

mRNA 医薬開発の世界的動向

位高 啓史^{*1, #}, 秋永 士朗^{*2}, 井上 貴雄^{*3}

Development of mRNA Therapeutics

Keiji ITAKA^{*1, #}, Shiro AKINAGA^{*2} and Takao INOUE^{*3}

1. はじめに

mRNA 医薬は、メッセンジャー RNA (mRNA) を体内に直接投与して、mRNA によってコードされたタンパク質を標的細胞で発現させることによって治療を行う医薬品である (Fig. 1).

近年世界的に研究開発が活発化しており、近い将来の実用化が期待される。欧米ベンチャー企業では修飾 mRNA を用いたワクチンの開発が先行しているが、疾患治療への応用も研究が進んでいる。mRNA は核への輸送が不要で、ゲノムへの挿入変異リスクもないため、安全性に優れる一方、mRNA は生体内では極めて不安定な物質であり、その効率良い生体内投与には DDS 技術などの応用が不可欠である。mRNA は原理的にどのようなタンパク質でも産生することができ、ワクチンとしてはがんの個別化治療、感染症領域ではウイルス変異への迅速な対応、パンデミック

への対応が期待される。疾患治療用 mRNA としては、更に広範な応用の可能性があり、酵素補充療法や成長因子徐放など分泌因子を局所又は全身に徐放させる目的だけでなく、標的細胞のシグナル制御、分化誘導などを通じて、再生医療やゲノム編集治療への応用も期待される。mRNA 医薬としての承認例は世界的にもまだであるが、既にフェーズ III に入ったパイプラインもあり、近い将来の実用化が期待される。

以上の動向を踏まえ、日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンス (RS) 部会において、mRNA 医薬にフォーカスしたシンポジウム (第 10 回核酸医薬 RS シンポジウム^{注1)} : mRNA 医薬の開発動向と品質・安全性評価の考え方) が企画・開催された。当シンポジウムでは、mRNA 医薬に関する五つの講演が行われた後、パネルディスカッションにおいて、mRNA 医薬の品質・安全性評価の考え方について活発な議論がなされた。本誌では、当シンポジウムに

*1 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10 (〒101-0062)

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

*2 アクセルナ株式会社 東京都文京区本郷 3-42-1 三友ビル 201 号 (〒113-0033)

AccuRna Inc., Sanyu Bldg. 201, 3-42-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

*3 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan

責任著者 Corresponding author

注1) 核酸医薬 RS シンポジウム: 核酸医薬品の品質評価, 安全性評価等のレギュラトリーサイエンス (RS) に関連するテーマを題材に定期的に開催されているシンポジウム。産官学が一堂に会し、パネルディスカッションを通してオープンに議論を行うのが特徴である。国立医薬品食品衛生研究所が 2014 年に立ち上げ、現在は日本核酸医薬学会 RS 部会が企画・運営している。本シンポジウムの案内は、日本核酸医薬学会会員にメールにて通知されるほか、日本核酸医薬学会のホームページ (<http://nats.kenkyuukai.jp/event/index.asp?>) に掲載される。なお、本稿で取り上げた第 10 回核酸医薬 RS シンポジウムは、2018 年 7 月に日本核酸医薬学会第 4 回年会において開催された。

