

## Sentetik Haberci Ribonükleik Asit Bazlı Kanser Aşıları

### *Synthetic Messenger Ribonucleic Acid-Based Cancer Vaccines*

Mustafa Diken

TRON, Immunotherapy Development  
Center, Mainz, Germany

#### İletişim adresi:

Dr. Mustafa Diken  
TRON, Immunotherapy Development  
Center, 55131 Mainz, Germany  
Tel: 00 49 613 117 81 65  
e-posta: mustafa.diken@tron-mainz.de

©2014 Turkish Journal of Immunology.  
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2014.326

Geliş tarihi: 10 Ağustos 2014  
Kabul tarihi: 11 Ağustos 2014

Bir immünoterapi yöntemi olarak kanser aşılarının önemi günümüzde hızla artmaktadır. Bu aşilar içinde haberci ribonükleik asit (mRNA) bazlı aşilar, tümöre özgü antijen kodlayan mRNA'nın direkt olarak vücuda verilmesi ile mRNA'yı içine alan dendritik hücreler tarafından bu antijenlerin hücre yüzeyinde sunularak antijene özgü T hücrelerinin aktif hale getirilmesini amaçlar. Bu T hücreleri tümör hücreleri üzerinde sunulan antijenleri tanıyarak, tümöre karşı etkin bir savunma yapılmasını sağlar. Moleküler yapısı gereği hücre içi reseptörlere bağlanan mRNA, bağışıklık sistemini aktive eden bir adjuvant görevi de görmektedir. Haberci ribonükleik asit hem laboratuvar hem de klinik kalitede standart moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak bir ya da bir kaç antijeni kodlayacak şekilde üretilmekte ve çeşitli yapısal oluşumları optimize edilerek kolayca tasarlanabilmektedir. Bu derlemede mRNA'yı direkt olarak deri içine ya da lenf düğümlerine enjekte edilmesini konu alan mRNA aşiları ele alınmaktadır. Bu mRNA bazlı aşilar gerek klinik öncesi gerek klinik çalışmalarda değişik kanser türleri için denenmekte ve kansere karşı yapılan savaşta umut vaat etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Kanser immünoterapisi; kanser aşisi; haberci ribonükleik asit.

Cancer vaccines have recently gained a great importance as a type of immunotherapy. Among these, messenger ribonucleic acid (mRNA)-based vaccines aim to activate antigen-specific T cells by dendritic cells which internalize mRNA and present the mRNA-encoded tumor antigens upon direct administration of mRNA. These T cells recognize the antigens presented by tumor cells and mediate an efficient anti-tumoral activity. Thanks to its molecular structure, mRNA also serves an adjuvant activating the immune system through binding to intracellular receptors. Coding for one or more antigens, mRNA can be produced in laboratory as well as clinical quality using standard molecular biology techniques and designed easily through optimization of various structural elements. In this review, mRNA vaccines which involve direct injection of mRNA intradermally or intranodally (into the lymph node) are discussed. These mRNA vaccines are currently being tested in various preclinical and clinical studies and hold promise for the fight against cancer.

**Key words:** Cancer immunotherapy; cancer vaccine; messenger ribonucleic acid.

İlk kanser aşisinin kullanımından bugüne yüz yıldan fazla bir süre geçmiştir. William Coley tarafından 1893 yılında tümöre özgü olmamasına rağmen kanser hastalarının tümörlerinde gerileme sağladığını gösteren bakteri temelli ilk kanser aşisi<sup>[1]</sup> günümüzde tümöre özgü antijenlerden oluşan moleküler temelli aşılara dönüştürülmüştür. Yakın zamanda Sipuleucel T (PROVENGE®, Dendreon Seattle, WA USA) adındaki kanser aşisi kastrasyona dirençli prostat kanserine karşı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylanarak hastalarda kullanılmaya başlanmıştır.<sup>[2]</sup>

