также рассмотрены актуальные клинические исследования персонализированных мРНК-вакцин в онкологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мРНК-вакцина, рак, иммунотерапия, неоантигены, липосомы, клинические исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЗНО – злокачественные новообразования; АПК – антигенпрезентирующие клетки; ЛНЧ – липидные наночастицы; ЛПП – липополиплексы; ПЭГ – полиэтиленгликоль; СрG-ОДН – СрG-олигодезоксинуклеотиды; БТЛП – биотехнологические лекарственные препараты; CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день онкологические заболевания остаются одной из важнейших медико-социальных проблем. Актуальность проблемы злокачественных новообразований (ЗНО) обусловлена их высокой распространенностью, а также сложностью профилактики и лечения [1]. Несмотря на значительный прогресс в разработке и оптимизации методов лечения ЗНО, показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов остаются неудовлетворительными [1]. Так, продолжительность жизни более 50% пациентов в одном из наиболее распространенных типов ЗНО – рак легкого – не превышает 3.5 лет после установления диагноза [2].

Для повышения эффективности лечения и увеличения продолжительности и качества жизни па-

циентов необходимы разработка и внедрение новых терапевтических подходов. В этом контексте особый интерес представляет модуляция противоопухолевого иммунного ответа. Так, включение иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек в клинические рекомендации значительно повысило эффективность лечения меланомы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников и других типов ЗНО [3, 4]. Одним из перспективных направлений иммунотерапии является применение противоопухолевых вакцин на основе нуклеиновых кислот (ДНК и мРНК).

Использование мРНК в качестве привлекательной платформы для создания противоопухолевых вакцин основано на ее способности доставлять специфические транскрипты, несущие информацию

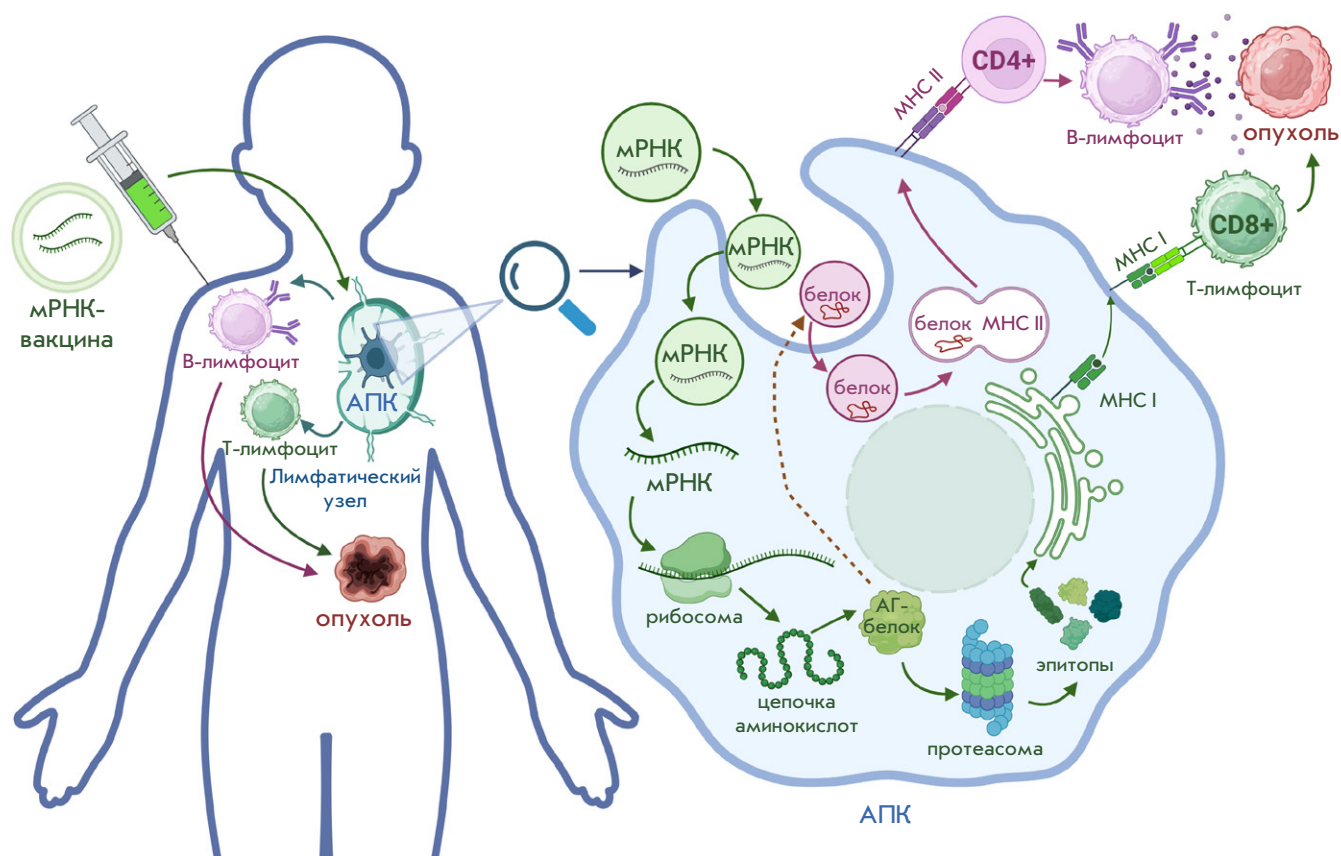


Рис. 1. Механизм действия противоопухолевой мРНК-вакцины. мРНК – матричная РНК, АПК – антигенпрезентирующая клетка, АГ-белок – антигенный белок

об опухолевых антигенах, в цитоплазму антигенпрезентирующих клеток (АПК) пациента для последующей экспрессии целевого антигена. После процессинга ассоциированные с целевым антигеном белки (эпитопы) могут быть представлены на поверхности АПК путем связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 классов – МНС I и МНС II соответственно (рис. 1). Это запускает активацию иммунной системы, включая реакцию CD4+ Т-хелперов, гуморальный ответ В-клеток и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов [5]. Вакцинные платформы на основе мРНК имеют такие преимущества, как:

- 1) Улучшенная стабильность и трансляция. Современные методы модификации нуклеотидных последовательностей и совершенствования систем доставки делают мРНК более устойчивой к деградации и обеспечивают высокий уровень трансляции в клетках [6].
- 2) Иммуностимулирующие свойства мРНК. Сама молекула мРНК обладает способностью активировать врожденный иммунный ответ, что усиливает эффективность вакцины [7].

3) Безопасность. В отличие от ДНК-вакцин и вирусных векторов, мРНК не интегрируется в геном клетки-хозяина, что исключает риск инсерционного мутагенеза [8].

4) Относительная доступность производства персонализированных препаратов. На основании информации о целевой последовательности мРНК необходимо синтезировать только ДНК-матрицу, которая обеспечивает получение многих копий мРНК с помощью транскрипции *in vitro*. Это делает создание мРНК-вакцины значительно более дешевым, чем вакцин на основе ДНК или вирусных векторов.

В обзоре рассмотрены возможности терапевтических мРНК-вакцин в случае солидных опухолей, акцентируя внимание на синтез мРНК, системы доставки мРНК к антигенпрезентирующим клеткам и текущее состояние клинических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ ЭТАПЫ В РАЗВИТИИ мРНК-ТЕХНОЛОГИЙ

Несмотря на то, что мРНК и процесс транскрипции были открыты в 60-х годах XX века, мало кто воспринимал возможность создания медицинских препаратов на их основе. Ситуация измени-



Рис. 2. История развития технологии производства и применения мРНК-вакцин. РЭА – раково-эмбриональный антиген, ДК – дендритные клетки, мРНК – матричная РНК

лась в 1984 году с получением биологически активной синтетической мРНК, которую в дальнейшем смогли использовать для регуляции экспрессии целевых генов с целью лечения заболеваний [9] (рис. 2). Дальнейшему изучению мРНК в качестве терапевтического агента препятствовала ее физическая нестабильность, а также плохое проникновение в клетки [10]. Однако в 1989 году была описана первая успешная трансфекция синтезированной мРНК люциферазы *Photinus pyralis* в клетки мыши с использованием катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорида, встроенного в липосому [11]. В 90-е годы почти все компании, занимающиеся разработкой мРНК-вакцин, предпочитали вкладывать ресурсы в другие направления, поскольку производство стабильной липосомной мРНК обходилось слишком дорого. Тем не менее исследования продолжались, и в 1990 году введение мРНК мышам показало возможность экспрессии синтетической мРНК в условиях *in vivo*

[12, 13]. А через три года была получена первая профилактическая мРНК-вакцина, кодирующая нуклеопротеин вируса гриппа для активации цитотоксических Т-клеток мышей [14].

Первый опыт формирования противоопухолевого иммунитета у мышей после внутримышечного введения мРНК, кодирующей ген эмбрионального опухолевого антигена (СЕА), был описан в 1995 году [15]. Позднее, в 1999 году на модели меланомы мыши показали, что введение в селезенку мРНК gp100, кодирующей гликопротеин матрикса меланомы, тормозит опухолевый рост [16]. В это же время было инициировано клиническое исследование 1 фазы по активации антигенной презентации аутологических дендритных клеток пациентов с раком предстательной железы с помощью синтетической мРНК, кодирующей простатспецифический антиген (PSA) [17]. В 2000 году Ингмар Хоэрт и соавт. установили, что прямые инъекции мРНК могут вызывать иммунный ответ у мышей [18], а затем, учи-

тывая перспективность разработки мРНК-вакцин, была создана компания CureVAC (Германия), которая по сей день входит в перечень ведущих компаний-разработчиков мРНК-вакцин [19].

Значительная часть фундаментальных идей по разработке мРНК-вакцин принадлежит Каталин Карико и Дрю Вайсману. В 1997 году, разрабатывая вакцину от ВИЧ на основе мРНК, исследователи отметили воспалительные реакции при введении вакцины мышам, когда мРНК связывалась в организме с Toll-подобными рецепторами, отвечающими за обнаружение чужеродных молекул [20]. Ученым удалось найти решение, которое легло в основу разработки следующего поколения мРНК-вакцин. Так, в 2005 году была опубликована ключевая работа и запатентован способ модификации одного из компонентов мРНК – уридина в псевдоуридин – вследствие чего иммунная система переставала воспринимать мРНК как чужеродную, и синтез белка в клетке шел гораздо эффективнее [21, 22]. Кроме того, такая мРНК была стабильнее немодифицированной. В 2023 году Карико и Вайсман были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие, касающееся способа модификации нуклеозидных оснований [23].