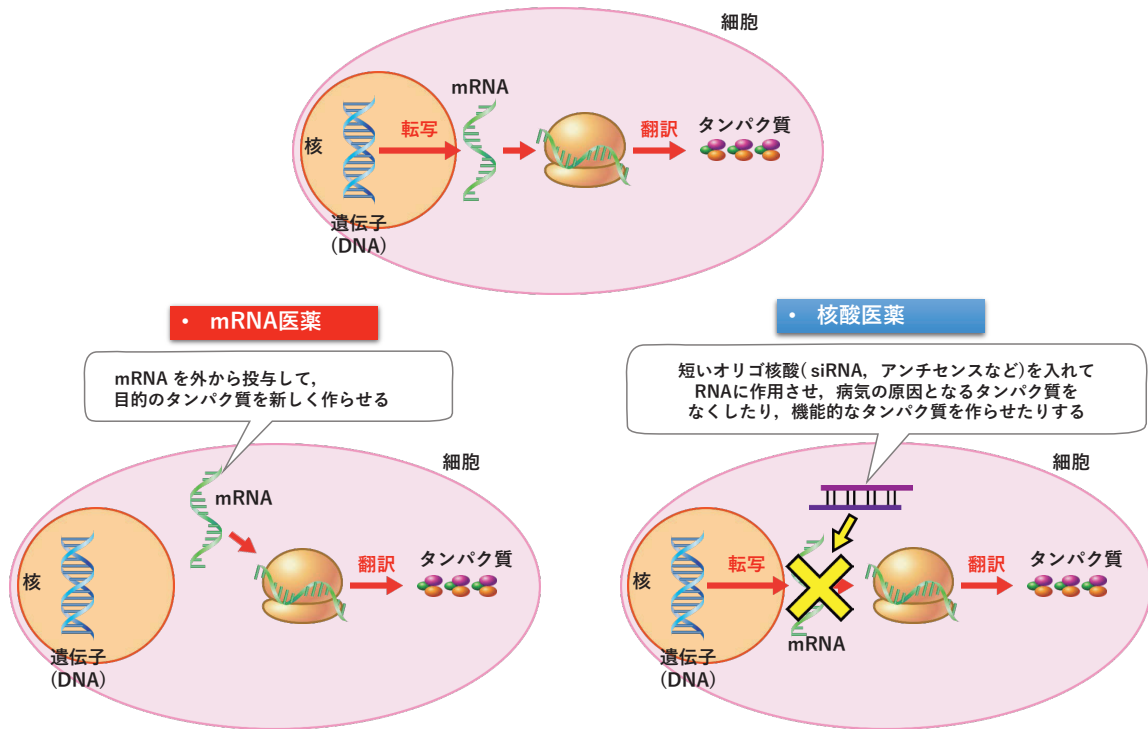


Fig. 1 mRNA 医薬

mRNA を体内の細胞に直接投与し、タンパク質を発現させる。特定の遺伝子発現を抑制する核酸医薬 (siRNA, アンチセンス核酸など) と逆の作用機序といえる。

おける講演並びにパネルディスカッションの概要を紹介すべく、2019年5月号並びに6月号において、「mRNA 医薬開発の世界的動向」並びに「mRNA 医薬品の品質・安全性評価の考え方」と題した総説を連載で掲載する。第1回となる本稿では、mRNA 医薬の研究開発の立場から、これまでの歴史的背景、現状、将来展望について概説する。

2. mRNA 医薬研究開発の歴史的経緯

mRNA をクスリとして直接体内に投与するというアイデア自体は比較的古く、プラスミド DNA (pDNA) を動物の骨格筋に投与してタンパク質発現させた、非ウイルス性遺伝子導入の最初の報告例である1990年の Science 論文で、既に合成された mRNA の投与実験も行われている¹⁾。論文では、培養細胞への *in vitro* 遺伝子導入では、mRNA, pDNA とも遺伝子導入試薬を最適な条件で用いた場合、ほぼ同等のタンパク質発現が得られているが、*in vivo* 骨格筋筋注を行うと、mRNA によるタンパク質発現は pDNA を大きく下回るものに止まっている。その理由として、mRNA が生体内で非常に不安定であるためと考察され、遺伝子治療への応用には pDNA を用いることが有望であると結論されている。以後は周知の通り、遺伝子治療の研究開発はウイルスベクター及び pDNA を中心に

進められ、一時ウイルスベクターによる死亡事故²⁾、治療後の白血病発症³⁾などのトラブル等により研究が下火になった時期もあるが、その後安全性の高められたウイルスベクターを中心に臨床応用例も多くなっている。ただ、先の論文で mRNA から抗原提示することによるワクチンへの応用が既に言及されていることは興味深く、先見の明を感じる。

その後暫く、mRNA 投与の治療への応用は論文レベルでわずかに報告されるに止まっていた。おそらく動物に投与しても、治療に十分なタンパク質発現が得られないことが多かったためであろう。その後徐々にというよりは、特に2010年代に入り急に mRNA の生体内投与に関する報告が再び増え始めた。特に論文レベルの検索では、2010年代初めはまだごく限られた研究グループ、企業からの報告が中心であったが、この数年で飛躍的に player の数が増加している印象がある。

この mRNA リバイバルの理由として、いくつかのポイントが挙げられるが、まず重要なブレイクスルーは ARCA 法 (anti-reverse cap analogues) の開発であろう⁴⁾。mRNA は鋳型 DNA からの *in vitro* 転写 (IVT) によって作成するが、真核細胞では mRNA からタンパク質翻訳させるためには mRNA 5' 末端に cap 構造を必要とし⁵⁾、IVT された mRNA にこの cap アナログを付加する必要がある。

しかし従来はこの cap アナログを付加させる方向を制御できなかったため、原理的には 1/2 の確率でしかタンパク質翻訳可能な mRNA ができなかった。ARCA 法はこの付加反応の方向を制御する手法で、原理的にはこの効率を 100%にすることができる。現在はキット化された試薬が販売されており、更に近年はより高い翻訳効率を持つ cap 構造 (cap1) の利用も可能となっている。