Günümüzde birçok klinik öncesi ve klinik çalışmada, tümöre özgü farklı antijen formatları kullanılarak hazırlanmış (DNA, RNA, protein, peptid, virüs) kanser aşiları denenmektedir. Bunların arasında rekombinant olarak *in vitro* transkripsiyon ile sentezlenebilen tek sarmal haberci RNA (mRNA) farklı özellikleri ile son yıllarda öne çıkmaktadır. Viral vektörlerden ya da DNA'dan farklı olarak mRNA kendisini genoma entegre etmemesinden ve de sadece belirli bir süre aktif olduğundan ötürü daha güvenli bir ilaç formu olarak kabul edilmektedir. Haberci RNA belirli epitoplara ya da bütün protein antijenini kodlayabildiği için istenilen majör doku uygunluk kompleksi (MHC) moleküllerine göre tasarlanabilmekte

ve bu sayede haplotiplerine bakılmaksızın geniş bir hasta grubunda kullanılabilir. Antijen kodlamasına ek olarak, hücreye alındığında gişe benzeri reseptör 3 (toll like receptor; TLR3), TLR7 ve TLR8 gibi değişik model tanıyıcı reseptörlere (PRR) bağlanarak bağışıklık sistemi hücrelerini aktive eden doğal bir adjuvant görevi görmektedir.<sup>[3]</sup> Standart moleküler biyoloji yöntemleri ile yapısının istenilen şekilde tasarlanması, basit ve hızlı bir şekilde hem laboratuvar hem de iyi üretim uygulamaları (good manufacturing practice; GMP) kalitesinde hesaplı bir şekilde sentezlenebilmesi de mRNA'nın gelecek vaat eden bir ilaç formatı olduğunu göstermektedir.

### **Haberci Ribonükleik Asit Bazlı Kanser Aşılarının Kısa Tarihi**

Haberci RNA'nın vücuda verilerek bir proteinin kodlanması fikri ilk olarak Jon Wolff tarafından 1990 yılında lusiferaz ve beta-galaktosidaz enzimlerini kodlayan mRNA'ların, farede kas içine direkt olarak injekte edilmesi sonucu bu proteinlerin aktivitelerinin *in vivo* olarak gözlenmesiyle başarı ile denenmiştir.<sup>[4]</sup> Haberci RNA'nın kansere karşı bir aşı olarak ilk kullanımı ise 1995 yılında karsinoembriyonik antijeni (CEA) kodlayan mRNA'nın yine kas içi injeksiyonu sonrasında farelerde tümöre karşı bağışıklık gelişmesi ile kaydedilmiştir.<sup>[5]</sup> Bundan bir yıl sonra mRNA ile inkübe edilen dendritik hücrelerin (DH) mRNA alıp kodlayabildiği ve antijeni MHC molekülleri ile T hücrelerine sunarak onları aktive edebildiği gözlemlenmiştir.<sup>[6]</sup> Bunu takip eden çalışmalarda, mRNA'nın dendritik hücrelere elektroporasyon yolu ile aktarımı<sup>[7,8]</sup> bu tür RNA kodlayan dendritik hücrelerin hastalara verilmesi prensibine dayalı terapilerde çığır açarak bu aşuların birçok kanser türünde son 15 yıldır güvenilir bir şekilde denenmesini sağlamıştır.<sup>[9]</sup>

Bununla birlikte hücre bazlı tedaviler, yüksek maliyetleri ve özellikle değişen birçok parametreyi içinde barındıran zor üretim süreçleri yüzünden, bir ilacın temel avantajlarını sağlayamamaktadır. Bu yüzden birçok grup lipozomlar, polimerler, gen tabancası ya da mRNA'nın direkt olarak injeksiyonu gibi değişik yöntemler kullanılmıştır.<sup>[3]</sup> Bu yöntemlerden birçoğu değişik bariyerler (hedefleme, toksisite, hücre içine alınım) ve hasta güvenliği gibi nedenlerden dolayı klinik çalışma seviyesine ulaşamasa da antijen kodlayan mRNA'nın direkt olarak deri içine<sup>[10]</sup> ya da lenf düğümüne<sup>[11]</sup> injeksiyonu kanser hastalarında denenmeye devam etmektedir ve bu derlemede, bu tür kanser aşuları üzerinde durulacaktır.

### **Antijen Kodlayan mRNA'nın Kanser Aşısı Olarak Sentezlenmesi**

Haberci RNA aşularının çalışma prensibi injeksiyondan sonra mRNA'nın antijen sunan hücreler tarafından alınıp kodlanan antijenin T hücrelerine sunulması,

