

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО**

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнології та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття ОС бакалавра

на тему: **“Біотехнологія виробництва мРНК-вакцин”**

Виконав студент 5 курсу

Спеціальності 162 “Біотехнології та біоінженерія”

Лешик В. Я.

Керівник: д. с.-г. н., проф. Буцяк В.І.

Рецензент: д. вет. н., проф. Гутий Б. В.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту в ДЕК, протокол №__від_____2025р

Завідувач кафедри біотехнології та радіології, проф.

Василь БУЦЯК

Львів – 2026

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького
(повне найменування вищого навчального закладу)

Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнології

Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнології та радіології

Освітньо-кваліфікаційний рівень бакалавр

(шифр і назва)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
завідувач кафедри, голова циклової
комісії Буцяк В.І.
“ _____ ” _____ 2025 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Лешику Володимиру Ярославовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема кваліфікаційної роботи “Біотехнологія виробництва мРНК-вакцин”

Керівник кваліфікаційної роботи

Буцяк Василь Іванович, професор

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затвержені наказом вищого навчального закладу від 19.09.2025 року №1130-4

2. Строк подання кваліфікаційної роботи 20.11.2025 року

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи

Вихідні матеріали до виконання роботи: наукова література з технології мРНК-вакцин, нормативні документи GMP, технологічна схема виробництва

мРНК-препаратів, методи синтезу та очищення мРНК, система доставки у ліпідних наночастинках, вимоги до чистих приміщень та обладнання

4. Зміст кваліфікаційної роботи (перелік питань, які потрібно розробити)

вступ, огляд літератури, матеріал та методи досліджень, результати власних досліджень, висновки та пропозиції, список використаної літератури.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) графіки, діаграми, рисунки, технологічні схеми, технологічні лінії), структура мРНК-вакцини, типи конструкцій мРНК, механізм приєднання кепу до мРНК, ознаки якості мРНК, схема проектування приміщень згідно GMP, процес розробки мРНК-вакцин, біореактор для вирощування E.Coli з трансформованою плазмідною ДНК, in vitro транскрипція з використанням T7 РНК-полімерази, процес очищення мРНК за допомоги аніонообмінної хроматографії

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Консультант ПІБ, посада	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
1.Літературний огляд.	проф. Буцяк В.І.		
2.Методика експерименту та основні методи досліджень.	проф. Буцяк В.І.		
3.Експериментальна частина.	проф. Буцяк В.І.		
5.Висновки та пропозиції	проф. Буцяк В.І.		

7. Дата видачі завдання 11.09.2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів магістерської роботи	Термін виконання	примітка
1.	Літературний огляд.		

	I атестація:	06.10.25р.	30%
2.	Методика експерименту та основні методи досліджень.		20%
3.	Експериментальна частина.		35%
	II атестація:	07.11.25р.	55%
5.	Висновки та пропозиції		5%
	III атестація:	27.11.25р.	15%
	Допущено до захисту.	10.02.26р.	100%

Здобувач _____ **Володимир ЛЕШИК**

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник магістерської роботи _____ **Василь БУЦЯК**

(підпис)

(прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	7
ВСТУП	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1.1. Виникнення та прогрес розвитку мРНК-вакцин в історії	11
1.1.2. Характеристика мРНК-вакцинта їх відмінності від традиційних	12
1.1.3. Принцип роботи та склад мРНК-вакцин	14
1.1.4. Сучасний розвиток мРНК-вакцин в Україні	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	21
2.1. Матеріально-технічне забезпечення виробництва мРНК-вакцин	21
2.2. Обладнання та технологічні параметри виробництва мРНК-вакцин	24
2.3. Вимоги GMP до виробництва мРНК-вакцин	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	30
3.1. Процес виробництва мРНК-вакцин.....	

30	
3.1.1. Підготовка обладнання та комунікацій	30
3.1.2. Загальні принципи виробництва мРНК-вакцин	31
3.2. Перспектива застосування мРНК-технологій.....	41
3.2.1. мРНК-вакцини проти інфекційних та неінфекційних захворювань	41
3.2.2. мРНК у онкології: персоналізовані вакцини та неоантигенні платформи.	44
3.3. Переваги та недоліки платформного підходу мРНК	45
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	51

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота виконана на 53-х сторінках комп'ютерного тексту, складається з вступу, анотації, переліку умовних скорочень, огляду літератури, матеріалу і методу досліджень, результатів власних досліджень, висновків, списку літератури, міститься 11 малюнків, 3 таблиці. Загальне опрацьовано 60 наукових джерел.