また codon optimization も重要である⁶⁾。タンパク質を構成する各アミノ酸は三つの核酸の配列によってコードされるが(コドン)、通常は一つのアミノ酸に対応するコドンは複数ある。したがって、あるタンパク質を発現するために、その天然の遺伝子配列ではなく、同じアミノ酸をコードする他のコドンを用いても、同じタンパク質を発現させることができる。外部から遺伝子を導入してタンパク質発現させる場合、天然型配列より異なった配列を用いた方が効率の高まることもあり、細胞内タンパク質翻訳メカニズムの重要な研究手法ともなっている⁷⁾。このことを利用して、外部から投与する DNA や mRNA の配列を最適化する技術 codon optimization が、1990 年代後半から 2000 年代にかけて活発に研究された。現在では商業ベースでのサービスとして広く用いられる手法となっており、翻訳効率を高めるためだけでなく、特殊な制限酵素を使用してベクター設計する際にも有用である。

これらの技術は mRNA 投与後のタンパク質発現を高める方法として、生体内投与だけでなく、培養細胞に対する *in vitro* transfection においても有用な技術である。現在、分子生物学研究や幹細胞研究などにおいて、mRNA transfection が広く用いられる手法となっていることにも、これらの mRNA 作成技術の向上は寄与している。

一方 mRNA の生体内投与に向けて重要なもう一つのポイントは、mRNA の免疫原性の制御である。mRNA は自然免疫機構を介した強い免疫原性を持ち、薬物として使用する際にはその制御が不可欠である。メチル化核酸、シュードウリジンなど修飾核酸に関する基礎研究から、mRNA に修飾核酸が含まれると免疫原性が減少することが明らかとなり、2000 年代に入って、mRNA 投与後の炎症反応を軽減させるための mRNA 修飾プロトコールが多く報告された^{8,9)}。mRNA 医薬開発の歴史的な観点からは、これらの技術の特許基盤としたベンチャー企業が欧米で多く設立され、現在の mRNA 医薬開発の主要な player となっていることが重要な点であろう。ただ、これらベンチャー企業で用いられる修飾プロトコールの詳細は現在非開示のものも多く、その最適な条件を学術的に検討することは難しい。また自験例だが、論文等で報告される種々の修飾 mRNA の翻訳効率、免疫原性をスクリーニングすると、mRNA の核酸配列、標的細胞、そして投与方法によっても、

最適な修飾プロトコールは異なる結果となり、その最適化は難しいのが現状である¹⁰⁾。

3. mRNA 医薬開発の現状

mRNA 医薬は mRNA という物質自体が薬理効果を持つわけではなく、細胞に取り込まれた mRNA からタンパク質が翻訳され、そのタンパク質が種々の治療効果を発揮するという細胞内遺伝子発現のメカニズムを介した作用機序なので、広義の遺伝子治療の範疇に分類される。一方、従来のウイルスベクターや DNA を用いた遺伝子治療と異なり、Table 1 に示すような特長がある。特にゲノムへ取り込まれないことが安全性の観点で重要であり、比較的重篤な疾患に適応が限られた従来の遺伝子治療と異なり、mRNA 医薬は非遺伝性の疾患、加齢変性疾患、外傷など、幅広い疾患領域・病態への適応の可能性が考えられる。

また、mRNA からのタンパク質翻訳という細胞本来の生理的機構を介して薬理効果を得るという点からは、むしろ生体にとって異物である一般的な低分子薬剤より、mRNA は生体に優しい治療薬であるときえいえる。もちろんその治療効果は発現するタンパク質によってもたらされるもので、その医薬品としての性能は対象疾患、標的組織、そして投与遺伝子によって個別の議論となる。現状ではまだ mRNA 医薬として承認に至ったものはなく、mRNA 医薬全体を俯瞰するには時期尚早だが、mRNA ワクチンを中心に欧米ベンチャー企業が進められている研究開発を中心に、その現状や方向性を概説する。

3.1 mRNA の改変・最適化

これまで述べたように、mRNA の性能向上、精製技術の改良が mRNA 医薬実用化に向けて大きな推進力となってきたが、今後もタンパク質発現効率の向上・持続化は重要な検討課題である。更に本項目は特許戦略として重要であり、天然の核酸分子のままでは物質特許は取れないので、

Table 1 mRNA 医薬の特徴と課題

mRNA は細胞質に入るだけでタンパク質発現する → 原理的にあらゆる細胞に適応可能
mRNA はホストゲノムに挿入されるリスクが無い → 標的細胞をがん化させる危険無く、安全に用いることができる
mRNA は生体内で非常に不安定である → mRNA を安定に保持し、標的細胞へ輸送する DDS が必要
mRNA は免疫反応を誘発する → 免疫を制御する仕組み (mRNA 分子の改良、DDS) が必要