antijene özgü bağışıklık yanıtlarının sağlanmasıdır. Bu yüzden mRNA'nın hücre içindeki farmakolojisi aşının etkinliği için önemli bir faktördür. Haberci RNA'nın hücreye alındıktan sonraki dayanıklılığı ve translasyon verimi birçok faktör tarafından belirlenmektedir. Özellikle mRNA'nın başındaki "cap", transle edilmeyen elementler (UTR) ve poli-A kuyruğu gibi yapısal oluşumlar mRNA'nın farmakolojisinde önemli rol oynar ve bunların optimize edilmesi daha aktif bir mRNA aşısına olanak sağlar. Haberci RNA 5' ucuna takılan m7GpppN cap homoloğu ile sentezlenir, fakat bu sentetik cap analogu mRNA'ya her iki oryantasyonda da bağlanabileceğinden dolayı hücrenin protein sentez mekanizmaları tarafından tanınması verimli değildir.<sup>[12]</sup> Bu yüzden çeşitli değişimlerle son yıllarda ARCA (anti-reverse cap analog) denilen ve mRNA'ya sadece bir oryantasyonda eklenebilen analogların kullanımı fayda sağlamaktadır.<sup>[13,14]</sup> Bunlara ek olarak yine farklı kimyasal modifikasyonlar (thioate) içeren cap analoglarının mRNA'nın translasyonunu ve bağışıklık yanıtlarını arttırdığı gözlemlenmiştir.<sup>[15]</sup> Haberci RNA'nın 3' ucunda bulunan UTR'lerin mRNA'nın dayanıklılığına ciddi katkıları olmakta ve bu neden ile birçok mRNA vektörlerinde alfa ve beta globin gibi uzun ömürlü mRNA'ların 3'-UTR'leri kullanılmaktadır.<sup>[16]</sup> Bu tür beta globin UTR'lerinin vektör içinde ard arda kullanımının, mRNA'nın ömrünü ve dayanıklılığını artırdığı kanıtlanmıştır.<sup>[17]</sup> Bu elementlere ek olarak mRNA'nın 3'ucundaki poli-A kuyruğunun tasarımı da mRNA'nın farmakolojisini etkilemektedir. Holtkamp ve ark.<sup>[17]</sup> tarafından yapılan bir çalışmada 120 baza kadar olan ve adenozin ile biten bir poli-A kuyruğunun daha az sayılı ya da adenozin ile bitmeyen bir kuyruğa göre çok daha verimli olduğu gösterilmiştir. Bu farklı yapısal oluşumlarda yapılan optimizasyonların beraber kullanılması mRNA'nın verimini 100 kat artırabilmektedir.<sup>[17]</sup> Haberci RNA'nın dayanıklılığını artırmaya yönelik optimizasyonlara ek olarak mRNA tarafından kodlanan antijenin MHC molekülleri üzerinde daha verimli olarak sunulmasını sağlamak için de antijeni kodlayan gen dizisine bir takım yönlendirici diziler eklenebilmektedir.<sup>[18]</sup>

Haberci RNA, bakteriyofaj RNA polimeraz promotörü içeren bir DNA vektöründen *in vitro* transkripsiyon yöntemi ile sentezlenir. Bunun için, DNA vektörü mRNA transkripsiyon bölümünü içeren dizi sonundan kesilerek lineer duruma getirilir ve gerekli ribonükleotitler ve uygun bakteriyofaj polimerazı ile bu vektörden transkripte edilir. Cap analogu, tıpkı poli-A kuyruğu gibi transkripsiyon reaksiyonunun içine katılabileceği gibi rekombinant bir enzim ile transkripsiyon sonrası da eklenebilir. Reaksiyon sonrasında DNA vektörü deoksiribonükleaz enzimleri ile parçalanabilir. Bununla birlikte transkripsiyon reaksiyonu sonrası mRNA'nın diğer bileşenlerden ayrıştırılması gerekir. Basit tuz ile çöktürme işlemleri ile mRNA diğer bileşenlerden ve reaksiyon artıklarından

temizlenebilmektedir. Klinik düzeyde mRNA ayrıştırılmasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu sayede polimeraz enziminin hatalı çalışması sonucu oluşabilecek diğer küçük RNA'lar da temizlenebilmektedir. Buna ek olarak klinik düzeyde RNA steril filtrasyon işlemine ek olarak, yapısal olarak karakterize edilmekte ve endotoksin testi gibi kontaminasyon testlerinden geçirilmektedir.