Ключові слова: мРНК-вакцини, біофармацевтичне виробництво, *in vitro* транскрипція, плазмідна ДНК, ліпідні наночастинки, контроль якості, чисті приміщення, інкапсуляція препаратів, масштабування виробництва, імуногенність.

Кваліфікаційна робота на тему: “Біотехнологія виробництва м-РНК вакцин” сконцентрована на питаннях виробництва вакцин на основі матричної РНК. Платформа м-РНК є новітнім напрямом у сучасній вакцинології, який поєднує гнучкість молекулярного дизайну, відсутність використання живих збудників та високу імуногенність. У роботі розглядаються історичні передумови появи м-РНК вакцин, принципи їх дії та біотехнологічні особливості виробництва. Особливу увагу приділено технологічним рішенням, що забезпечують стабільність, ефективну доставку та синтез антигену у клітинах реципієнта.

Актуальність теми визначається швидким розвитком генно-інженерних технологій, а також розширенням можливостей застосування м-РНК платформи поза інфекційними захворюваннями. Пандемія COVID-19 сприяла інтенсивному впровадженню м-РНК технології у фармацевтичну індустрію та стала важливим етапом її становлення.

Об'єкт дослідження – технологія виробництва мРНК-вакцин як біофармацевтичних препаратів.

Предмет дослідження – технологічні етапи синтезу, очищення, формуляції та контролю якості мРНК-вакцин

Мета роботи: аналіз біотехнологічних принципів виробництва вакцин на основі м-РНК та розгляд історичних, наукових і технологічних аспектів розвитку платформи.

У процесі дослідження передбачається вивчення наступних завдань:

- дослідження структурних особливостей мРНК;
- вивчити механізми доставки мРНК-вакцин в клітину;
- проаналізувати виробничі підходи та можливості застосування мРНК-технології в майбутньому;
- охарактеризувати технічні особливості виробництва мРНК-вакцин згідно GMP.

ВСТУП

Вакцинопрофілактика є одним із ключових інструментів контролю інфекційних захворювань та підтримання громадського здоров'я. Історично вакцини створювали на основі живих атенуйованих або інактивованих патогенів, а також очищених білкових антигенів або їх фрагментів [1]. Поява біотехнологічних платформ, орієнтованих на молекулярні механізми індукції імунної відповіді, сприяла розширенню можливостей сучасної вакцинології [2].

Пандемія COVID-19 стала визначальним періодом для практичного застосування та розвитку технології мРНК-вакцин. Уперше було продемонстровано можливість швидкого проектування вакцин на основі генетичної послідовності патогену з мінімальними часовими затратами між ідентифікацією вірусу та створенням готового препарату. Цей підхід дав змогу використовувати гнучкість молекулярного дизайну, відсутність живого збудника у складі препарату та високу імунологічну ефективність.

Особливістю мРНК-вакцин є те, що готові білкові антигени не вводяться в організм; натомість антиген синтезується власними клітинами реципієнта на основі введеної мРНК. Така концепція відкриває перспективи не лише для інфекційної профілактики, але й для імунної терапії, зокрема онкологічної.

Актуальність теми дипломної роботи зумовлена міждисциплінарністю технології мРНК, яка об'єднує молекулярну біологію, біотехнологію, фармацевтичну інженерію, регуляторні процеси та виробничу практику.

Метою дипломної роботи є аналіз біотехнологічних принципів виробництва мРНК-вакцин з урахуванням історичних, наукових та технологічних аспектів розвитку платформи.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

м-РНК - матрична рибонуклеїнова кислота

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК - рибонуклеїнова кислота

ORF - відкрита рамка зчитування (Open Reading Frame)

UTR - некодуючі регіони м-РНК (Untranslated Regions)

LNP - ліпідні наночастинки (Lipid Nanoparticles)

Poly(A) - поліаденіловий хвіст

Cap - кеп-структура на 5'-кінці м-РНК

TLR - Toll-подібні рецептори (Toll-Like Receptors)

MHC - головний комплекс гістосумісності (Major Histocompatibility Complex)

APC - антигенпрезентувальні клітини (Antigen-Presenting Cells)