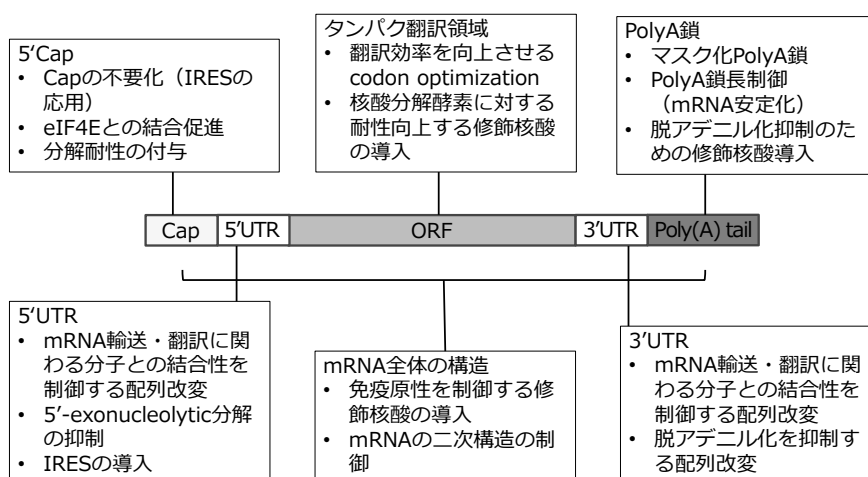


Fig. 2 mRNA 構造の最適化

mRNA からのタンパク質翻訳の効率向上・持続化を目的として、上記のような項目が研究対象となっている。(文献 11 より引用改変)

mRNA の改変が有力な戦略となる。Fig. 2 はその mRNA 構造の改変・最適化に関わる研究項目の例であるが¹¹⁾、これ以外にも今後多くの研究課題が考案・実施されるものと想定される。

ただし、現状の臨床試験等で主に用いられている mRNA 改変は、本来生体内にも見られる variation の範疇での改変が主のようである。レギュレーションの観点からは、全くヒト mRNA には存在しないタイプの核酸を用いることは、安全性評価のハードルが高くなることは避けられない。一方、非翻訳領域 (5'UTR, 3'UTR) の改変や、PolyA 鎖長の制御など、核酸配列を変化させる改変は、薬物として新しい物質を用いているわけではなく、むしろ自在に配列を変えることが可能であるという核酸医薬の特徴を活かした研究開発として、比較的高い自由度で認められる可能性が高い。

3.2 DDS

mRNA は通常そのまま体内への投与に用いることはできず、DDS 及び投与方法の工夫が必要である。Table 2 に示すように、現状では脂質ナノ粒子 (LNP) 及びポリマー粒子が主に用いられているが、まだ mRNA 送達に最適な決定打のようなものは出ていない。逆説的だが、mRNA ワクチン開発が先行した背景として、特に皮下投与などに際しては、高性能の DDS が必要ないからという理由は間違いなくある。多くの LNP はその詳細な構造が非開示で、第三者がその性能を客観的に評価することは難しいが、血中投与で全身に広くタンパク質発現を可能とするシステムも報告されている。ただ LNP は一般的に炎症反応を惹起しやすく、標的疾患や対象臓器によっては使用が難しい。

一方、ポリマー粒子は数十ナノメートル以下への粒径制御により局所での組織浸透性に優れ、mRNA の免疫原性を抑制する機能にも優れる。おそらく、適応によって最適な DDS がその都度選択されるとの状況が、今後しばらく続くと思定される。

3.3 対象疾患

現在 mRNA 医薬実用化に向けて最も開発が進んでいるのは、mRNA ワクチンとしての応用である。感染症ワクチン及びがんワクチンが 2 大適応で、いずれも mRNA からのタンパク質発現によって抗原提示を行うという点では共通し、核酸配列を変えることによってどのような抗原タンパクに対しても対応可能であることがポイントとなる。

3.3.1 感染症 mRNA ワクチン

感染症予防に用いる従来のワクチンは、病原性をなくしているとはいえ細菌やウイルスなどが元になるので、健康人に対する投与においても一定のリスクが避けられないが、mRNA ではこれら病原体を用いないので安全性に優れる。また、核酸配列を変えるだけで、どのような抗原タンパクに対しても対応可能である。例えば、新型インフルエンザ、ジカ熱などの新興 (再興) 感染症が最近問題となっているが、これらの感染拡大を防止するためのワクチン設計、大量製造を迅速に行うことは、従来のワクチンでは容易ではない。一方、mRNA では新しいウイルス型の確定、ゲノム配列の確認ができれば、ワクチン設計は比較的容易で、製造についても今後 mRNA 製造の技術進展、スケールメリットが働くことによって、大きくコストダウンは期待される。