### **Deri İçi ve Lenf Dügümü mRNA Aşıları ile Yapılan Klinik Öncesi ve Klinik Çalışmalar**

2000 yılında farelerin kulak derisi içine injekte edilen ve beta-galaktosidaz kodlayan mRNA aşısı, bu antijene özgü antikor ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri yanıtlarının oluşmasını sağlayarak bu alandaki ilk çalışma olmuştur.<sup>[10]</sup> GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) gibi adjuvantların mRNA ile birlikte kullanımı<sup>[19]</sup> ve mRNA'nın protamin ile birleştirilerek deri içine verilmesi de aynı şekilde antijene özgü bağışıklık sistemi yanıtını oluşturmuştur.<sup>[20]</sup> Bu klinik öncesi çalışmalardan sonra bu tür RNA aşıları klinikte de denenmeye başlanmıştır. Yapılan ilk klinik çalışmada, tümörde bulunan antijenlerden yapılan bir mRNA kütüphanesi GM-CSF adjuvant kullanılarak III ve IV seviye melanoma hastalarına başarı ile uygulanmış ve tümöre etkili klinik düzeyde bir yanıt alınamamasına rağmen hastaların yarısından fazlasında antikor ve T hücreleri yanıtı gözlemlenmiştir.<sup>[21]</sup> Melan-A, tyrosinaz, gp10, Mage-A1, Mage-A3 ve surviving gibi tümöre özgü antijenleri kodlayan mRNA-protamin kompleksleri de yine GM-CSF adjuvant olarak kullanarak metastazlı melanoma hastalarında denenmiştir. Yirmi bir hastadan oluşan bu klinik çalışma sonucunda hastalardan birinin akciğer metastazlarında ciddi küçülmeler gözlemlenmiştir.<sup>[22]</sup> Bunlara ek olarak yine benzer RNA'ları içeren bir mRNA aşısı, evre IV renal hücre kanseri hastalarına deri içi yolu ile injekte edilmiş ve hastaların yarısında hastalığın ilerlemesi en az üç ay durdurulmuştur.<sup>[23]</sup>

Haberci RNA'nın hem tek olarak hem de protamine bağlı mRNA ile beraber deri içine injekte edilmesi ile oluşturulan yeni nesil mRNA aşıları ile birlikte klinik öncesi güçlü T hücre yanıtı gözlemlenmiş olup, fare tümör modellerinde ciddi seviyede koruyucu ve tedavi edici etkisi gösterilmiştir.<sup>[24]</sup> Bu çalışmaya dayanarak, yeni nesil mRNA/mRNA-protamin aşıları farklı endikasyonlarda klinikte denenmektedir. Kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarında yapılan Faz I/II çalışmasında, bu kansere özgü antijenleri (PSA, PSMA, PSCA, STEAP1) kodlayan mRNA aşısı iyi tolere edilmiş ve 33 hastanın %80'inde antijene özgü bağışıklık yanıtı oluşturmuştur. Bu yanıt her hasta için aşıda kullanılan birçok antijene yönelik olup, bu durum daha uzun sağkalım ile istatistiksel olarak ilişkilendirilmiştir.<sup>[25]</sup> Küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı yapılan Faz I/II

klinik çalışmada ise mRNA aşısı kokteyli bu kansere özgü beş antijen (NY-ESO1, MAGE C1, MAGE C2, 5T4 ve survivin) kullanılarak denenmiş ve hastaların %65'inde önemli T hücreleri yanıtı alınmıştır. Bu klinik deneylere ek olarak yeni nesil mRNA/mRNA-protamin aşılarının hem tek olarak hem de radyasyon tedavisi ile birlikte diğer kanser türlerinde de denenmesi planlanmaktadır.