CD4+ - Т-хелпери

CD8+ - цитотоксичні Т-лімфоцити

WHO - Всесвітня організація охорони здоров'я (World Health Organization)

CDC - Центри контролю та профілактики захворювань США (Centers for Disease Control and Prevention)

EMA - Європейське агентство з лікарських засобів (European Medicines Agency)

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1.1 Виникнення та прогрес розвитку мРНК-вакцин в історії

Концепція використання матричної рибонуклеїнової кислоти як інструмента для терапевтичних і профілактичних цілей бере початок у другій половині ХХ століття, після встановлення ролі мРНК у механізмах передачі генетичної інформації та трансляції білків [3]. Однак тривалий час практичне застосування мРНК у медицині залишалося недосяжним через високу нестабільність молекули, її чутливість до нуклеаз та недостатню ефективність доставки у клітини [4].

Перші роботи, які продемонстрували можливість експресії білка після введення синтетичної мРНК *in vivo*, були опубліковані на початку 1990-х років [5]. Ці дані підтвердили принципову здійсненність терапевтичного підходу, однак проблеми деградації та імунної активації суттєво обмежували його подальший розвиток.

Проривною стала поява ідеї хімічних модифікацій мРНК. Впровадження модифікованих нуклеозидів, зокрема псевдоуридину та N1-метилпсевдоуридину, дало змогу пригнічувати імунну реактивність, зменшити розпізнавання Toll-подібними рецепторами та підвищити ефективність трансляції [6, 7].

Ці результати стали основою сучасної платформи мРНК-вакцин. Паралельно вдосконалювалися системи доставки. Спочатку експериментували з катіонними ліпідами та полімерними носіями, однак ключовим технологічним рішенням стало застосування ліпідних наночастинок (LNP), що забезпечили ефективний транспорт мРНК у цитозоль клітини та захист від деградації [8].

До початку пандемії COVID-19 мРНК-платформа вже активно досліджувалася в онкоімунології, зокрема як підхід для створення персоналізованих терапевтичних вакцин на основі пухлинних неоантигенів [9].

Пандемія SARS-CoV-2 стала каталізатором масштабного впровадження мРНК-технологій у клініку, що дозволило унікально швидко отримати вакцини без використання живих патогенів [10].

Висока наукова та суспільна цінність розробок у цій галузі була відзначена присудженням Нобелівської премії з фізіології та медицини 2023 року Katalin Karikó та Drew Weissman за внесок у розвиток нуклеозидних модифікацій та платформних технологій мРНК [11].

1.1.2. Характеристика мРНК-вакцин та їх відмінності від традиційних

мРНК-вакцини належать до генетичних вакцинних платформ, що використовують синтетичну матричну РНК як носій інформації для внутрішньоклітинного синтезу антигенного білка. На відміну від традиційних вакцинних стратегій, де антиген вводять у вигляді готового білка або цілого патогену (атенуйованого чи інактивованого), мРНК-платформа забезпечує ендогенний синтез антигену в клітинах організму реципієнта [12, 13].

Структурно мРНК-вакцини містять 5'-кеп-структуру, нетрансляційні ділянки (UTR), відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує антиген, та полі(А)-хвіст. Хімічні модифікації нуклеозидів зменшують імунну реактивність та підвищують трансляційну ефективність, що є вирішальним для платформи [14]. (рис.1.1)