現在 Moderna (アメリカ)、BioNTech、CureVac (ドイ

Table 2 mRNA 医薬の疾患治療への応用

	標的疾患	投与遺伝子	投与方法/部位	参考文献
分泌型タンパクの投与	心筋梗塞	vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)	LNP 心筋内投与	<i>Nat Biotechnol</i> , 31 (2013) 898 <i>Mol Ther Methods Clin Dev</i> 9 (2018) 330
	心筋梗塞	insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	ポリマー(PEI) 心筋内投与	<i>Mol Pharm</i> , 12 (2015) 991
	骨欠損	bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)	磁性ナノ粒子+担体 局所留置	<i>Biomaterials</i> , 87 (2016) 131
	骨欠損	bone morphogenetic protein-2, 9 (BMP-2, 9)	ポリマー(PEI)+担体 局所留置	<i>AAPS</i> , 21 J, 19 (2017) 438
	腱障害	bone morphogenetic protein-7 (BMP-7)	naked mRNA 腱実質内注射	<i>European cells & materials</i> , 33 (2017) 294
	知覚神経障害	brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	ポリマー(ミセル型キャリア) 点鼻投与	<i>J Control Release</i> , 201 (2015) 41
	アルツハイマー病	nepirylsin (膜タンパク)	ポリマー(ミセル型キャリア) 脳室内投与	<i>J Control Release</i> , 235 (2016) 268
	アルツハイマー病	抗アミロイド抗体	ポリマー(ミセル型キャリア) 脳室内投与	<i>Curr Alzheimer Res</i> , 14 (2017) 295
	細胞内シグナル因子等の投与	変形性関節症	runt-related transcription factor 1 (RUNX1)	ポリマー(ミセル型キャリア) 関節内投与
劇症肝炎(抗アポトーシス治療)		B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	ポリマー(ミセル型キャリア) 静脈内投与(ハイドロダイナミクス法投与)	<i>Scientific reports</i> , 5 (2015) 15810
Friedreich's ataxia		frataxin (FXN)	LNP 髄注, 静脈内投与	<i>Scientific reports</i> , 6 (2016) 20019
パーキンソン病(direct reprogramming)		reprogramming factors (Ascl1, Pitx3, Nurr1, Lmx1a)	ポリマー(GO-PEI) 脳実質内投与	<i>Small</i> , 13 (2017) 1601993
糖原病		glucose-6-phosphatase (G6Pase)	LNP 静脈内投与	<i>Mol Ther</i> , 26 (2018) 814
椎間板変性疾患		runt-related transcription factor 1 (RUNX1)	ポリマー(ミセル型キャリア) 局所投与	<i>Mol Ther Nucleic Acids</i> , 16 (2019) 162

mRNA の *in vivo* 投与で疾患外傷モデル動物に対する治療効果が確認されている文献を収集した。投与タンパク質として分泌型タンパク質、シグナル因子など細胞内タンパク質に大別した。

ツ)などの欧米ベンチャー企業、メガファーマではGSKが開発の中心となっており、対象の疾患としてエイズ、インフルエンザ、ジカ熱などが挙げられている (Table 3)。多くは従来のワクチンと同様に皮内投与で、DDSを用いない mRNA 単独の投与もあるようである。一方ほとんどのケースでは、mRNA のみでは免疫賦活化作用が十分でなく、アジュバントの併用となっている。mRNA 分子を部分的に二本鎖構造として、抗原提示能と免疫賦活化作用を併せ持つ mRNA 開発も、まだ基礎段階であるが研究が進められている¹²⁾。

3.3.2 がん治療用 mRNA (がんワクチン)

従来のワクチンと比較して、mRNA や DNA をワクチンとして用いる最大のポイントの一つは、液性免疫だけでなく細胞性免疫も誘導可能となることである。がん細胞に特異的ながん抗原に対して、細胞性免疫を誘導するためのがんワクチン療法のアイディアは1990年代に広まり、ペプチドワクチン、樹状細胞ワクチンなど臨床試験も行われ

るが、まだ一般的ではない。一方 mRNA は配列を自由に変えることができるので、患者ごとに異なるがん抗原に対応した個別化がんワクチン治療が可能となる。

この分野で先頭に立つのはBioNTechで、2017年にメラノーマ患者に対する neo-antigen mRNA ワクチンの治療効果を報告し、世界中から注目された¹³⁾。その後腎がん、肺がんなどを含む固形がんでの neo-antigen mRNA ワクチンの臨床試験がBioNTech, CureVac, Moderna等によって進められ、一部は既にフェーズ II まで進んでいる。がん mRNA ワクチンは PD-(L)1 阻害剤など免疫チェックポイント阻害剤との併用で、がん免疫治療の効果を高めることが基礎試験で検証されており、BioNTech は Genentech と PD-L1 抗体の併用臨床試験を進めており、更に CureVac, Moderna も各々 Eli Lilly, Merck と同様な併用試験を進めている。今後、これらの併用での POC が取得された場合には、regulatory agency が個別化ワクチン療法の platform を薬剤承認の対象とするかが大きな