Совершенствование технологий на основе мРНК позволило разработать эффективные мРНК-вакцины против COVID-19 таким фармацевтическим компаниям, как Moderna и Pfizer-BioNTech [6]. Успешное и широкое применение таких препаратов привело к быстрому развитию и оптимизации производственной цепочки мРНК-вакцин [24]. При этом мРНК-технологии подходят для создания препаратов не только против инфекционных заболеваний (вирусов бешенства, гриппа, Эпштейна–Барр, Зика, Нипах и др.), но и против онкологических заболеваний, например, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы и немелкоклеточного рака легкого, привлекая внимание ученых и биотехнологических и фармацевтических компаний России, США, Германии, Китая и других стран [24]. В связи с этим в 2013 году было начато первое клиническое исследование персонализированной мРНК-вакцины против меланомы (NCT02035956) [25].

Перспективой современной противоопухолевой терапии является индивидуализация лечения. Показана высокая эффективность противоопухолевых мРНК-вакцин, направленных против опухолевых неоантигенов, которые образуются в злокачественных клетках в результате различных мутационных событий. Неоантигены можно разделить на две категории: общие и персонализированные [26, 27]. Первые являются общими у раз-

ных онкобольных, отсутствуют в нормальном геноме и потенциально могут использоваться в качестве терапевтических противоопухолевых вакцин широкого спектра действия [28, 29]. Персонализированные неоантигены уникальны для опухоли каждого отдельного пациента, они показали большую терапевтическую эффективность [30–32]. Процесс изготовления персонализированной противоопухолевой мРНК-вакцины начинается с определения спектра неоантигенов опухоли с последующим расчетом конструкции молекулы мРНК, синтезом ДНК-матрицы и самой молекулы мРНК, а также упаковки молекулы в систему доставки.

Определение неоантигенов опухоли

Одним из ключевых этапов в создании персонализированных мРНК-вакцин является определение неоантигенов, то есть уникальных антигенов, возникающих вследствие соматических мутаций в клетках опухоли. Неоантигены идентифицируют с использованием комплекса методов, включающего полногеномное или полноэкзомное секвенирование, РНК-секвенирование и специализированные биоинформатические пайплайны, позволяющие отобрать наиболее перспективные мишени для иммунотерапии [33, 34]. При этом ДНК-секвенирование дает возможность выявлять соматические мутации (миссенс, нонсенс, делеции, инсерции и др.), потенциально кодирующие неоэпитопы, а РНК-секвенирование подтверждает факт их экспрессии, что служит важным критерием отбора неоантигенов [35]. Кроме того, использование РНК-секвенирования позволяет исключить ложноположительные варианты, обнаруженные при анализе результатов ДНК-секвенирования, но не экспрессирующиеся в действительности [35]. Именно сопоставление данных ДНК- и РНК-секвенирования на практике дает более надежные результаты при формировании пула потенциальных неоантигенов [34].

После получения «сырых» данных проводится их предварительная обработка, включающая контроль качества (с помощью FastQC¹), фильтрацию и триммирование некорректных участков (Trimmomatic или Cutadapt) и выравнивание прочтений на референсный геном (Bowtie 2) [36–38]. Следующим шагом является детекция соматических мутаций в опухоли по сравнению с нормальными образцами, где применяются такие инструменты, как MuTect2 (из пайплайна GATK), Strelka или VarScan2 [39–41]. При этом рассчитывают частоту аллельных вари-

¹ Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. In: Babraham Bioinformatics [Internet]. Cambridge: Babraham Institute; 2004-. [cited 2024 Dec 15]. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

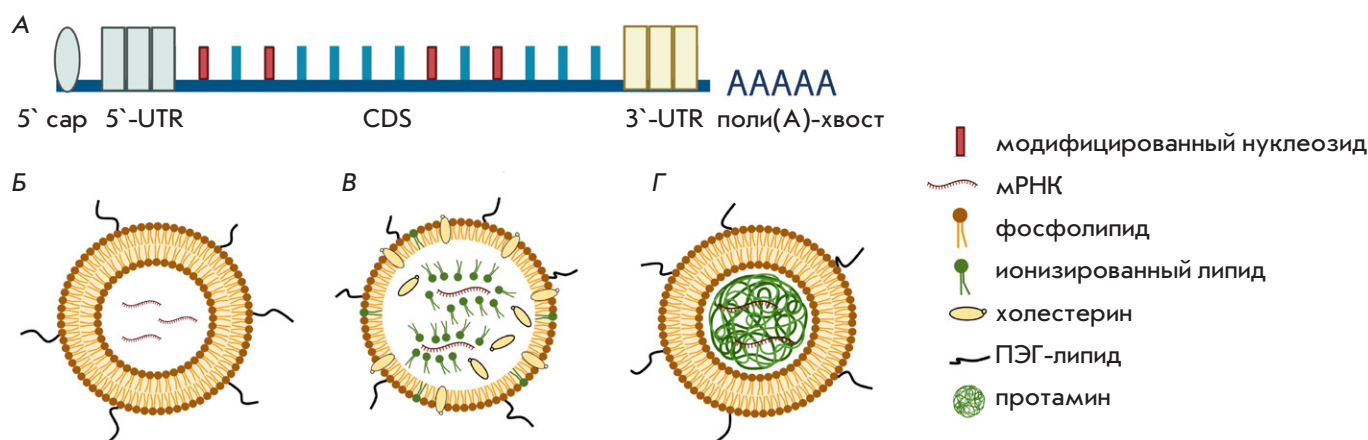


Рис. 3. Структурные компоненты мРНК-вакцины. А – композиция молекулы мРНК; Б – строение липосомы; В – строение липидной наночастицы; Г – строение липополиплекса. 5' cap – кэп, 5'-UTR и 3'-UTR – нетранслируемые участки, CDS – кодирующая последовательность

антов (VAF), отражающую долю мутаций в геноме опухолевых клеток [42]. Параллельно данные РНК-секвенирования анализируют при помощи пайплайнов STAR+RSEM, Salmon или Kallisto [43–46], что позволяет получить количественные показатели экспрессии – TPM (Transcripts Per Million) и FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads). Последние учитывают длину транскрипта и глубину секвенирования и применяются для корректного сравнения уровня экспрессии между транскриптами и образцами, что важно для оценки потенциальной иммуногенности [34].

На следующем этапе предсказывают неопитопы и оценивают их иммуногенность. Большое значение имеет определение HLA-генотипа пациента с использованием, например, алгоритма OptiType [47]. Также оценивается аффинность связывания мутантных пептидов с молекулами МНС I/II с помощью различных инструментов, среди которых наиболее популярны NetMHC и NetMHCpan, MHCflurry и IEDB [48–50]. Эти инструменты вычисляют IC₅₀, или процентильный ранг, позволяющий отобрать эпитопы с высокой предсказанной аффинностью (IC₅₀ < 500 нМ). Для более точной приоритизации учитывают уровень экспрессии мутантного транскрипта, частоту аллельных вариантов (VAF), уникальность мутантного пептида по сравнению с нативным белком и стабильность комплекса пептид–МНС [34]. В ряде случаев для валидации найденных неоантигенов применяют иммунопептидомику: прямое выделение комплексов пептид–МНС из опухолевых клеток с последующей масс-спектрометрией [51]. Этот подход более трудоемок, однако подтверждает реальное представление пеп-

тида на поверхности клеток. На практике же чаще используют *in silico* анализ, поскольку он дешевле и быстрее, что особенно важно в контексте персонализированных мРНК-вакцин [52]. Включение данных иммунопептидомики и интеграция функциональных тестов (таких, как активация Т-клеток *in vitro*) позволяет повысить объективность оценки иммуногенности [51].

Несмотря на сохраняющиеся сложности с предсказанием неопитопов, интеграция данных ДНК- и РНК-секвенирования с современными биоинформатическими и машинными алгоритмами создает надежную основу для их выявления и разработки эффективных персонализированных мРНК-вакцин [34].

Структура молекулы мРНК

Современные мРНК-вакцины разрабатываются с учетом оптимизации структуры молекулы мРНК, что обеспечивает ее высокую стабильность, эффективность и минимизацию нежелательных иммунных реакций [53]. При этом молекула мРНК имеет несколько обязательных элементов (5'-кэп, 5'-UTR, кодирующая последовательность, 3'-UTR и поли(А)-хвост), каждый из которых играет ключевую роль (рис. 3А) [53].

Для рационального проектирования структуры мРНК все шире применяются специальные вычислительные программы. Эти инструменты позволяют учитывать вторичную и третичную структуры мРНК, которые влияют на ее стабильность, иммуногенность и эффективность трансляции целевого антигена в АПК. Среди таких программ можно отметить RNAfold, NUPACK и mfold, обеспечивающие

прогнозирование энергетически стабильных структур и подбор оптимальных участков для включения модифицированных нуклеозидов [54–56].

Важнейшим элементом мРНК служит 5'-конец, снабженный кэпом (Cap), который защищает ее от деградации и способствует инициации трансляции (рис. 3А). Различают несколько типов кэпов: Cap0, Cap1, Cap2, m6Am Cap. Современные технологии, например, CleanCap, позволяют достичь степени кэпирования до 99%, что критически важно для синтеза целевого белка в АПК [53]. При производстве мРНК часто используют модифицированные нуклеозиды (псевдоуридин, 5-метилцитидин, N1-метилпсевдоуридин), которые повышают уровень экспрессии и снижают врожденную иммуногенность. За кэпом следует 5'-нетранслируемый регион (5'-UTR), влияющий на стабильность и эффективность трансляции.

Кодирующая последовательность (CDS), расположенная в центральной части молекулы, содержит информацию о целевом антигене. В противораковых мРНК-вакцинах это могут быть опухолеассоциированные антигены (ТАА) или неоантигены (TSA). Возможно кодирование сразу нескольких антигенов, что усиливает иммунный ответ [57, 58]. Оптимизация кодонов позволяет повысить скорость и точность трансляции, тем самым усиливая эффективность вакцины [57]. Заключительной частью структуры мРНК является 3'-нетранслируемая область (3'-UTR), регулирующая время «жизни» мРНК, и поли(А)-хвост, способствующий стабильности и продлению периода трансляции (рис. 3А) [53].

В дополнение к линейным молекулам мРНК разрабатывают самореплицирующиеся мРНК, которые включают элементы репликации вирусов, повышающие их копийность в клетках и тем самым уменьшающие необходимую дозу препарата мРНК [53]. Альтернативой являются кольцевые мРНК с замкнутой структурой, позволяющей мРНК дольше сохраняться в организме и обеспечивать более продолжительную экспрессию антигена [58]. Оба направления активно разрабатывают, учитывая возможность повышения эффективности и безопасности мРНК-вакцин [53, 58].

Системы доставки противоопухолевых мРНК-вакцин

Введенная в организм пациента молекула мРНК должна быть доставлена к АПК без потери своей целостности. Выбор оптимальной системы доставки мРНК является важным этапом производства мРНК-вакцин. К наиболее распространенным системам доставки мРНК относятся липидные платформы, которые включают липосомы, липидные

наночастицы (ЛНЧ) и липополиплексы (ЛПП), отличающиеся по структуре и функциональным особенностям (рис. 3Б–Г).