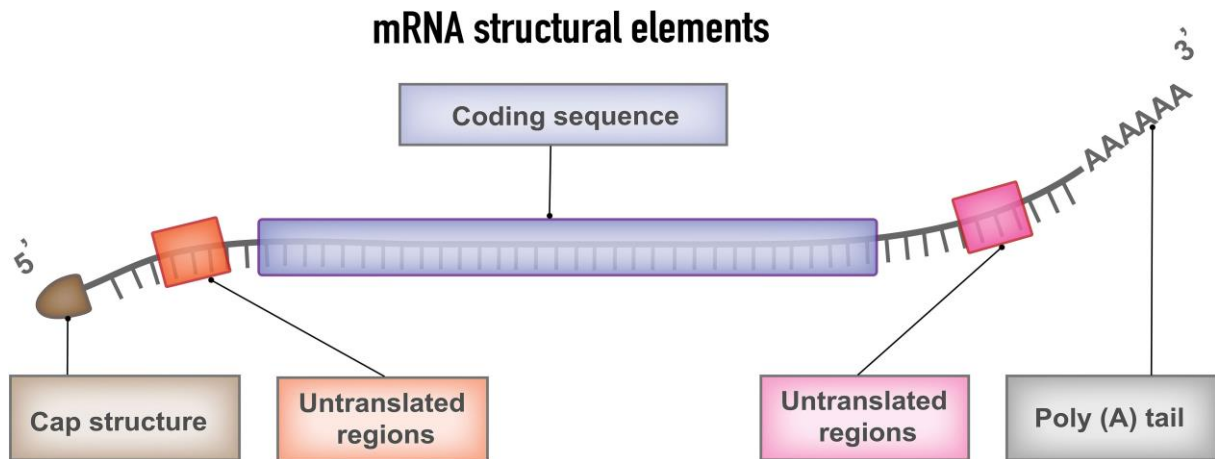


Рис.1.1. Структура мРНК вакцини

За способом подання антигену мРНК-вакцини відрізняються від таких груп:

- **живі атенуйовані вакцини**, що забезпечують потужну імунну відповідь, але можуть бути протипоказані імунокомпрометованим пацієнтам [15];
- **інактивовані вакцини**, які характеризуються високим профілем безпеки, але потребують використання ад'ювантів [16];
- **субодиничні вакцини**, що містять рекомбінантні білки або їх фрагменти та вимагають складних виробничих процесів [17];
- **векторні вакцини**, які використовують вірусні вектори для доставки генетичного матеріалу, але їх ефективність може обмежуватися попередньою імунізацією проти вектора [18].

мРНК-вакцини уникають цих обмежень завдяки відсутності живого патогену чи вірусного вектора та можливості безклітинного виробництва, що суттєво спрощує масштабування [10, 13].

Додатковою перевагою є здатність індукувати як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь через презентацію антигенів у комплексі з МНС I та МНС II (рис. 1.2) [19].

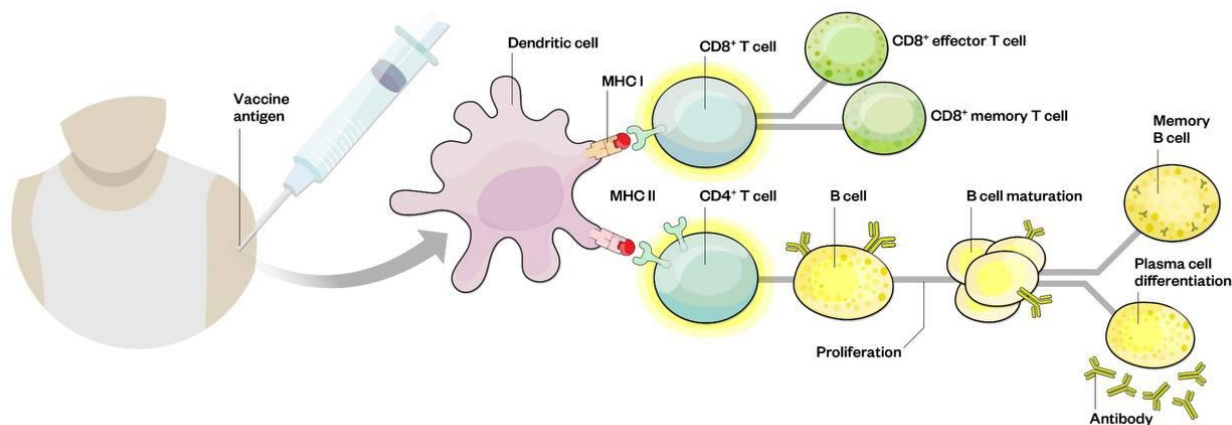


Рис. 1.2 Процес імунної відповіді

З технологічного погляду мРНК-платформа є універсальною, оскільки зміна антигену потребує лише модифікації нуклеотидної послідовності ORF, без перебудови основного виробничого процесу [13].

1.1.3 Принцип роботи та склад мРНК-вакцин

Основна ідея використання мРНК у вакцинології полягає в доставці до клітини-господаря синтетичного транскрипту, який кодує один або кілька антигенів. Після потрапляння мРНК до цитоплазми вона транлюється рибосомами, у результаті чого утворюється білковий продукт, що може залишатися мембранно-зв'язаним, секретуватися або функціонувати всередині клітини [2, 20, 21].