Table 3 mRNA 医薬の臨床治験実施例

	開発企業	標的疾患	投与方法	開発段階
感染症	Argos Therapeutics	HIV	皮内投与	フェーズII
	eTheRNA	HIV	鼻腔内投与	フェーズII
	BioNTech	ヒトパピローマウイルス感染症	皮内投与	フェーズII
	CureVac	狂犬病	皮内投与	フェーズI
	Moderna	サイトメガロウイルス感染症	筋注/皮内投与	フェーズI
	Moderna	インフルエンザ（複数のパイプライン）	筋注/皮内投与	フェーズI
	Moderna	ジカ熱	筋注/皮内投与	フェーズI
	Moderna	チクングニア熱	筋注/皮内投与	フェーズI
がん	Argos Therapeutics	転移性腎臓がん	皮内投与	フェーズIII
	Boehringer Ingelheim	非小細胞肺癌	皮内投与	フェーズI
	BioNTech	メラノーマ	鼻腔内/静脈内投与	フェーズI
	BioNTech	頭頸部がん	静脈内投与	フェーズI
	CureVac	扁平上皮がん	腫瘍内投与	フェーズI
	CureVac	肝細胞がん	腫瘍内投与	フェーズI
	eTheRNA	メラノーマ	リンパ節投与	フェーズII
	Moderna	固形がん	筋肉/皮内投与	フェーズI
	Moderna	固形がん, リンパ腫	腫瘍内投与	フェーズI
	その他	Moderna/AstraZeneca	心筋虚血	心筋内投与

ベンチャー企業等からの公開情報を基に、フェーズ I 以降に進んでいるものを収集した。

ポイントとなるであろう。

3.3.3 疾患治療用 mRNA（一般の疾患）

mRNA 医薬を一般的な治療を目的として用いる場合、その作用機序からは、mRNA にコードして投与する遺伝子として、成長因子や酵素などの分泌型タンパク、又は標的となった細胞内又は細胞膜上で発現するシグナル因子・膜タンパクなどの 2 種に大別して考えることが妥当であろう (Table 2)。前者は標的細胞から局所あるいは全身にタンパク質が分泌されるので、リコンビナントタンパクの投与による治療がベンチマークとなる。この分野では、アストラゼネカ社が行う心虚血疾患に対する VEGF mRNA の応用が世界をリードしており、現在フェーズ II である^{14,15)}。VEGF などの成長因子は、overdose による組織の異常が起きやすく、mRNA を用いることによって、正常な血管再生を促進する VEGF の局所濃度環境が得られると説明されている。また、つい先日同社から II 型糖尿病患者に対する VEGF mRNA 皮下投与の安全性試験も報告され、局所での血流改善効果、明らかな有害事象のなかったことが示されている¹⁶⁾。

その他は基礎研究段階であるが、近年モデル動物を用いた成果が多く報告され始めており、再生医療領域への応用は活発である。成長因子の徐放による組織再生の試みに加え、特に自験例ながら、軟骨、椎間板といった自力での再生能のない組織に対する治療用転写因子 mRNA の応用は、他の薬物ではできない全く新しい病態修飾療法として注目される^{17,18)}。脳神経系も重要な標的組織で、神経細胞を代表とする非分裂の成熟細胞にも導入可能な mRNA の特長を生かして、自験例を含めて種々の試みが行われている

る¹⁹⁻²³⁾。一方、遺伝性稀少疾患に対する酵素補充療法は当然重要な標的で、ベンチャー企業等の公開情報では研究開発対象として多く掲げられるが、現状では論文レベルでの報告例は少ない²⁴⁾。

一般の疾患に対する治療用 mRNA は、対象疾患や標的組織によってその戦略は大きく異なる。投与する遺伝子の選択に加えて、mRNA の作用を時間的、空間的に制御する DDS が重要な役割を果たすことも特徴である。また、低分子薬剤開発で行われるスクリーニングプロセスを経ず、病態に関わるシグナルなどの分子生物学的知見が、直接 mRNA を用いて投与する候補因子となりうるという、創薬プロセスのパラダイムシフトをもたらすことも期待される。