Липосомы состоят из билипидного слоя, формирующего внешнюю оболочку, внутри которой инкапсулируется мРНК. На поверхности липосом могут находиться молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), обеспечивающие стерическую стабилизацию и увеличение времени циркуляции в крови. ЛНЧ представляют собой более сложные и оптимизированные структуры, включающие ионизируемые липиды, фосфолипиды, холестерин и ПЭГ-липиды, что позволяет не только эффективно инкапсулировать мРНК, но и защищать ее от деградации и обеспечивать доставку в цитоплазму клеток [59]. ЛНЧ успешно применяются в противораковых мРНК-вакцинах, демонстрируя высокую стабильность и эффективность доставки [53, 60].

Эффективность липидных платформ доставки зависит от ряда факторов, таких как размер, заряд, липидный состав, фазовое состояние мембраны, способ локализации антигена и наличие иммуномодулирующих компонентов.

Размер частиц влияет на характер транспорта в лимфоузлы и тип иммунного ответа: мелкие частицы (<200 нм для липосом и до 100 нм для ЛНЧ) быстрее проникают в лимфоидные органы и активируют резидентные дендритные клетки, способствуя Th2-ответу, тогда как крупные (>500 нм для липосом и >100 нм для ЛНЧ) дольше задерживаются в месте инъекции, формируя депо и стимулируя Th1-ответ [60–63].

Заряд частиц также играет важную роль: катионные частицы, например, на основе диоктадецилдиметиламмония бромида (DDA), активно поглощаются АПК, способствуют кросс-презентации и активации CD8⁺ Т-лимфоцитов, тогда как нейтральные и анионные липосомы преимущественно индуцируют гуморальный иммунитет [64, 65]. В ЛНЧ ионизируемые липиды при низких значениях pH в эндосомах приобретают положительный заряд, облегчая выход мРНК в цитоплазму [66].

Фазовое состояние билипидного слоя определяет способность липосом к слиянию с клеточными мембранами и внутриклеточному высвобождению антигена. Жидкокристаллические липосомы облегчают кросс-презентацию через МНС I, тогда как более жесткие липосомы вызывают выраженный Th1-ответ *in vivo* [66–68]. Холестерин, входящий в состав мембраны, повышает стабильность липосом и может усиливать или снижать активацию компонента в зависимости от заряда и размера [66, 69].

Добавление в состав частиц иммуномодулирующих компонентов, таких как лиган-

ды Toll-подобных рецепторов, например, CpG-олигонуклеотиды (CpG-ОДН), поли(I:C), синтетические гликолипиды и цитокины, позволяет направить иммунный ответ по нужному типу воспаления. Так, CpG-ОДН, распознаваемые TLR9 и трегалоза-6,6'-дибехенатом (TDB), способствуют индукции Th1-ответа, сопровождающегося продукцией IFN- γ [70–73]. Поли(I:C), имитирующий вирусную двухцепочечную РНК и активирующий TLR3, усиливает перекрестную презентацию антигена и стимулирует развитие ответа цитотоксических Т-лимфоцитов [74, 75]. Кроме того, комбинация TDB с липидами, такими как DDA, может приводить к активации Th17-ответа и продукции IL-17 [67, 76–78].

Показано, что инкапсулированные антигены эффективно поступают во внутриклеточные компартменты АПК, где подвергаются обработке и представлению через молекулы МНС как класса I, так и класса II, обеспечивая активацию CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов [68]. В то же время антигены, ассоциированные с поверхностью липосом, обладают меньшей способностью к внутриклеточной обработке, но могут быть доступны для прямого распознавания В-лимфоцитами через BCR-рецепторы, способствуя формированию гуморального ответа [68, 79].

Липополиплексы (ЛПП) представляют собой гибридные системы, комбинирующие катионные липиды, такие как DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан), и полимеры, такие как протамин, для формирования стабильных комплексов с мРНК [80]. Липиды обеспечивают защиту мРНК и способствуют ее доставке через клеточные мембраны, а полимеры усиливают компактизацию мРНК, повышая стабильность комплекса. ЛПП обладают высокой стабильностью *in vitro* и эффективно доставляют мРНК, включая самореплицирующиеся, к дендритным клеткам, вызывая сильный иммунный ответ. Показано, что ЛПП, используемые для доставки мРНК, кодирующих неоантигены, индуцируют мощные Т-клеточные ответы и проявляют противоопухолевую активность в мышечных моделях [80].

Помимо липидных платформ, для доставки мРНК в АПК применяют полимерные наночастицы, дендримеры, пептидные комплексы, струйную инъекцию, электропорацию и вирусные векторы.

Полимерные наночастицы, такие как поли(β -аминоэфир), представляют собой биodeградируемые полимеры, содержащие amino- и эфирные группы в своей структуре, что обеспечивает их способность связывать мРНК через электростатические взаимодействия. Гибкость в модификации полимер-

ных наночастиц позволяет варьировать молекулярную массу, степень разветвленности и химический состав полимера, оптимизируя заряд, размер частиц и их способность защищать мРНК от ферментативной деградации [53].

Дендримеры – это высокоразветвленные полимерные молекулы с древовидной структурой. В центре дендримера находится небольшое ядро, представляющее собой небольшую молекулу или ион, от которого начинают отходить повторяющиеся мономерные звенья, формируя несколько слоев ветвления. На наружной поверхности дендримера расположены функциональные группы, такие как амины или гидроксильные группы, которые обеспечивают возможность связывать и защищать мРНК [53]. Пептидные комплексы состоят из мРНК, связанной с катионными пептидами, такими как протамин, которые образуют плотные наночастицы за счет электростатического взаимодействия между положительно заряженными пептидами и отрицательно заряженной мРНК, защищая ее от деградации и способствуя проникновению в клетки [53].

Струйная инъекция позволяет доставлять «голую» мРНК без носителей, используя такие струйные инжекторы, как PharmaJet или Bioject. Устройства лишены игл и под высоким давлением (до 1000 бар) пропускают мРНК через кожу в подкожно-жировую клетчатку или мышечную ткань. Механизм проникновения мРНК в клетки основан на временном нарушении целостности клеточных мембран за счет механического стресса, вызванного высокоскоростной струей, что позволяет мРНК достигать цитоплазмы АПК [81]. Исследования показывают, что введение мРНК этим методом может вызывать врожденный иммунный ответ, сопоставимый с тем, что индуцируют ЛНЧ [81].

Электропорация используется преимущественно для *ex vivo* доставки мРНК в дендритные клетки или другие иммунные клетки, которые затем вводятся в организм. Этот метод предполагает применение электрических импульсов для временного повышения проницаемости клеточных мембран, что облегчает проникновение мРНК. Электропорация эффективна для активации иммунного ответа, но ее применение *in vivo* ограничено из-за риска повреждения тканей и сложности реализации [53].

Вирусные векторы, чаще используемые для доставки самореплицирующейся мРНК, состоят из модифицированного вирусного генома, содержащего мРНК или самореплицирующуюся мРНК, а также белкового капсида или липидной оболочки, которые обеспечивают проникновение в клетки. Часто

используются аденовирусы, лентивирусы или альфа-вирусы, модифицированные для экспрессии опухолевых антигенов. Самореплицирующаяся мРНК включает элементы вирусной репликации, усиливающие трансляцию антигенов в клетках, снижая необходимую дозу мРНК-вакцины и повышая иммунный ответ. Вакцины на основе вирусных векторов разрабатываются для лечения различных видов рака, включая HPV-ассоциированные опухоли, и показывают высокую эффективность в доклинических исследованиях [82].

Хранение и транспортировка препаратов с мРНК

Иммунобиологические лекарственные препараты, к которым относятся все известные вакцины, хранят при температуре от +2°C до +8°C¹. Исключение составляют вакцины на основе мРНК, которые относятся к биотехнологическим лекарственным препаратам (БТЛП), имеющим свои особенности хранения и транспортировки². К примеру, мРНК-вакцина компании Pfizer стабильна в течение 6 месяцев при температуре –80°C и только 5 дней при температуре +2... +8°C. Вакцина компании Moderna может храниться на протяжении 6 месяцев при температуре –20°C и 30 дней при 2–8°C [83].

Для хранения и транспортировки мРНК-вакцин необходим строгий контроль температуры, установленный производителем, и специальное оборудование, такое как холодильные и морозильные камеры, холодильные боксы и переноски вакцин, способные держать температуру –80°C и соответствующие стандартам эффективности, определенным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [84].

Одним из новейших вариантов доставки мРНК в организм пациента является использование чипов с микроиглами [84]. Этот способ позволяет хранить и транспортировать препарат с мРНК при комнатной температуре в течение нескольких месяцев. Однако такой способ пока апробирован только для противинфекционных мРНК-вакцин, а сложность технологии производства чипов создаст трудности при разработке индивидуальных противоопухолевых вакцин.

¹ Общая фармакопейная статья (ОФС) 1.7.1.0018.18, утвержденная Приказом Минздрава России № 749 от 31.10.2018. Режим доступа: <https://pharmascopeia.regmed.ru/pharmascopeia/izdanie-14/1/1-7/1-7-1/> Дата обращения: 25.02.2024.

² Постановление Правительства РФ № 213 от 24.02.2025 г. «О биотехнологических лекарственных препаратах, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением и специально изготовленных для конкретного пациента непосредственно в медицинской организации, в которой применяется такой биотехнологический лекарственный препарат, имеющих в своем составе соединения, синтезированные по результатам генетических исследований материала, полученного от пациента, для которого изготовлен такой биотехнологический лекарственный препарат». Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/157884/> Дата обращения: 25.02.2025.

Все перечисленные особенности транспортировки приводят к определенным сложностям дальнейшей реализации мРНК-вакцин, однако не делают их применение невозможным в клинической практике. Одним из путей разрешения может стать производство и применение препарата на территории одного учреждения, что в настоящее время регламентируется на территории Российской Федерации постановлением о БТЛП, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением, от 24 февраля 2025 года № 213.

Способы введения противоопухолевых мРНК-вакцин

Выбор способа введения важен для терапевтической эффективности и безопасности мРНК-вакцины для организма в целом. Пути введения имеют разные характеристики и влияют на распределение вакцины в организме, тип активируемых иммунных клеток и, как следствие, на силу и продолжительность ответа. Введение мРНК-вакцин может быть внутрикожным, подкожным, интраназальным, интранодальным, внутрибрюшинным, внутримышечным и внутривенным. В современных клинических испытаниях наиболее часто применяют внутривенное, внутримышечное и подкожное введение мРНК-вакцин.