На сьогодні активно досліджуються дві основні технологічні платформи мРНК: нереплікативні (NRM) та самореплікативні (SAM). Обидва типи містять необхідні регуляторні елементи – 5'-кеп-структуру, нетрансляційні ділянки на

5'- та 3'-кінцях (UTR), відкритої рамки зчитування (ORF) та полі(A)-хвіст [21, 24].

Нереплікативні конструкції (NRM) кодують лише антигенний білок та після доставки одразу використовуються клітинним апаратом трансляції. Самоампліфікаційні конструкції (SAM) додатково містять генетичний модуль реплікації, запозичений у позитивно-ланцюгових РНК-вірусів, переважно альфавірусів (наприклад, Sindbis або Semliki Forest). У таких реплікативних системах вірусні структурні білки замінюються на цільовий антиген, тоді як РНК-залежна РНК-полімераза зберігається та забезпечує внутрішньоклітинну ампліфікацію мРНК [22, 25].

Перевагою SAM-конструкцій є підвищений рівень експресії антигену завдяки реплікації транскрипту в цитоплазмі, тоді як NRM характеризуються простішою структурою та більш передбачуваним профілем безпеки. Порівняльна оцінка цих платформ залишається предметом подальших досліджень [24].

Обидва типи мРНК зазвичай інкапсулюють у ліпідні наночастинки (LNP), які захищають транскрипт від деградації та сприяють його поглинанню клітинами (рис. 1.3) [8, 12, 29].

Доставка мРНК у клітину найчастіше здійснюється шляхом ендоцитозу. Після виходу з ендосоми мРНК потрапляє до цитозолю, де нереплікативні конструкції безпосередньо транслуються рибосомами з утворенням цільового білка, який проходить необхідні посттрансляційні модифікації. У випадку SAM спочатку синтезується комплекс реплікази, що забезпечує ампліфікацію РНК, після чого відбувається синтез антигену [24].

Синтезовані білки можуть бути секретованими, мембранними або локалізуватися всередині клітини. Експресовані антигени розпізнаються елементами вродженого та адаптивного імунітету [2, 20, 27].

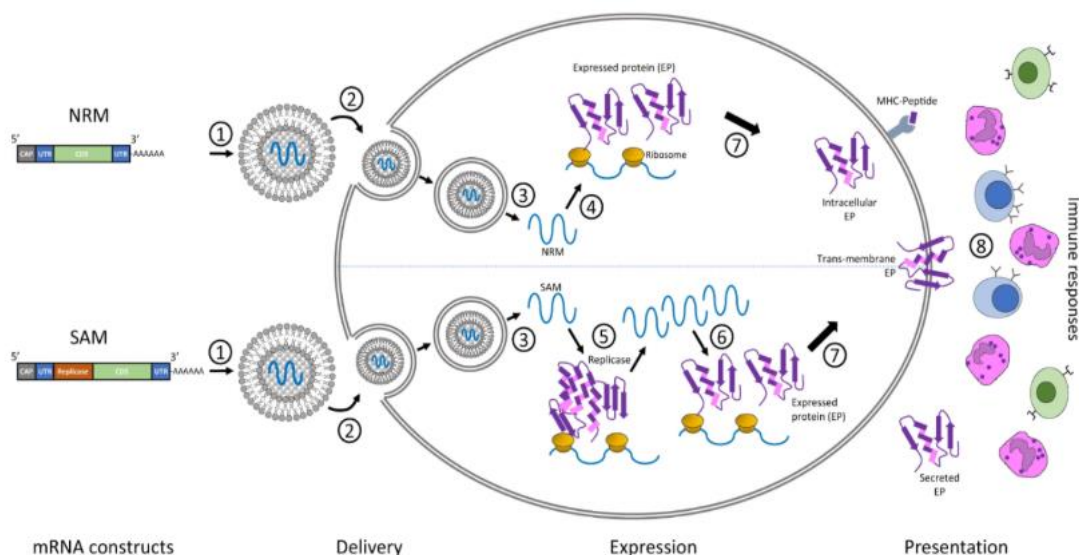


Рис. 1.3 Два типи конструкцій мРНК

Виробництво мРНК-конструкцій розпочинається зі створення плазмідної ДНК, яка містить промотор ДНК-залежної РНК-полімерази (наприклад, Т7) та відповідну послідовність для синтезу майбутньої мРНК [2, 5, 10].