Haberci RNA'nın direkt olarak lenf düğümlerine injeksiyonu ise klinik seviyeye ulaşmış ikinci stratejidir. Lenf düğümleri yüksek miktarda dendritik hücre içerdiğinden ve de T hücreleri ile dendritik hücrenin T hücrelerinin aktivasyonu için bir buluşma yeri görevi gördüğünden mRNA'nın direkt olarak buraya injeksiyonu düşünülmüştür. Böylece deri içine injekte yönteminin aksine mRNA'yı alan hücrelerin lenf düğümlerine göçüne gerek kalmamaktadır. Lenf düğümlerine injekte edilen mRNA, dendritik hücrelere ulaşarak makropinositoz adı verilen bu hücrelere özgü bir mekanizma ile hücreden içeri alınmaktadır.<sup>[26]</sup> Bu yöntemle fare deneylerinde değişik antijenlere karşı güçlü CD4 ve CD8 hücre yanıtı gözlemlenmiştir.<sup>[11]</sup> Ayrıca dendritik hücreler mRNA'nın adjuvant etkisi ile bağışıklık sistemini uyarıcı değişik sitokinler ve kemokinler salgılayarak T hücrelerini lenf düğümlerine çekebilmektedir. Lenf düğümlerinde oluşturulan bu faktörler tümöre karşı daha güçlü ve yüksek seviyede bir T hücre yanıtına imkan vermektedir. Bu tür kanser aşılarının etkisi, FLT3L gibi dendritik hücreler için doğal bir büyüme faktörünün rekombinant protein olarak aşısı ile beraber verilmesi ile daha da artırılmıştır.<sup>[27]</sup> Hafıza T hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilen ve aslında klinikte nakledilen organların kabulünü kolaylaştıran rapamycin adlı ilaç da klinik öncesi bir çalışmada bu aşısı türü ile beraber kullanılmış ve hem hafıza T hücreleri sayısı hem de tümöre karşı etkin yanıtta istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir.<sup>[28]</sup> Van Lint ve ark.<sup>[29]</sup> ise antijen kodlayan mRNA'yı, bağışıklık sistemini aktive edici molekülleri kodlayan mRNA'lar (CD40L, CD70, her zaman aktif TLR4 reseptörü) ile birlikte lenf düğümlerine vererek aşının etkinliğini yükseltmiştir.

Bu tür mRNA aşıları, insanda ultrason yardımı ile herhangi bir cerrahi girişime gerek kalmadan çeşitli lenf düğümlerine injekte edilebilmekte olup, melanoma hastalarında Faz I klinik çalışmalar çerçevesinde denenmektedir.

### **Kişiyeye Özgü mRNA Kanser Aşıları**

Kansere neden olan mutasyonlar, protein dizisinde değişikliklere neden olup, bağışıklık sistemi tarafından tanınabilen kansere özgü yeni antijenlerin ortaya çıkmasına olanak tanımaktadır. Bu mutasyonlar sadece kanser hücrelerinde olduğundan, verilen immünolojik yanıtın sağlıklı hücrelere zarar vermesi beklenmemektedir.

Gelişen dizileme teknolojileri ile günümüzde tümörlerin genetik ve immünolojik profilleri kapsamlı bir şekilde çıkarılabilmektedir.<sup>[30]</sup> Yapılan son çalışmalara göre tümörlerdeki mutasyon sayısı 10-100 arasında değişmekte<sup>[31-33]</sup> ve daha da önemlisi bu mutasyonların %95'i dizilenen tümöre özgü olmaktadır.<sup>[34]</sup> Bu yüzden kişinin tümörünün genetik ve immünolojik profiline göre bir kanser aşısı kullanılması gerekmektedir. Haberci RNA aşuları bu aşamada diğer formatlara göre hızlı ve ölçeklenebilen GMP üretimi ve kolay tasarımı ile öne çıkmaktadır. Tümör hücrelerinin dizilenmesi ile elde edilen ve mutasyon içeren antijenler, bir ya da bir kaç mRNA'da toplanabilir ve kısa sürede hazır hale gelen mRNA ile kişiye özgü kanser tedavisi uygulanabilir. Bu tür aşılar için yapılan ilk klinik öncesi çalışmada B16 fare melanom hücrelerinden yeni nesil dizileme ile elde edilen mutasyonların %20-30'unun immünojenik olduğu bulunmuş ve bu mutasyonları kodlayan mRNA'ların farelerin lenf düğümlerine verilmesi sonucu T hücre yanıtları ile B16 tümörü taşıyan farelerde daha uzun sağkalımlar gözlemlenmiştir.<sup>[35]</sup> Bu sonuçlara bakıldığında hızlı bir şekilde belirlenen mutasyon profillerinin mRNA'nın getirdiği avantajlarla kombine edilerek, klinik düzeyde kullanılabilir bu tür kişiye özgü mRNA kanser aşılarının geliştirilmesi gerçekçidir. Nitekim 2013 yılının sonunda melanom hastalarında bu platform kullanılarak bir Faz I klinik çalışma başlatılmış olup sonuçları beklenmektedir.

Sonuç olarak, yaklaşık 25 yıl önce başlayan mRNA'nın protein translasyonu için kullanımı, günümüzde bu molekülün aktif bir kanser aşısı olarak kullanılmasını sağlamıştır. Yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmalarda mRNA'nın bir ilaç olarak güvenilirliği ortaya konulmuş olup birçok çalışmada hem bağışıklık sistemi yanıtları hem de tümöre karşı etkiler gözlemlenmiştir. Gelişen mRNA teknolojileri ve mRNA aşılarının kanser tedavisinde kullanılan diğer yöntemler (radyoterapi, kemoterapi, antikorlar) ile kombinasyonlarının etkileri yürümekte olan ya da yakın bir zamanda başlayacak klinik çalışmalarda takip edilecektir.