При внутривенном введении препарат попадает в системный кровоток, распространяясь по органам и тканям, быстро достигая АПК. Этот способ обеспечивает возможность введения значительных объемов вакцины и допускает повторные процедуры для поддержания высокого уровня противоопухолевого иммунитета [58]. Данные клинических исследований вакцины цевумеран компании BioNTech SE, вводимой внутривенно, подтвердили безопасность, хорошую переносимость и эффективность стимуляции иммунного ответа, направленного против раковых клеток [32, 85]. Тем не менее при этом способе введения возможно развитие лихорадочного генерализованного синдрома и гриппоподобных явлений, а также существует риск системной токсичности, который важно учитывать при планировании исследований. В силу специфического строения сосудистой сети печени и механизма рецепторопосредованного захвата гепатоцитами мРНК-вакцины обладают повышенной тропностью к этому органу, что может привести к иммуноопосредованному гепатиту или гепатотоксичности [86]. При таком способе введения препарата необходимо учитывать соотношение вред–польза лечения, что накладывает ограничения на применение мРНК-вакцин.

Внутримышечное введение вакцин переносится легче, чем при внутривенном способе введения.

Благодаря хорошей васкуляризации мышечной ткани и наличию мигрировавших в ходе онтогенеза и привлеченных в место инъекции предшественников АПК, внутримышечного введения достаточно для индукции противоопухолевого иммунного ответа. К другим плюсам этого способа относятся гибкость в подборе вводимой дозы, возможность повторного введения для поддержания активности противоопухолевого иммунитета и сниженный риск побочных реакций в месте инъекции [87]. Единственными побочными эффектами при этом способе могут быть лихорадочные и гриппоподобные явления, которые корректируются противовоспалительными препаратами. Инкапсулированную в липидные наночастицы вакцину мРНК-4157 компании Moderna во всех клинических испытаниях вводили внутримышечно, показав при этом достаточную безопасность, а также вызвав клинические ответы у пациентов с меланомой и солидными опухолями [88, 89]. Внутримышечный путь, учитывая его многочисленные достоинства, широко используется для введения уже одобренных противoinфекционных мРНК-вакцин, в том числе и профилактических препаратов против SARS-CoV-2 [90–93].

Внутрикожный и подкожный способы введения мРНК могут быть реализованы как с помощью классического способа с помощью шприца, так и с использованием микроципов или струйной инъекции [81, 84]. Введение мРНК-вакцин внутрикожно стимулирует иммунный ответ типа Th1, что объясняется высокой концентрацией АПК в слоях дермы и эпидермиса и благоприятным микроокружением для переноса антигенов [94]. Хотя данный способ позволяет использовать меньшие объемы препарата, он нередко приводит к местным нежелательным реакциям, таким как припухлость, болезненность, гиперемия и зуд [95, 96]. В отличие от этого, подкожный метод введения характеризуется меньшим количеством АПК в подкожной жировой клетчатке, что требует увеличения дозировки и использования нескольких точек инъекции. Однако медленная скорость всасывания при подкожном введении может способствовать разрушению молекул мРНК, снижая эффективность лечения [97]. Тем не менее данный путь введения применялся в испытаниях вакцин на основе мРНК ранее и активно используется в клинических исследованиях, проводимых в Китае (NCT03908671, NCT05949775, NCT05761717) [80, 98, 99].

Интраназальный путь доставляет молекулу мРНК в АПК периферических лимфатических сосудов, а внутринодальный – в лимфатические АПК. При этом реализация этих методов сложна и имеет ограничения по объемам вводимого препарата [100].

Внутрибрюшинный способ имеет аналогичные ограничения и чаще используется для доставки мРНК-вакцин, кодирующих костимулирующие молекулы иммунитета [101].

При выборе способа введения необходимо принимать во внимание тип мРНК-вакцины. К примеру, для обеспечения эффективности доставки нативной мРНК *in vivo* чаще используют внутрикожный или интранодальный пути из-за предположения о способности незрелых дендритных клеток, локализованных в дерме и лимфатических узлах, поглощать мРНК путем микропиноцитоза [102].

Липидные наночастицы как популярный инструмент доставки совместимы практически со всеми известными способами введения. Тем не менее при внутримышечном и внутрикожном введении трансляция мРНК продолжается дольше всего – период полураспада превышает 20 ч, а при внутривенном составляет 7 ч [103]. Для определения наилучшего способа доставки вакцины Фан и соавт. сравнили противоопухолевый эффект и иммуногенность внутримышечного, внутрикожного и подкожного введения препарата LPP-CT26 на мышцах CT26-luc с метастазами в легкие [80]. Мыши, получавшие препарат подкожно, имели меньше метастатических очагов в легких, повышенный уровень секреции IFN- γ и большую противоопухолевую эффективность при увеличении мест введения без изменения дозы по сравнению с двумя другими группами. Это еще раз доказывает влияние оптимизации способа введения мРНК-вакцины на противоопухолевый ответ.

Таким образом, способ введения мРНК-вакцины является одним из ключевых факторов, определяющих ее эффективность и безопасность. Каждый путь введения обладает своими преимуществами и недостатками, влияя на распределение препарата в организме, активацию иммунных клеток и, как следствие, силу и продолжительность иммунного ответа. Внутривенное введение обеспечивает системное распределение, но сопряжено с риском токсичности и высокой тропностью к печени. Внутримышечное введение, благодаря своей простоте и безопасности, остается наиболее популярным, обеспечивая гибкость в дозировании и возможность повторных инъекций. Внутрикожное введение стимулирует мощный иммунный ответ типа Th1, но может вызывать местные реакции. Подкожный путь, напротив, требует увеличения дозы из-за медленной абсорбции. Оптимизация способа, дозы и кратности введения с учетом типа мРНК-вакцины и системы доставки является необходимым условием для достижения максимального противоопухолевого эффекта и минимизации побочных реакций.



Рис. 4. Этапы испытаний противоопухолевой мРНК-вакцины, необходимые для регистрации препарата

Дальнейшие исследования в этой области позволят разработать персонализированные стратегии вакцинации, направленные на получение клинического ответа и сведение к минимуму побочных реакций.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ мРНК-ВАКЦИН

Противоопухолевые мРНК-вакцины разрабатывают в настоящее время во многих странах и большинство исследований успешно перешли от доклинических испытаний к клиническим (табл. 1). Для регистрации противоопухолевой мРНК-вакцины в качестве препарата для лечения рака необходимо успешно пройти три фазы клинических испытаний, последняя из которых самая продолжительная (рис. 4).

Доклинические испытания мРНК-вакцин включают оценку безопасности и иммунологических свойств в условиях *in vitro* и/или *ex vivo* и *in vivo* на животных моделях. Успех доклинических исследований позволяет перейти к I фазе клинических испытаний, где определяется терапевтическая доза и оценивается предварительная эффективность препарата при лечении пациентов. Эта фаза обычно проводится на здоровых добровольцах, но в случае

противоопухолевых мРНК-вакцин исследования начинают сразу с целевых пациентов, что приводит к объединению фаз I и IIa (NCT06307431, NCT06305767), а также к появлению стадий увеличения и расширения дозы [104, 105]. В фазе II можно выделить пилотную IIa фазу, в рамках которой оценивают краткосрочную безопасность, устанавливают режим дозирования, выясняют зависимость эффекта от дозы и определяют критерии оценки эффективности, и контролируемую более обширную IIb фазу, нужную для определения эффективности, безопасности и оптимального уровня доз препарата, а также принятия решения о переходе на следующую фазу. На втором этапе необходима группа сравнения, получающая стандартную терапию. Самая длительная и дорогостоящая III фаза представляет собой рандомизированное контролируемое двойное слепое многоцентровое исследование с обязательным наличием контрольной группы, что позволяет оценивать эффективность и безопасность на большом числе пациентов. Успешное завершение этого этапа позволяет направить досье препарата в уполномоченный орган для регистрации. При этом в случае персонализированных мРНК-вакцин регистрируют не каждый конкретный препарат, а технологии его производства. Более того, в Российской

Таблица 1. Клинические испытания персонализированных противоопухолевых мРНК-вакцин за 2021–2025 гг.

Название препарата	Страна, спонсоры	Идентификатор исследования	Фаза	Статус, годы исследования	Локализация опухоли	Применяемое лечение	Результаты исследования
мРНК-4157 (V940)	США, Moderna, MSD	NCT03313778 (KEYNOTE-603)	I	Открыто, набор активен 2017–2025 гг.	Любые злокачественные новообразования с MSI-H или другими dMMR	Три группы: монотерапия мРНК-4157, комбинация с пембролизумабом, комбинация с пембролизумабом и химиотерапией	У всех пациентов (n=33) были зарегистрированы неантиген-специфические Т-клеточные ответы; отсутствовали побочные реакции ≥ 3 -й степени
		NCT03897881 (KEYNOTE-942)	II	Открыто, набор активен 2019–2029 гг.	Меланома высокого риска (стадии IIIB-D или IV)	Две группы: комбинация мРНК-вакцины с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	При медиане наблюдения 18 мес. безрецидивная выживаемость составила 79% (комбинированная терапия, n=107) против 62% (монотерапия, n=50)
		NCT06307431 (INTerrath-004)	I–II	Открыто, набор активен 2024–2032 гг.	Почечно-клеточная карцинома после хирургической резекции	Три группы: монотерапия мРНК-4157, комбинация с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	Нет
		NCT06305767 (INTerrath-005)	I–II	Открыто, набор активен 2024–2031 гг.	Мышечно-инвазивная карцинома после хирургической резекции	Три группы: комбинация мРНК-4157 с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля), комбинация с пембролизумабом, энфортумаб ведогином и операцией	Нет
		NCT06295809 (INTerrath-007)	III	Открыто, набор активен 2024–2033 гг.	Резектабельный местно-распространенный операбельный плоскоклеточный рак кожи	Три группы: комбинация мРНК-4157 с пембролизумабом и операцией, операция и лучевая терапия, монотерапия пембролизумабом с операцией	Нет
Цевумеран (RO7198457)	США, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Genentech	NCT05933577 (INTerrath-001)	III	Активно, без набора 2023–2030 гг.	Меланома II–IV стадии	Две группы: комбинация мРНК-4157 с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	Нет
		NCT06077760 (INTerrath-002)	III	Открыто, набор активен 2023–2035 гг.	Резецированный немелкоклеточный рак легкого II, IIIA, IIIB (N2) стадий		Нет
		NCT04161755	I	Активно, без набора 2019–2025 гг.	Рак поджелудочной железы после хирургической резекции	Последовательное лечение: цевумеран, атзолизумаб и затем химиотерапия по схеме mFOLFIRINOX	Ответ на лечение наблюдался у 50% пациентов (n=8). Безрецидивная выживаемость у 75% (n=6) ответивших на лечение пре-высыла 38 мес. Медиана безрецидивной выживаемости не ответивших на лечение (n=8) составила 134 мес.