Після цього плазмідна лінеаризується й використовується як матриця для *in vitro* транскрипції, що здійснюється ДНК-залежною РНК-полімеразою з утворенням мРНК [2, 28].

На наступному етапі матриця ДНК видаляється шляхом обробки ДНКазою. Формування 5'-кеп-структури та 3'-полі(А)-хвоста може відбуватися безпосередньо під час *in vitro* транскрипції або включатися окремо шляхом ферментативної модифікації після транскрипції.

Ферментативне кепування здійснюють за допомогою гуанілілтрансферази та 2'-О-метилтрансферази, що дозволяє отримати кеп-структуру типу 0 (N7Me-GpppN) або типу 1 (N7Me-GpppN-2'-ОМе) [26]. Додавання полі(А)-хвоста може проводитися полі(А)-полімеразою (рис. 1.3.). [4, 26].

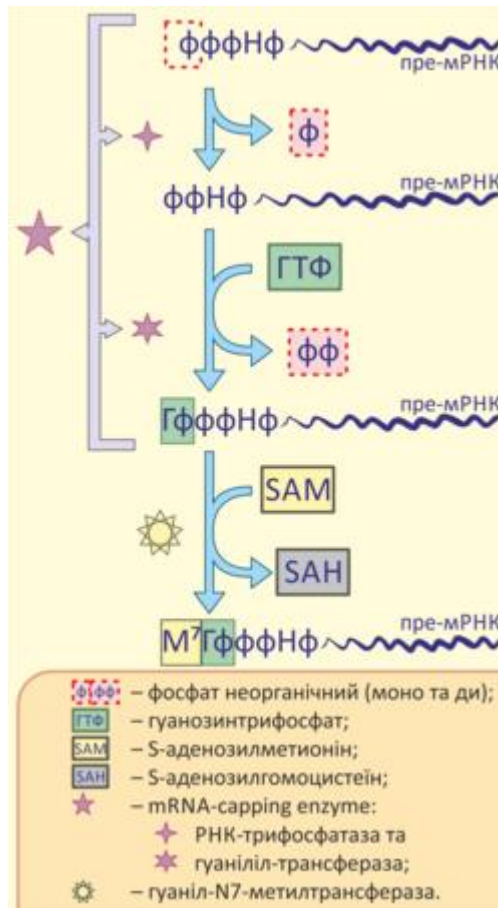


Рис. 1.4 Схематичний механізм приєднання кепу до мРНК

Після синтезу відбувається важливий етап очищення, який зазвичай виконують із використанням високоефективної рідинної хроматографії. Очищена мРНК слугує активною лікарською субстанцією, яка далі формулюється у лікарський препарат і підлягає контролю якості, включно з тестуванням на стерильність, відповідність, чистоту та біологічну активність [2, 28].

Такі технологічні етапи дають можливість виробничим майданчикам, що працюють відповідно до стандартів належної виробничої практики (GMP), досить швидко адаптуватися до синтезу нових вакцинних конструкцій [1, 10].

Після доставки мРНК у цитоплазму клітини основним завданням конструкції є максимально ефективно використання апарату трансляції

клітини-господаря для утворення достатньої кількості кодованого антигену, який згодом буде розпізнаний імунною системою [2, 7]. На глобальному рівні ключовим напрямом оптимізації залишаються характеристики мРНК, що визначають рівень експресії білка.

Одним із вирішальних параметрів є чистота мРНК, оскільки в процесі *in vitro* транскрипції РНК-полімерази можуть генерувати побічні продукти – зокрема олігорибонуклеотиди та дволанцюгові РНК-фрагменти [28].

Дволанцюгова РНК може індукувати синтез інтерферону I типу та стимулювати запальні цитокіни через рецептори розпізнавання патернів. Було показано, що видалення таких домішок знижує активацію вродженого імунітету та значно підвищує експресію репортерних білків у культурі клітин [28].

Для досягнення високої ефективності виділяють п'ять основних факторів: кеп-структуру, регуляторні елементи та довжину 5'- і 3'-UTR, модифікацію кодуєчої області, характеристики полі(А)-хвоста та ступінь очищення мРНК (рис. 1.5) [2, 21, 24].