4. 今後の展望

これまで述べたように、mRNA 医薬は新しい医薬品カテゴリーとして今後大いに発展が期待される。一方、研究開発は産学ともにアメリカ、ドイツが中心で、日本は少々立ち遅れているというのが実情である。日本の強みとしては、2014 年に施行された医薬品医療機器等法に含まれる再生医療等製品（遺伝子治療用製品）の枠組みでの実用化が展望される点があり、新しい医療マーケットの創出に向けた法規制面の整備は進んでいる。mRNA 医薬の適応は広範と想定されるので、mRNA の特徴を生かして十分な治療効果の期待できる対象疾患・治療遺伝子・DDS の選択肢を豊富に持ち、実用化に向けては欧米の動向も睨みながら、競争力のある医療分野に重点的に投資していく姿勢

が重要であろう。

文 献

- 1) Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990, **247**, p.1465-1468.
- 2) Marshall, E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*. 1999, **286**, p.2244-2245.
- 3) Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M.P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P.; Lim, A.; Osborne, C.S.; Pawliuk, R.; Morillon, E.; Sorensen, R.; Forster, A.; Fraser, P.; Cohen, J.I.; de Saint Basile, G.; Alexander, I.; Wintergerst, U.; Frebourg, T.; Aurias, A.; Stoppa-Lyonnet, D.; Romana, S.; Radford-Weiss, I.; Gross, F.; Valensi, F.; Delabesse, E.; Macintyre, E.; Sigaux, F.; Soulier, J.; Leiva, L.E.; Wissler, M.; Prinz, C.; Rabbitts, T.H.; Le Deist, F.; Fischer, A.; Cavazzana-Calvo, M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003, **302**, p.415-419. doi:10.1126/science.1088547.
- 4) Stepinski, J.; Waddell, C.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R.E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA*. 2001, **7**, p.1486-1495.
- 5) Furuichi, Y.; LaFiandra, A.; Shatkin, A.J. 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*. 1977, **266**, p.235-239.
- 6) Gustafsson, C.; Govindarajan, S.; Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. 2004, **22**, p.346-353. doi:10.1016/j.tibtech.2004.04.006
- 7) Presnyak, V.; Alhusaini, N.; Chen, Y.H.; Martin, S.; Morris, N.; Kline, N.; Olson, S.; Weinberg, D.; Baker, K.E.; Graveley, B.R.; Collier, J. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*. 2015, **160**, p.1111-1124. doi:10.1016/j.cell.2015.02.029.
- 8) Kariko, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F.A.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*. 2008, **16**, p.1833-1840. doi:mt2008200
- 9) Kormann, M.S.; Hasenpusch, G.; Aneja, M.K.; Nica, G.; Flemmer, A.W.; Herber-Jonat, S.; Huppmann, M.; Mays, L.E.; Illenyi, M.; Schams, A.; Griese, M.; Bittmann, I.; Handgretinger, R.; Hartl, D.; Rosenacker, J.; Rudolph, C. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*. 2011, **29**, p.154-157. doi:10.1038/nbt1733
- 10) Uchida, S.; Kataoka, K.; Itaka, K. Screening of mRNA Chemical Modification to Maximize Protein Expression with Reduced Immunogenicity. *Pharmaceutics*. 2015, **7**, p.137-151. doi:10.3390/pharmaceutics7030137.
- 11) Sahin, U.; Kariko, K.; Tureci, O. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014, **13**, p.759-780. doi:10.1038/nrd4278.
- 12) Uchida, S.; Yoshinaga, N.; Yanagihara, K.; Yuba, E.; Kataoka, K.; Itaka, K. Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination. *Biomaterials*. 2018, **150**, p.162-170. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.09.033.
- 13) Sahin, U.; Derhovanessian, E.; Miller, M.; Kloke, B.P.; Simon, P.; Lower, M.; Bukur, V.; Tadmor, A.D.; Luxemburger, U.; Schrors, B.; Omokoko, T.; Vormehr, M.; Albrecht, C.; Paruzynski, A.; Kuhn, A.N.; Buck, J.; Heesch, S.; Schreeb, K.H.; Muller, F.; Ortseifer, I.; Vogler, I.; Godehardt, E.; Attig, S.; Rae, R.; Breitzkreuz, A.; Tolliver, C.; Suchan, M.; Martic, G.; Hohberger, A.; Sorn, P.; Diekmann, J.; Ciesla, J.; Waksman, O.; Bruck, A.K.; Witt, M.; Zillgen, M.; Rothermel, A.; Kasemann, B.; Langer, D.; Bolte, S.; Diken, M.; Kreiter, S.; Nemecek, R.; Gebhardt, C.; Grabbe, S.; Holler, C.; Utikal, J.; Huber, C.; Loquai, C.; Tureci, O. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 2017, **547**, p.222-226. doi:10.1038/nature23003.
- 14) Zangi, L.; Lui, K.O.; von Gise, A.; Ma, Q.; Ebina, W.; Ptaszek, L.M.; Spater, D.; Xu, H.; Tabebordbar, M.; Gorbatov, R.; Sena, B.; Nahrendorf, M.; Briscoe, D.M.; Li, R.A.; Wagers, A.J.; Rossi, D.J.; Pu, W.T.; Chien, K.R. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*. 2013, **31**, p.898-907. doi:10.1038/nbt2682.
- 15) Carlsson, L.; Clarke, J.C.; Yen, C.; Gregoire, F.; Albery, T.; Billger, M.; Egnell, A.-C.; Gan, L.-M.; Jennbacken, K.; Johansson, E.; Linhardt, G.; Martinsson, S.; Sadiq, M.W.; Witman, N.; Wang, Q.-D.; Chen, C.-H.; Wang, Y.-P.; Lin, S.; Ticho, B.; Hsieh, P.C.H.; Chien, K.R.; Fritsche-Danielson, R. Biocompatible, Purified VEGF-A mRNA Improves Cardiac Function after Intracardiac Injection 1 Week Post-myocardial Infarction in Swine. *Molecular Therapy—Methods & Clinical Development*. 2018, **9**, p.330-346. doi:10.1016/j.jomtm.2018.04.003.
- 16) Gan, L.M.; Lagerstrom-Fermer, M.; Carlsson, L.G.; Arfvidsson, C.; Egnell, A.C.; Rudvik, A.; Kjaer, M.; Collen, A.; Thompson, J.D.; Joyal, J.; Chialda, L.; Koernicke, T.; Fuhr, R.; Chien, K.R.; Fritsche-Danielson, R. Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes. *Nat Commun*. 2019, **10**, p.871. doi:10.1038/s41467-019-08852-4.
- 17) Aini, H.; Itaka, K.; Fujisawa, A.; Uchida, H.; Uchida, S.; Fukushima, S.; Kataoka, K.; Saito, T.; Chung, U.I.; Ohba, S. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Scientific reports*. 2016, **6**, p.18743. doi:10.1038/srep18743.
- 18) Lin, C.Y.; Crowley, S.T.; Uchida, S.; Komaki, Y.; Kataoka, K.; Itaka, K. Treatment of intervertebral disk disease by administration of messenger RNA encoding a cartilage-anabolic transcription factor. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019, **16**, p.162-171. doi:10.1016/j.jomtm.2019.02.012.
- 19) Baba, M.; Itaka, K.; Kondo, K.; Yamasoba, T.; Kataoka, K. Treatment of neurological disorders by introducing mRNA in vivo using polyplex nanomicelles. *J Control Release*. 2015, **201**, p.41-48. doi:10.1016/j.jconrel.2015.01.017.
- 20) Lin, C.Y.; Perche, F.; Ikegami, M.; Uchida, S.; Kataoka, K.; Itaka, K. Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: An animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles. *J Control Release*. 2016, **235**, p.268-275. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.001.
- 21) Nabhan, J.F.; Wood, K.M.; Rao, V.P.; Morin, J.; Bhamidipaty, S.; LaBranche, T.P.; Gooch, R.L.; Bozal, F.; Bulawa, C.E.;