Название препарата	Страна, спонсоры	Идентификатор исследования	Фаза	Статус, годы исследования	Локализация опухоли	Применяемое лечение	Результаты исследования
Цефумеран (RO7198457)	США, BioNTech, Genentech	NCT03289962 (GO39733)	I	Активно, без набора 2017–2025 гг.	Местно-распространенные или метастатические солидные опухоли	Две группы: монотерапия цефумераном, комбинация с атезолизумабом	У 71% пациентов были зарегистрированы неонатиген-специфические Т-клеточные ответы; у 90% пациентов, получавших монотерапию, и 92% пациентов, получавших комбинированную терапию, отсутствовали побочные реакции \geq 3-й степени
		NCT03815058 (IMCODE001)	II	Активно, без набора 2019–2025 гг.	Метастатическая или неоперабельная местнораспространенная меланома ППС/Д стадии	Две группы: комбинация цефумерана с пембролизумабом, монотерапия пембролизумабом (группа контроля)	Нет
		NCT05968326 (IMCODE003)	II	Открыто, набор активен 2023–2029 гг.	Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы после хирургической резекции	Две группы: комбинация цефумерана с атезолизумабом и химиотерапией mFOLFIRINOX, химиотерапия mFOLFIRINOX	Нет
		NCT06534983 (IMCODE004)	II	Открыто, набор активен 2024–2034 гг.	Мышечно-инвазивная уротелиальная карцинома высокого риска после хирургической резекции	Две группы: комбинация цефумерана с ниволумабом, монотерапия ниволумабом	Нет
		NCT04486378 (BNT122-01)	II	Открыто, набор активен 2021–2030 гг.	Рак прямой кишки П/III стадии или рак толстой кишки П/III стадии	Две группы: монотерапия цефумераном, без лечения (выжидательная тактика)	Нет
STZD-1801	Китай, Stemirna Therapeutics	NCT03908671	I	Открыто, набор активен 2019–2025 гг.	Распространенный рак пищевода (ППС, IV) и немелкоклеточный рак легкого (стадии IIIB–IV)	Монотерапия мРНК-вакциной	Нет
SW1115C3		NCT05198752 (SWP1001-06)	I	Неизвестен 2022–2024 гг.	Распространенные солидные опухоли		У всех пациентов (n=2) наблюдался ответ на лечение. Безрецидивная выживаемость первого пациента 8,4 мес., второго – более 12 мес.
2020-06-mRNA-COM		NCT05949775	Нет	Открыто, нет набора 2023–2026 гг.	Распространенные солидные опухоли	Комбинация мРНК-вакцины с стинтилизумабом	Нет
2021-10-mRNA-COM		NCT05761717	Нет	Открыто, нет набора 2023–2025 гг.	Гепатоцеллюлярная карцинома в послеоперационном рецидиве	Комбинация мРНК вакцины с стинтилизумабом	Нет

Название препарата	Страна, спонсоры	Идентификатор исследования	Фаза	Статус, годы исследования	Локализация опухоли	Применяемое лечение	Результаты исследования
PGV002	Китай, NeoCura	NCT05192460 (XKY-1005)	Ранняя I	Открыто, набор активен 2022–2025 гг.	Распространенный рак желудка, пищевода или печени	Две группы: монотерапия мРНК вакциной, комбинация с PD-1/L1-антителом	Нет
Personalized neoantigen tumor vaccine		NCT05359354 (XKY-1007)	Нет		Распространенные солидные опухоли		Нет
iNeo-Vac-R01	Китай, Hangzhou Neoantigen Therapeutics Co., Ltd.	NCT06019702 (SRRSH2023-755-01)	I	Открыто, набор активен 2023–2027 гг.	Распространенные новообразования пищеварительной системы	Монотерапия мРНК-вакциной	Нет
		NCT06026800 (SRRSH2023-755-02)				Стандартная терапия первой линии, затем – монотерапия мРНК-вакциной	Нет
		NCT06026774 (SRRSH2023-755-03)				Комбинация со стандартной адъювантной терапией	
EVM16	Китай, Everest Medicines	NCT06541639 (EVM16CX01)	I	Открыто, набор активен 2023–2027 гг.	Любые распростра- ненные или рециди- вирующие солидные опухоли	Две группы: монотерапия мРНК-вакциной, комбинация с тисселизумабом	Нет
SJ-Neo006	Китай, Jiangsu Synthgene Biotechnology	NCT06326736	Ранняя I	Открыто, набор активен 2024–2026 гг.	Резектабельная про- токовая аденокарци- нома поджелудочной железы	Комбинация с камрелизума- бом и химиотерапией	Нет
mRNA tumor vaccines	Китай, Shanghai Regenelead Therapies	NCT06156267	Ранняя I	Открыто, нет набора 2024–2027 гг.	Аденокарцинома под- желудочной железы после хирургической резекции	Комбинация с адебрели- мабом и химиотерапией mFOLFIRINOX	Нет
		NCT06735508 (NSCLC-III- RGL)	Ранняя I	Открыто, нет набора 2025–2026 гг.	Немелкоклеточный рак легкого после хирургической резекции	Комбинация с адебрелимабом	Нет
XP-004 Personalized mRNA Tumor Vaccine	Китай, Shanghai Xipu BioTechnology Company Limited	NCT06496373 (2023PCV004)	I	Открыто, набор активен 2024–2027 гг.	Рецидивирующий рак поджелудочной железы	Комбинация с PD1-антителом	Нет

Таблица 2. Ингибиторы иммунных контрольных точек, применяемые в клинической практике

Молекула, на которую направлен препарат	Международное название препарата	Торговое название препарата	Онкологические заболевания
CTLA-4	Ипилимумаб	Ервой	Неоперабельная или метастатическая меланома, почечно-клеточный рак, колоректальный рак, гепатоцеллюлярный рак, немелкоклеточный рак легкого
	Тремелимуаb	Имджудо	
	Нурулимаb	Нурдати	
PD-1	Пролголимаb	Фортека	Меланома, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак желудка, рак молочной железы, рак предстательной железы, опухоли головы и шеи, рак яичников
	Пембролизумаb	Китруда, Пемброния	
	Ниволумаb	Опдиво	
	Камрелизумаb	Арейма	
PD-L1	Атезолизумаb	Тецентрик	Рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, метастатическая меланома, карцинома Меркеля, уротелиальный и почечно-клеточный рак
	Авелумаb	Бавенсио	
	Дурвалумаb	Имфинзи	

Федерации допустимо клиническое испытание персонализированных противоопухолевых мРНК-вакцин, относящихся к БТЛП, после доказательства их эффективности и безопасности и без проведения доклинических исследований¹.

Персонализированные мРНК-вакцины в современных исследованиях применяют в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунитета (ИКТ), поскольку они помогают активированным Т-лимфоцитам распознавать неоантигены опухолевых клеток и реализовывать полноценный противоопухолевый иммунный ответ. Сегодня класс препаратов ИКТ, достаточно распространенный в практике онкологов, включает моноклональные антитела против цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена-4 (CTLA-4), рецептора программируемой клеточной гибели (PD-1) и его лиганда (PD-L1) (табл. 2). CTLA-4, PD-1 и PD-L1 – это поверхностные рецепторы Т-клеток, необходимые для их негативной регуляции [106]. Опухолевые клетки используют эти молекулы для истощения Т-клеток и «ускользания» от иммунного ответа. ИКТ направлены на блокировку этого механизма и восстановления подавленного опухолью иммунного ответа [107, 108].

¹Постановление Правительства РФ № 213 от 24.02.2025 г. «О биотехнологических лекарственных препаратах, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением и специально изготовленных для конкретного пациента непосредственно в медицинской организации, в которой применяется такой биотехнологический лекарственный препарат, имеющих в своем составе соединения, синтезированные по результатам генетических исследований материала, полученного от пациента, для которого изготовлен такой биотехнологический лекарственный препарат». Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/157884/> Дата обращения: 25.02.2025.

Монотерапия ИКТ выступает в качестве группы сравнения при исследованиях комбинации мРНК-вакцин с ИКТ (NCT03897881, NCT05933577, NCT03289962, NCT03815058) или монотерапии мРНК-вакциной (NCT03289962, NCT05192460, NCT05359354, NCT06541639). Существует также сравнение монотерапии мРНК-вакциной с группами, где пациенты получают стандартную конвенциональную терапию, соответствующую выбранному типу рака (NCT06295809, NCT04486378, NCT06026800). Потенциальный успех комбинации ИКТ с мРНК-вакцинами ожидают в клинических исследованиях, проводящихся на пациентах с терминальной стадией заболевания, у которых традиционные методы лечения оказались неэффективными (NCT03815058, NCT03289962, NCT05949775, NCT05192460, NCT05359354, NCT06541639).

Исследования, проводимые в странах Евросоюза и США

Вакцина мРНК-4157. В 2017 году компания Moderna (США) запустила фазу I клинического испытания персонализированной вакцины мРНК-4157 (NCT03313778) (рис. 2). На первом этапе пациенты с резецированными (часть А) и неоперабельными (часть В) солидными опухолями получали четыре дозы монотерапии мРНК-4157 внутримышечно или комбинированной терапии с пембролизумабом по схемам постепенного повышения дозы с 0.04 до 1 мг. В ходе этапа расширения дозы группа была поделена на три части: участники с неоперабельными, местнораспространенными или метастатическими солидными опухолями (части В и С) и резецирован-

ной меланомой кожи (часть D). Им было рекомендовано применение 1 мг мРНК-4157 в комбинации с пембролизумабом и/или химиотерапией. В 2019 году были опубликованы первые результаты, согласно которым безопасность препарата подтверждалась отсутствием у всех 33 пациентов краткосрочных тяжелых побочных реакций (≥ 3 -й степени), а иммуногенность – наличием у каждого пациента полифункциональных неоантиген-специфических Т-клеток в ответ на целевые неоантигены. Из 13 пациентов, получавших адъювантную монотерапию мРНК-4157, 92,3% не имели признаков заболевания при медиане наблюдения 8 месяцев. Оставшиеся 20 пациентов получали комбинированное лечение, состоящее из мРНК-вакцины и пембролизумаба, и 14 из них ответили на комбинированную терапию: в половине случаев регистрировалась частичная ремиссия или стабилизация заболевания, в другой половине наблюдали прогрессирование заболевания или иммуносупрессию. Таким образом, мРНК-4157 была безопасна и хорошо переносилась при всех протестированных уровнях дозы. Представленные результаты показали эффективность алгоритма подбора целевых неоантигенов и акцентировали внимание на перспективности клинического использования стратегии индивидуализированной терапии неоантигенной мРНК-вакциной, что подтвердило возможность перехода мРНК-4157 ко II фазе клинических испытаний [109].