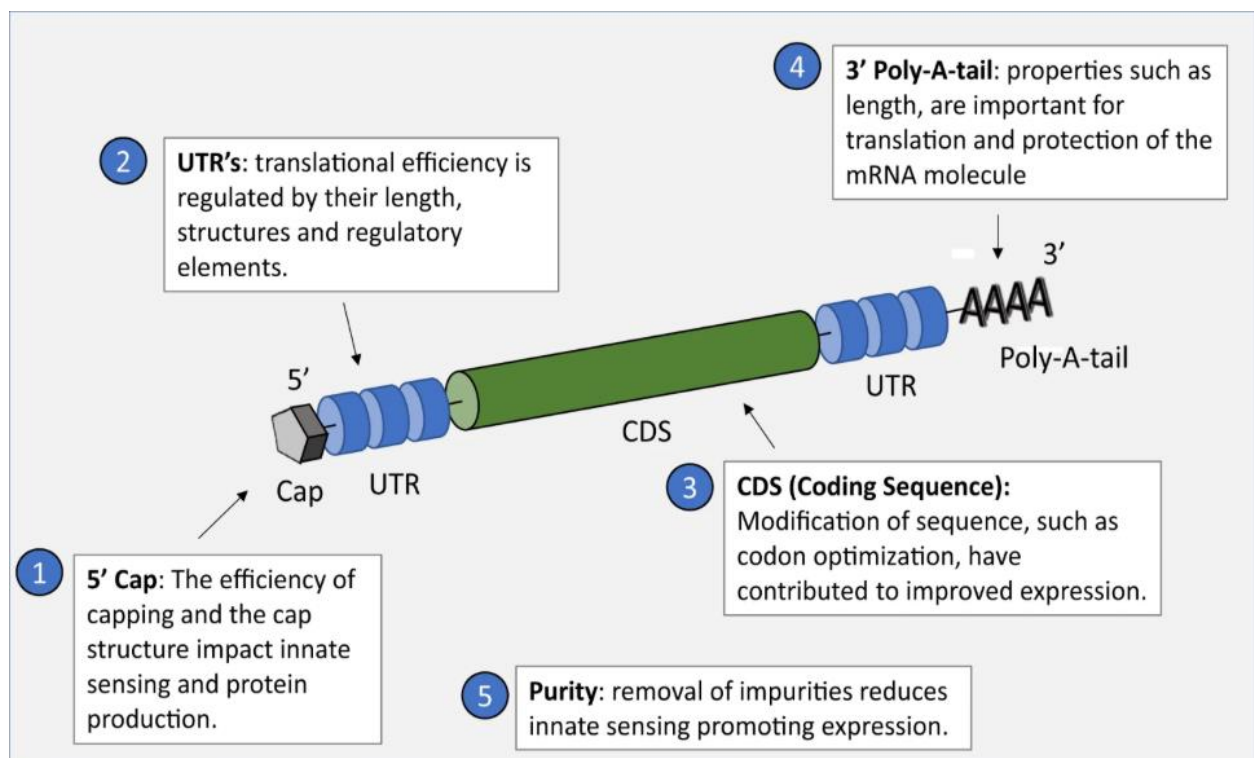


Рис. 1.5 Ознаки якості мРНК

UTR-ділянки на 5'- та 3'-кінцях відіграють особливо важливу роль у посиленні трансляції. Їх довжина, вторинні структури та наявність регуляторних мотивів істотно впливають на рівень експресії [21, 27].

Крім того, 5'-кеп є необхідним для ефективного запуску трансляції та стабільності молекули, оскільки він блокує 5'-3'- деградацію та забезпечує правильну взаємодію з факторами ініціації [26].

По-четверте, полі(А)-хвіст та його характеристики, зокрема довжина, є ключовими для ефективності трансляції та забезпечують додатковий захист мРНК від деградації [26].

Важливим напрямом оптимізації є корекція кодонного складу та внесення модифікованих нуклеотидів, що сприяє підвищенню ефективності трансляції. Зокрема, збільшення частки гуанін-цитозинових (GC) пар може суттєво впливати на рівень експресії [27].

Одночасно вроджена імунна активація мРНК може обмежувати її функціональність як платформи доставки антигену. Застосування модифікованих нуклеозидів, таких як псевдоуридин або N-1-метилпсевдоуридин, дозволяє мінімізувати розпізнавання мРНК внутрішньоклітинними сенсорними механізмами та пригнічувати активність протеїнкінази [6, 7, 27].