- Guild, B.C. Intrathecal delivery of frataxin mRNA encapsulated in lipid nanoparticles to dorsal root ganglia as a potential therapeutic for Friedreich's ataxia. *Scientific reports*. 2016, 6, p.20019. doi:10.1038/srep20019.
- 22) Perche, F.; Uchida, S.; Akiba, H.; Lin, C.Y.; Ikegami, M.; Dirisala, A.; Nakashima, T.; Itaka, K.; Tsumoto, K.; Kataoka, K. Improved Brain Expression of Anti-Amyloid beta scFv by Complexation of mRNA Including a Secretion Sequence with PEG-based Block Cationomer. *Curr Alzheimer Res*. 2017, 14, p.295-302. doi:10.2174/1567205013666161108110031.
- 23) Baek, S.; Oh, J.; Song, J.; Choi, H.; Yoo, J.; Park, G.Y.; Han, J.; Chang, Y.; Park, H.; Kim, H.; Cho, S.G.; Kim, B.S.; Kim, J. Generation of Integration-Free Induced Neurons Using Graphene Oxide-Polyethylenimine. *Small*. 2017, 13. doi:10.1002/sml.201601993.
- 24) Roseman, D.S.; Khan, T.; Rajas, F.; Jun, L.S.; Asrani, K.H.; Isaacs, C.; Farelli, J.D.; Subramanian, R.R. G6PC mRNA Therapy Positively Regulates Fasting Blood Glucose and Decreases Liver Abnormalities in a Mouse Model of Glycogen Storage Disease 1a. *Mol Ther*. 2018, 26, p.814-821. doi:10.1016/j.yymthe.2018.01.006.