На конференции Общества иммунотерапии опухолей (Сан-Диего, Калифорния, США), прошедшей в ноябре 2023 года, результаты применения мРНК-4157 были дополнены. При оценке безопасности и переносимости у всех пациентов наблюдалось ≥ 1 нежелательное явление, возникшее в процессе лечения; нежелательных явлений четвертой или пятой степени тяжести, ограничивающих дозу, зафиксировано не было. Самыми частыми побочными явлениями были усталость (67%), лихорадка (60%) и боль в месте инъекции (40%). У всех пациентов были зарегистрированы Т-клеточные ответы, 85% которых идентифицированы как ответы *de novo*. Причем наибольшая амплитуда таких ответов наблюдалась после начала комбинированной терапии с пембролизумабом. Также отметили, что высокий процент иммунных ответов на комбинацию мРНК-4157 с пембролизумабом у пациентов ассоциирован с активированным фенотипом Т-клеток, а низкий – с распространенностью фенотипа наивных Т-клеток [89]. Исследование мРНК-4157 продолжается и является основой для этапов, включающих группы больных с опухолями других локализаций.

В 2019 году было запущено исследование KEYNOTE-942 (фаза II) эффективности индиви-

дуализированной вакцины мРНК-4157 у пациентов с меланомой стадий IIIB-D и IV после полной хирургической резекции с высоким риском рецидива (NCT03897881). Пациенты получали комбинированную терапию мРНК-4157 с пембролизумабом ($n = 107$) или монотерапию пембролизумабом ($n = 50$). Вакцину мРНК-4157 (1 мг) вводили внутримышечно 9 раз с периодичностью в 3 недели, а пембролизумаб (200 мг) – внутривенно каждые 3 недели на протяжении 18 циклов. При минимальном сроке наблюдения 14 месяцев в группе пациентов, прошедших полный курс лечения, у 22% (24/107) пациентов в группе комбинированного лечения и у 40% (20/50) пациентов на монотерапии зафиксированы неблагоприятные исходы (рецидивы или смерть). Безрецидивная выживаемость в группе комбинированной терапии была лучше, чем в группе, получавшей монотерапию (83 против 77% в течение 12 месяцев и 79 против 62% в течение 18 месяцев). Случаи отдаленного рецидива или смерти через 24 месяца отмечены у 8% пациентов после комбинированной терапии и 24% пациентов на монотерапии [110].

Обнадеживающие результаты применения вакцины мРНК-4157 компаний Moderna и Merck & Co (США) позволили перейти к исследованиям NCT06307431 и NCT06305767, начатым в 2024 году. Предполагается, что терапия мРНК-4157 в комбинации с пембролизумабом будет эффективнее монотерапии пембролизумабом при почечно-клеточном раке (NCT06307431) и стандартного лечения при мышечно-инвазивном уротелиальном раке (NCT06305767). Эти испытания охватывают от 8 до 15 стран и продлятся до 2031–2032 годов. Кроме того, в начале 2025 года компания Moderna в партнерстве с Merck & Co (США) начала проведение III фазы клинических испытаний вакцины мРНК-4157 в комбинации с пембролизумабом для лечения плоскоклеточного рака кожи (NCT06295809), меланомы (NCT05933577) и немелкоклеточного рака легкого (NCT06077760). В каждом исследовании принимает участие от 20 до 33 стран, а количество пациентов составляет от 868 до 1089 человек.

Цевумеран. Компаниями BioNTech (Германия) и Genentech (США) в 2017 году были запущены клинические испытания фазы I мРНК-препарата цевумеран (NCT03289962) для лечения пациентов с меланомой, раком головы и шеи, колоректальным раком, немелкоклеточным раком легкого, раком мочевого пузыря и другими прогрессирующими солидными опухолями (рис. 2). Оценивали безопасность, иммуногенность и предварительную эффективность монотерапии ($n = 30$) и комбинации с атезолизума-

бом ($n = 183$) у пациентов, получавших предшествующую терапию. Согласно данным по безопасности, 9 из 30 пациентов, получавших монотерапию цевумераном, и 47 из 183 пациентов, получавших комбинированную терапию с атезолизумабом, прекратили лечение в связи с прогрессированием заболевания. У 90% пациентов, получавших монотерапию цевумераном, зафиксированы побочные эффекты: у 3 пациентов они были классифицированы как 3-я степень, у остальных 24 – 1-я или 2-я степень. Отмечено одно явление дозолимитирующей токсичности 3 степени при монотерапии 100 мкг цевумерана, однако пациент после устранения побочных эффектов продолжил участие в исследовании на условии сниженной дозы до прогрессирования заболевания на 82 день. При сочетанном применении цевумерана и атезолизумаба зарегистрированы три нежелательных явления 4-й или 5-й степени, позднее 11 пациентов прекратили лечение из-за нежелательных иммуноопосредованных реакций, преимущественно в группе монотерапии атезолизумабом. У остальных участников лечение проходило с минимальными побочными эффектами, самыми распространенными из которых были инфузионные реакции (56.7 и 59.6% при монотерапии и комбинированной терапии соответственно), синдром высвобождения цитокинов (30 и 20.8%) и гриппоподобные явления (3.3 и 12.6%). При оценке предварительной эффективности у 71% пациентов были зафиксированы полиэпитопные неоантиген-специфические реакции, охватывающие $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки и сохранявшиеся до 23 месяцев. При этом, $CD8^+$ Т-клетки, специфичные для нескольких неоантигенов, составляли в среднем 7.3% циркулирующего пула $CD8^+$ Т-клеток, а также обнаруживались в опухолевых очагах, составляя до 7.2% от общего числа опухоль-инфильтрирующих Т-клеток. Из-за ограниченного объема и неоднородности выборок по каждому типу опухоли получить статистически значимые результаты о взаимосвязи между клиническим эффектом и иммунным ответом не удалось. У пациента с микросателлитно-стабильным раком прямой кишки (низкий уровень PD-L1) достигнут полный ответ на комбинированную терапию аутологичным цевумераном (9 доз по 38 мкг) и атезолизумабом продолжительностью 8.2 месяца. Пациентка с высокодифференцированным раком молочной железы (высокий уровень PD-L1) по причине прогрессирования опухоли на фоне экспериментального лечения ниволумабом была переведена на аутологичный цевумеран в дозе 38 мкг и атезолизумаб, что привело к частичному ответу с уменьшением размеров метастазов в легких на протяжении 9.9 месяца. Полученные результаты позволили

обосновать целесообразность дальнейшего изучения цевумерана и инициировали новые клинические испытания I–II фаз [111].

В 2019 году BioNTech (Германия) совместно с Genentech (США) запустили I фазу клинических испытаний цевумерана против резецированной аденокарциномы поджелудочной железы (NCT04161755). В исследование вошли 16 пациентов, получавших после операции атезолизумаб и цевумеран, 15 из которых затем прошли курс химиотерапии по схеме mFOLFIRINOX. Профиль безопасности оценивали по количеству и степени нежелательных реакций, а предварительную эффективность – по Т-клеткам, специфичным к неоантигенам вакцины, безрецидивной и общей выживаемости в течение 18 месяцев. У 15 из 16 пациентов аутогенный цевумеран переносился без нежелательных реакций 3–5 степени, у одного пациента наблюдались лихорадка и артериальная гипертензия, оцененные как нежелательная реакция 3-й степени. Появление специфичных к неоантигенам Т-клеток было зафиксировано у 8 из 16 пациентов, причем они составляли до 10% всех Т-клеток крови, сохраняли функциональность и вырабатывали IFN- γ даже после проведенной химиотерапии, нарабатывались повторно при введении бустерной дозы вакцины и включали до 2.5% сохранившихся в течение 2 лет после операции полифункциональных неоантиген-специфических эффекторных $CD8^+$ Т-клеток. При наблюдении в течение 18 месяцев медиана общей и безрецидивной выживаемости у восьми пациентов с Т-клеточным ответом на вакцину превысила 18 месяцев, в то время как у восьми не ответивших пациентов медиана безрецидивной выживаемости равнялась 13.4 месяца. Поскольку активность Т-клеток у пациентов с резецированной аденокарциномой поджелудочной железы коррелировала с отсроченным рецидивом, было начато глобальное рандомизированное исследование фазы II [30].

Несмотря на опубликованные в 2023 году результаты, наблюдение за пациентами фазы I продолжалось и в 2025 году результаты NCT04161755 были дополнены. При медиане наблюдения 3.2 года (2.3–4.0 года) у всех восьми ответивших на терапию пациентов отсутствовал рецидив. Таким образом, шесть из восьми респондеров оставались в ремиссии, в то время как у семи из восьми, не ответивших на терапию, зафиксирован рецидив. Дополнительно изучали происхождение и продолжительность жизни специфических клонов Т-клеток. Установлено, что цевумеран индуцирует клоны $CD8^+$ Т-клеток со средней продолжительностью жизни 7 лет. При этом индуцированные вак-

циной клоны не обнаруживаются в тканях до вакцинации, а 86% из них сохраняют цитотоксическое, тканерезидентное состояние Т-клеток памяти на протяжении 3 лет после вакцинации с сохранением неоантиген-специфической эффекторной функции. Результатом этого наблюдения стал вывод об устойчивой корреляции между ответом на вакцину и выживаемостью без прогрессии в течение 3.6 лет [32].

В 2023 году началось рандомизированное исследование II фазы препарата цевумеран (NCT05968326). Схема лечения пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы после хирургической резекции включает комбинацию цевумерана, атезолизумаба и химиотерапии mFOLFIRINOX против одиночной химиотерапии. Также в рамках II фазы исследований препарат цевумеран в комбинации с ИКТ получают пациенты с меланомой (NCT03815058) и мышечно-инвазивным уротелиальным раком (NCT06534983), а в качестве монотерапии – больные раком прямой или толстой кишки (NCT04486378). В январе 2025 года завершилось исследование NCT03815058, но результаты пока не доступны. Окончания других исследований следует ожидать не ранее 2029 года.

Исследования, проводимые в Китае

На январь 2025 года в Китае проводятся 14 из представленных на сайте clinicaltrials.gov испытаний ранней I и II фаз, пять – в США (табл. 1). Разработкой мРНК-вакцин занимаются такие китайские компании, как Stemirna Therapeutics, NeoCura, Everest Medicines, Hangzhou Neoantigen Therapeutics, Jiangsu Synthgene Biotechnology, Shanghai Regenelead Therapies и Shanghai Xinpu BioTechnology.

В октябре 2024 года были опубликованы результаты доклинических исследований китайской противоопухолевой вакцины SW1115C3 [112]. Препарат показал эффективность на мышинных моделях опухолей CT26, MC38 и B16F10, активируя неоантиген-специфические цитотоксические Т-клетки и вызывая секрецию цитотоксических цитокинов. Это позволило перейти к I фазе клинических испытаний на двух пациентках. Первая пациентка с распространенным раком желудка, множественными метастазами и низкой мутационной нагрузкой достигла безрецидивной выживаемости 8.4 месяца и частичной ремиссии после комбинированного приема SW1115C3 с ведолизумабом и пембролизумабом. Вторая пациентка с люминальным раком молочной железы типа В после неoadъювантной терапии и иммунизации мРНК-вакциной показала устойчи-

вый Т-клеточный ответ на 11 из 20 неоантигенов. Через год после операции у нее не выявлено рецидива или метастазирования, продолжается мониторинг.