### Teşekkür

Yazar, yazının Türkçe gramer kontrolü için Elif Söğütçü'ye teşekkür eder.

### Çıkar çakışması beyanı

Yazar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmiştir.

### Finansman

Yazar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadığını beyan etmiştir.

### KAYNAKLAR

1. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. Clin Orthop Relat Res 1991;(262):3-11.
2. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N Engl J Med 2010;363:411-22.
3. Pascolo S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). Handb Exp Pharmacol 2008;(183):221-35.
4. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 1990;247:1465-8.
5. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. Cancer Res 1995;55:1397-400.
6. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. J Exp Med 1996;184:465-72.
7. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. Blood 2001;98:49-56.
8. Ponsaerts P, Van den Bosch G, Cools N, Van Driessche A, Nijs G, Lenjou M, et al. Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid in vitro differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. J Immunol 2002;169:1669-75.
9. Van Lint S, Heirman C, Thielemans K, Breckpot K. mRNA: From a chemical blueprint for protein production to an off-the-shelf therapeutic. Hum Vaccin Immunother 2013;9:265-74.
10. Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. Eur J Immunol 2000;30:1-7.
11. Kreiter S, Selmi A, Diken M, Koslowski M, Britten CM, Huber C, et al. Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. Cancer Res 2010;70:9031-40.
12. Pasquinnelli AE, Dahlberg JE, Lund E. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. RNA 1995;1:957-67.
13. Jemielity J, Fowler T, Zuberek J, Stepinski J, Lewdorowicz M, Niedzwiecka A, et al. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties. RNA 2003;9:1108-22.
14. Peng ZH, Sharma V, Singleton SF, Gershon PD. Synthesis and application of a chain-terminating dinucleotide mRNA cap analog. Org Lett 2002;4:161-4.
15. Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, Selmi A, Kowalska J, Jemielity J, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. Gene Ther 2010;17:961-71.
16. Yu J, Russell JE. Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human beta-globin mRNA. Mol Cell Biol 2001;21:5879-88.
17. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. Blood 2006;108:4009-17.
18. Kreiter S, Selmi A, Diken M, Sebastian M, Osterloh P, Schild H, et al. Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. J Immunol

- 2008;180:309-18.
19. Carralot JP, Probst J, Hoerr I, Scheel B, Teufel R, Jung G, et al. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2418-24.
  20. Scheel B, Aulwurm S, Probst J, Stitz L, Hoerr I, Rammensee HG, et al. Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA. *Eur J Immunol* 2006;36:2807-16.
  21. Weide B, Carralot JP, Reese A, Scheel B, Eigentler TK, Hoerr I, et al. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J Immunother* 2008;31:180-8.
  22. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother* 2009;32:498-507.
  23. Rittig SM, Haentschel M, Weimer KJ, Heine A, Muller MR, Brugger W, et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8+ and CD4+ immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. *Mol Ther* 2011;19:990-9.
  24. Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, Pfeiffer R, Ojkić-Zrna S, Probst J, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother* 2011;34:1-15.
  25. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, et al. Multipetide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 2012;18:1254-61.
  26. Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Türeci Ö, et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. *Gene Ther* 2011;18:702-8.
  27. Kreiter S, Diken M, Selmi A, Diekmann J, Attig S, Hüsemann Y, et al. FLT3 ligand enhances the cancer therapeutic potency of naked RNA vaccines. *Cancer Res* 2011;71:6132-42.
  28. Diken M, Kreiter S, Vascotto F, Selmi A, Attig S, Diekmann J, et al. mTOR inhibition improves antitumor effects of vaccination with antigen-encoding RNA. *Cancer Immunol Res* 2013;1:386-92.
  29. Van Lint S, Goyvaerts C, Maenhout S, Goethals L, Disy A, Benteyn D, et al. Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy. *Cancer Res* 2012;72:1661-71.
  30. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 2013;155:27-38.
  31. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, et al. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 2011;43:464-9.
  32. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-74.
  33. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B: The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007, 318:1108-1113.
  34. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 2011;331:1553-8.
  35. Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, Löwer M, van de Roemer N, de Graaf J, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 2012;72:1081-91.