Компания Stemirna Therapeutics начала исследования эффективности монотерапии вакциной STZD-1801 у пациентов с раком пищевода и немелкоклеточным раком легкого (NCT03908671) и комбинированной терапии мРНК-вакциной и стинтилимабом распространенных солидных опухолей (NCT05949775) и гепатоцеллюлярной карциномы (NCT05761717) [80]. Компания NeoCura запустила исследование эффективности монотерапии мРНК-вакцины и в комбинации с ИКТ у пациентов с распространенными солидными опухолями (NCT05359354), выделяя в отдельное исследование больных раком желудка, пищевода или печени (NCT05192460). Противоопухолевая мРНК-вакцина iNeo-Vac-R01 от компании Hangzhou Neoantigen Therapeutics (Китай) направлена на распространенные новообразования пищеварительной системы и изучается в рамках трех параллельных исследований с целью выбора наиболее эффективной тактики лечения (NCT06019702, NCT06026800, NCT06026774). На фазе I клинических испытаний находится мРНК-вакцина EVM16 от компании Everest Medicines с включением пациентов с рецидивирующими или распространенными солидными опухолями, получающими монотерапию вакциной или комбинированную терапию с тиселизумабом (NCT06541639). Эффективность различных комбинаций противоопухолевой мРНК-вакцины с химиотерапией и ИКТ оценивают в исследованиях, инициированных компаниями Jiangsu Synthgene Biotechnology, Shanghai Regenelead Therapies и Shanghai Xinpu BioTechnology Company Limited. В группы исследований вошли пациенты с раком поджелудочной железы (NCT06326736, NCT06156267, NCT06496373) и немелкоклеточным раком легкого (NCT06735508). Однако результаты всех описанных исследований еще не опубликованы.

Исследования, проводимые в Российской Федерации

В сентябре 2024 года НМИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи заявил о завершении доклинических испытаний отечественной мРНК-вакцины против меланомы, созданной совместно с НМИЦ радиологии Минздрава России¹ (рис. 2). Согласно официальному сайту НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина набор пациентов для проведения

¹ ria.ru [интернет]. Российская вакцина от рака прошла доклинические испытания. 2014–2025. Режим доступа: <https://ria.ru/20240906/vaktsina-1971091162.html>. Дата обращения: 06.09.2024.

I фазы клинических испытаний стартует не ранее второй половины 2025 года¹.

Согласно распоряжению Правительства Российской Федерации от 3 февраля 2025 г. № 195-р создан научно-технологический центр развития мРНК-технологий. Функции головной научной организации возложены на ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации².

¹ www.ronc.ru [интернет]. НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина: главное о противоопухолевой мРНК-вакцине. 2024–2025. Режим доступа: <https://www.ronc.ru/about/press-tsentr/glavnoe-o-protivoopukholevoy-mrnk-vaksine/> Дата обращения: 05.02.2025.

² Распоряжение Правительства Российской Федерации № 195-р от 3 февраля 2025 г. «О создании центра развития мРНК-технологий». Режим доступа: <http://government.ru/docs/54127/> Дата обращения: 05.02.2025.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клинические испытания мРНК-вакцин, структурно основанных на специфических опухолевых антигенах, показывают высокую эффективность как в монорежиме, так и в комбинации с ИКТ в отношении широкого спектра онкологических заболеваний. При этом гибкость мРНК-технологии позволяет учитывать множество вариантов мишеней (неоантигенов), использовать различные конструкции молекул мРНК и способы доставки препаратов на ее основе, а их доступность способствует быстрому внедрению в практическую онкологию. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00490-25-04 (регистрационный номер темы 125042105351-3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023.
2. Shah A, Apple J, Belli AJ, et al. Real-world study of disease-free survival & patient characteristics associated with disease-free survival in early-stage non-small cell lung cancer: a retrospective observational study. *Cancer Treat Commun.* 2023;36:100742. doi: 0.1016/j.ctarc.2023.100742
3. Garg P, Pareek S, Kulkarni P, et al. Next-Generation Immunotherapy: Advancing Clinical Applications in Cancer Treatment. *J Clin Med.* 2024;13(21):6537. doi: 10.3390/jcm13216537
4. Parvez A, Choudhary F, Mudgal P, et al. PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. *Front Immunol.* 2023;14:1296341. doi: 10.3389/fimmu.2023.1296341
5. Yuan Y, Gao F, Chang Y, et al. Advances of mRNA vaccine in tumor: a maze of opportunities and challenges. *Biomark Res.* 2023;11(1):6. doi: 10.1186/s40364-023-00449-w
6. Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):94. doi: 10.1038/s41392-022-00950-y
7. Mu X, Hur S. Immunogenicity of in vitro-transcribed RNA. *Acc Chem Res.* 2021;54(21):4012–4023. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00521
8. Gao M, Zhang Q, Feng XH, et al. Synthetic modified messenger RNA for therapeutic applications. *Acta Biomater.* 2021;131:1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2021.06.020
9. Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, et al. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(18):7035–7056. doi: 10.1093/nar/12.18.7035
10. Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, et al. Nanomedicines to deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(2):364. doi: 10.3390/nano10020364
11. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(16):6077–6081. doi: 10.1073/pnas.86.16.6077
12. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990;247(4949 Pt 1):1465–1468. doi: 10.1126/science.1690918
13. Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, et al. Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science.* 1992;255(5047):996–998. doi: 10.1126/science.1546298
14. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol.* 1993;23(7):1719–1722. doi: 10.1002/eji.1830230749
15. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res.* 1995;55(7):1397–1400.
16. Zhou WZ, Hoon DS, Huang SK, et al. RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther.* 1999;10(16):2719–2724. doi: 10.1089/10430349950016762
17. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 2002;109(3):409–417. doi: 10.1172/jci14364
18. Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, et al. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol.* 2000;30(1):1–7. doi: 10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-#
19. Probst J, Weide B, Scheel B, et al. Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* 2007;14(15):1175–1180. doi: 10.1038/sj.gt.3302964
20. Karikó K, Kuo A, Barnathan E. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following

- administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther.* 1999;6(6):1092–1100. doi: 10.1038/sj.gt.3300930
21. Karikó K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12542–12550. doi: 10.1074/jbc.M310175200
 22. Karikó 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(2):165–175. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008
 23. Krammer F, Palese P. Profile of Katalin Karikó and Drew Weissman: 2023 Nobel laureates in Physiology or Medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2024;121(9):e2400423121. doi: 10.1073/pnas.2400423121
 24. Szabó GT, Mahiny AJ, Vlatkovic I. COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments. *Mol Ther.* 2022;30(5):1850–1868. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.016
 25. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature.* 2017;547(7662):222–226. doi: 10.1038/nature23003
 26. Sahin U, Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science.* 2018;359(6382):1355–1360. doi: 10.1126/science.aar7112
 27. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69–74. doi: 10.1126/science.aaa4971
 28. Zhao W, Wu J, Chen S, Zhou Z. Shared neoantigens: ideal targets for off-the-shelf cancer immunotherapy. *Pharmacogenomics.* 2020;21(9):637–645. doi: 10.2217/pgs-2019-0184
 29. Klebanoff CA, Wolchok JD. Shared cancer neoantigens: Making private matters public. *J Exp Med.* 2018;215(1):5–7. doi: 10.1084/jem.20172188
 30. Rojas LA, Sethna ZM, Soares KC, et al. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature.* 2023;618:144–150. doi: 10.1038/s41586-023-06063-y
 31. Weber J, Luke JJ, Carlino MS, et al. INTERpath-001: Pembrolizumab with V940 (mRNA-4157) versus pembrolizumab with placebo for adjuvant treatment of high-risk stage II-IV melanoma. *Lancet.* 2024;403(10427):632–644. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02268-7
 32. Sethna Z, Guasp P, Reiche C, et al. RNA neoantigen vaccines prime long-lived CD8⁺ T cells in pancreatic cancer. *Nature.* 2025;639(8056):1042–1051. doi: 10.1038/s41586-024-08508-4
 33. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* 2019;30(1):44–56. doi: 10.1093/annonc/mdy495
 34. Richters MM, Xia H, Campbell KM, et al. Best practices for bioinformatic characterization of neoantigens for clinical utility. *Genome Med.* 2019;11(1):56. doi: 10.1186/s13073-019-0666-2
 35. Nguyen BQT, Tran TPD, Nguyen HT, et al. Improvement in neoantigen prediction via integration of RNA sequencing data for variant calling. *Front Immunol.* 2023;14:1251603. doi: 10.3389/fimmu.2023.1251603
 36. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
 37. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 2011;17(1):10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
 38. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
 39. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, et al. Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2. *bioRxiv.* 2019. doi: 10.1101/861054
 40. Saunders CT, Wong WS, Swamy S, et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics.* 2012;28(14):1811–1817. doi: 10.1093/bioinformatics/bts271
 41. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568–576. doi: 10.1101/gr.129684.111
 42. Wood DE, White JR, Georgiadis A, et al. A machine learning approach for somatic mutation discovery. *Sci Transl Med.* 2018;10(457):eaar7939. doi: 10.1126/scitranslmed.aar7939
 43. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
 44. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
 45. Patro R, Duggal G, Love MI, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14(4):417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197
 46. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 2016;34(5):525–527. doi: 10.1038/nbt.3519
 47. Szolek A, Schubert B, Mohr C, et al. OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2014;30(23):3310–3316. doi: 10.1093/bioinformatics/btu548
 48. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics.* 2016;32(4):511–517. doi: 10.1093/bioinformatics/btv639
 49. O'Donnell TJ, Rubinsteyn A, Bonsack M, et al. MHCflurry: Open-Source Class I MHC Binding Affinity Prediction. *Cell Syst.* 2018;7(1):129–132.e4. doi: 10.1016/j.cels.2018.05.014
 50. Fleri W, Paul S, Dhanda SK, et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front Immunol.* 2017;8:278. doi: 10.3389/fimmu.2017.00278
 51. Abelin JG, Keskin DB, Sarkizova S, et al. Mass Spectrometry Profiling of HLA-Associated Peptidomes in Mono-allelic Cells Enables More Accurate Epitope Prediction. *Immunity.* 2017;46(2):315–326. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.007
 52. Yu W, Yu H, Zhao J, et al. NeoDesign: a computational tool for optimal selection of polyvalent neoantigen combinations. *Bioinformatics.* 2024;40(10):btac585. doi: 10.1093/bioinformatics/btac585
 53. Lu RM, Hsu HE, Perez S, et al. Current landscape of mRNA technologies and delivery systems for new modality therapeutics. *J Biomed Sci.* 2024;31(1):89. doi: 10.1186/s12929-024-01080-z
 54. Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdissen C, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.* 2011;6:26. doi: 10.1186/1748-7188-6-26
 55. Zadeh JN, Steenberg CD, Bois JS, et al. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *J Comput Chem.* 2011;32(1):170–173. doi: 10.1002/jcc.21596
 56. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406–3415. doi: 10.1093/nar/gkg595
 57. Ni L. Advances in mRNA-Based Cancer Vaccines.

- Vaccines*. 2023;11(10):1599. doi: 10.3390/vaccines11101599
58. Fu Q, Zhao X, Hu J, et al. mRNA vaccines in the context of cancer treatment: from concept to application. *J Transl Med*. 2025;23(1):12. doi: 10.1186/s12967-024-06033-6
 59. Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*. 2014;103(1):29–52. doi: 10.1002/jps.23773
 60. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, et al. Lipid Nanoparticles – From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano*. 2021;15(11):16982–17015. doi: 10.1021/acsnano.1c04996
 61. Bartlett S, Skwarczynski M, Toth I. Lipids as activators of innate immunity in peptide vaccine delivery. *Curr Med Chem*. 2020;27(17):2887–2901. doi: 10.2174/0929867325666181026100849
 62. Brewer JM, Pollock KG, Tetley L, et al. Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J Immunol*. 2004;173(10):6143–6150. doi: 10.4049/jimmunol.173.10.6143
 63. Ghaffar KA, Giddam AK, Zaman M, et al. Liposomes as nanovaccine delivery systems. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(9):1194–1208. doi: 10.2174/1568026614666140329232757
 64. Henriksen-Lacey M, Christensen D, Bramwell VW, et al. Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response. *J Control Release*. 2010;145(2):102–108. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.03.027
 65. Miller CR, Bondurant B, McLean SD, et al. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry*. 1998;37(37):12875–12883. doi: 10.1021/bi980096y
 66. Swetha K, Kotla NG, Tunki L, et al. Recent advances in the lipid nanoparticle-mediated delivery of mRNA vaccines. *Vaccines*. 2023;11(3):658. doi: 10.3390/vaccines11030658
 67. Christensen D, Henriksen-Lacey M, Kamath AT, et al. A cationic vaccine adjuvant based on a saturated quaternary ammonium lipid have different in vivo distribution kinetics and display a distinct CD4 T cell-inducing capacity compared to its unsaturated analog. *J Control Release*. 2012;160(3):468–476. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.016
 68. Tanaka Y, Taneichi M, Kasai M, et al. Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8 T cells. *PLoS One*. 2010;5(12):e15225. doi: 10.1371/journal.pone.0015225
 69. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, et al. The interaction of liposomes with the complement system: in vitro and in vivo assays. *Methods Enzymol*. 2003;373:136–154. doi: 10.1016/S0076-6879(03)73010-9
 70. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740–745. doi: 10.1038/35047123
 71. Henriksen-Lacey M, Devitt A, Perrie Y. The vesicle size of DDA:TDB liposomal adjuvants plays a role in the cell-mediated immune response but has no significant effect on antibody production. *J Control Release*. 2011;154(2):131–137. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.019
 72. Lee Y, Lee YS, Cho SY, Kwon HJ. Perspective of peptide vaccine composed of epitope peptide, CpG-DNA, and liposome complex without carriers. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015;99:75–97. doi: 10.1016/bs.apcsb.2015.03.004
 73. Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, et al. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol*. 2000;164(5):2372–2378. doi: 10.4049/jimmunol.164.5.2372
 74. Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 2005;433(7028):887–892. doi: 10.1038/nature03326
 75. Zaks K, Jordan M, Guth A, et al. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol*. 2006;176(12):7335–7345. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7335
 76. Jin B, Sun T, Yu XH, et al. Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:690438. doi: 10.1155/2010/690438
 77. Liu Y, Janeway CA Jr. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int Immunol*. 1991;3(4):323–332. doi: 10.1093/intimm/3.4.323
 78. Werninghaus K, Babiak A, Gross O, et al. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRγ-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J Exp Med*. 2009;206(1):89–97. doi: 10.1084/jem.20081445
 79. Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater*. 2021;6(12):1078–1094. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0
 80. Fan T, Xu C, Wu J, et al. Lipopolyplex-formulated mRNA cancer vaccine elicits strong neoantigen-specific T cell responses and antitumor activity. *Sci Adv*. 2024;10(41):eadn9961. doi: 10.1126/sciadv.adn9961
 81. Kisakov DN, Karpenko LI, Kisakova LA, et al. Jet injection of naked mRNA encoding the RBD of the SARS-CoV-2 spike protein induces a high level of a specific immune response in mice. *Vaccines*. 2025;13(1):65. doi: 10.3390/vaccines13010065
 82. Ramos da Silva J, Bitencourt Rodrigues K, Formoso Pelegrin G, et al. Single immunizations of self-amplifying or non-replicating mRNA-LNP vaccines control HPV-associated tumors in mice. *Sci Transl Med*. 2023;15(686):eabn3464. doi: 10.1126/scitranslmed.abn3464
 83. Cao Y, Gao GF. mRNA vaccines: a matter of delivery. *EClinicalMedicine*. 2021;32:100746. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100746
 84. Pambudi NA, Sarifudin A, Gandidi IM, et al. Vaccine cold chain management and cold storage technology to address the challenges of vaccination programs. *Energy Rep*. 2022;8:955–972. doi: 10.1016/j.egyr.2021.12.039
 85. Schmidt M IV, Derhovanessian E, Omokoko T, et al. 88MO T-cell responses induced by an individualized neoantigen specific immune therapy in post (neo)adjuvant patients with triple negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2020;31(4):S276. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.209
 86. Chen J, Ye Z, Huang C, et al. Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8⁺ T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(34):e2207841119. doi: 10.1073/pnas.2207841119
 87. Ols S, Yang L, Thompson EA, et al. Route of vaccine administration alters antigen trafficking but not innate or adaptive immunity. *Cell Rep*. 2020;30(12):3964–3971.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.111
 88. Weber JS, Carlino MS, Khattak A, et al. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study. *Lancet*. 2024;403(10427):632–644. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02268-7

89. Gainor JF, Patel MR, Weber JS, et al. T-cell responses to individualized neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) alone or in combination with pembrolizumab in the phase 1 KEYNOTE-603 study. *Cancer Discov.* 2024;14(11):2209–2223. doi: 10.1158/2159-8290.CD-24-0158
90. Cafri G, Gartner JJ, Zaks T, et al. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J Clin Invest.* 2020;130(11):5976–5988. doi: 10.1172/JCI134915
91. Islam MA, Rice J, Reesor E, et al. Adjuvant-pulsed mRNA vaccine nanoparticle for immunoprophylactic and therapeutic tumor suppression in mice. *Biomaterials.* 2021;266:120431. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120431
92. Wang QT, Nie Y, Sun SN, et al. Tumor-associated antigen-based personalized dendritic cell vaccine in solid tumor patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(7):1375–1387. doi: 10.1007/s00262-020-02496-w
93. Thomas KS. Intramuscular injections for COVID-19 vaccinations. *J Nucl Med Technol.* 2021;49(1):11–12. doi: 10.2967/jnmt.121.262049
94. Persano S, Guevara ML, Li Z, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. *Biomaterials.* 2017;125:81–89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.019
95. Rini BI, Stenzl A, Zdrojowy R, et al. IMA901, a multi-peptide cancer vaccine, plus sunitinib versus sunitinib alone, as first-line therapy for advanced or metastatic renal cell carcinoma (IMPRINT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(11):1599–1611. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30408-9
96. Wang B, Pei J, Xu S, et al. Recent advances in mRNA cancer vaccines: meeting challenges and embracing opportunities. *Front Immunol.* 2023;14:1246682. doi: 10.3389/fimmu.2023.1246682
97. Gradel AKJ, Porsgaard T, Lykkesfeldt J, et al. Factors affecting the absorption of subcutaneously administered insulin: effect on variability. *J Diabetes Res.* 2018;1205121. doi: 10.1155/2018/1205121
98. Oberli MA, Reichmuth AM, Dorkin JR, et al. Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent cancer immunotherapy. *Nano Lett.* 2017;17(3):1326–1335. doi: 10.1021/acs.nanolett.6b03329
99. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature.* 2017;547(7662):217–221. doi: 10.1038/nature22991
100. Lorentzen CL, Haanen JB, Met Ö, et al. Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2022;23(10):e450–e458. doi: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2
101. Haabeth OAW, Blake TR, McKinlay CJ, et al. Local delivery of Ox40l, Cd80, and Cd86 mRNA kindles global anticancer immunity. *Cancer Res.* 2019;79(7):1624–1634. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2867
102. Diken M, Kreiter S, Selmi A, et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. *Gene Ther.* 2011;18(7):702–708. doi: 10.1038/gt.2011.17
103. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261–279. doi: 10.1038/nrd.2017.243
104. Choueiri TK, Powles T, Braun D, et al. 45 INTERpath-004: a phase 2, randomized, double-blind study of pembrolizumab with V940 (mRNA-4157) or placebo in the adjuvant treatment of renal cell carcinoma. *Oncologist.* 2024;29(1):S15. doi: 10.1093/oncolo/oyae181.022
105. Sonpavde GP, Valderrama BP, Chamie K, et al. Phase 1/2 INTERpath-005 study: V940 (mRNA-4157) plus pembrolizumab with or without enfortumab vedotin (EV) for resected high-risk muscle-invasive urothelial carcinoma (MIUC). *J Clin Oncol.* 2025;43(5):TPS893. doi: 10.1200/JCO.2025.43.5_suppl.TPS893
106. Sadeghi RH, Monkman J, Warkiani ME, et al. Understanding the tumor microenvironment for effective immunotherapy. *Med Res Rev.* 2021;41(3):1474–1498. doi: 10.1002/med.21765
107. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol.* 2018;8:86. doi: 10.3389/fonc.2018.00086
108. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Curr Oncol.* 2022;29(5):3044–3060. doi: 10.3390/curroncol29050247
109. Burris HA, Patel MR, Cho DC, et al. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. *J Clin Oncol.* 2019;37(15):2523. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2523
110. Khattak A, Weber JS, Meniawy TM, et al. Distant metastasis-free survival results from the randomized, phase 2 mRNA-4157-P201/KEYNOTE-942 trial. *J Clin Oncol.* 2023;41(17):LBA9503–LBA9503. doi: 10.1200/JCO.2023.41.17_suppl.LBA9503
111. Lopez J, Powles T, Braithe F, et al. Autogene cevumeran with or without atezolizumab in advanced solid tumors: a phase 1 trial. *Nat Med.* 2025;31(1):152–164. doi: 10.1038/s41591-024-03334-7
112. Chen JK, Eisenberg E, Krutchkoff DJ, et al. Changing trends in oral cancer in the United States, 1935 to 1985: a Connecticut study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(11):1152–1158. doi: 10.1016/0278-2391(91)90406-C