Поряд із оптимізацією самої конструкції мРНК критично важливим є забезпечення її ефективною доставкою з місця введення до цитоплазми клітини, де запускається процес трансляції. Оскільки мРНК є нестабільною та швидко деградує під дією нуклеаз, вона потребує належного захисту [2, 8].

На сьогодні накопичено чимало доказів успішного застосування ліпідних наночастинок (LNP) для транспортування мРНК як у терапевтичних підходах, так і в вакцинних платформах [8, 12, 29].

1.1.4 Сучасний розвиток мРНК-вакцин в Україні

На сьогодні в Україні відсутні власні виробничі потужності з виготовлення вакцин, зокрема мРНК-вакцин. Фармацевтична компанія «Дарниця» заявила, що Всесвітня організація охорони здоров'я офіційно визначила її єдиним українським підприємством, яке отримує доступ до технологій виробництва мРНК-вакцин [30]. Починаючи з квітня 2022 року Україна включена до переліку держав, які залучені до міжнародних програм із передачі таких технологій [30].

Окрім вакцин проти COVID-19, у світі активно тривають дослідження мРНК-платформ у напрямках створення вакцин проти ВІЛ, а також у галузі онкологічної імунотерапії [19, 31]. Розгортання власної технологічної бази дозволило б Україні суттєво посилити національний біофармацевтичний сектор і забезпечити вихід на якісно новий рівень розвитку галузі.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріально-технічне забезпечення виробництва мРНК-вакцин

Сучасне виробництво мРНК-вакцин належить до високотехнологічних напрямів біофармацевтичної промисловості та потребує розвиненої матеріально-технічної інфраструктури, що відповідає міжнародним стандартам належної виробничої практики (Good Manufacturing Practice, GMP). Основною метою організації такого виробництва є забезпечення стабільності технологічних процесів, запобігання контамінації продукції та гарантування її якості й безпечності для пацієнтів [1].

Проектування виробничого комплексу здійснюється за принципом функціонального зонування, яке передбачає чітке розмежування технологічних потоків сировини, персоналу та готової продукції. Такий підхід мінімізує ризик перехресного забруднення та забезпечує контрольованість виробничого середовища [2].

До складу підприємства зазвичай входять:

- ділянки отримання плазмідної ДНК
- зони проведення *in vitro* транскрипції
- приміщення для очищення мРНК
- формуляції препарату в ліпідні наночастинки, асептичного наповнення
- аналітичні лабораторії контролю якості.

Ключовим елементом матеріально-технічної бази є система чистих приміщень. Залежно від стадії виробництва використовуються приміщення класів чистоти А–D відповідно до європейських вимог GMP(таб. 2.1). Найбільш критичні операції, зокрема стерильна фільтрація та наповнення флаконів, виконуються в умовах класу А з фоновим середовищем класу В [3].

Таблиця 2.1.

Операції, які виконуються із різними класами чистоти

Клас чистоти зон	Технологічні операції для продукції, що стерилізується в первинному пакуванні
A	Фасування продуктів, коли ризик для якості продукції внаслідок контамінації майже виключений
C	Приготування розчинів, коли ризик для якості продукції внаслідок контамінації майже виключений. Фасування продукції.
D	Приготування розчинів і підготування компонентів первинного пакування для подальшого фасування

Контроль параметрів повітря включає моніторинг кількості частинок, мікробного навантаження, температури та вологості. (таб. 2.2.) Стабільність мікроклімату забезпечується системами вентиляції та кондиціонування повітря (HVAC), оснащеними HEPA-фільтрами високої ефективності, здатними затримувати не менше 99,97 % частинок розміром від 0,3 мкм [3]. Для запобігання перенесенню забруднень між виробничими зонами підтримується каскадний перепад тиску.

Інженерна інфраструктура біофармацевтичного підприємства включає системи підготовки очищеної води (PW) та води для ін'єкцій (WFI), які широко використовуються під час приготування буферних розчинів і миття обладнання. Важливими складовими є також системи подачі стисненого повітря та інертних газів, резервні джерела електроживлення та комплекси утилізації біологічних відходів [2].

Особливу увагу приділяють роботі з РНК, оскільки ця молекула надзвичайно чутлива до дії рибонуклеаз. У виробничих приміщеннях застосовують спеціальні протоколи деконтамінації, використовують RNase-free матеріали та проводять регулярний моніторинг чистоти поверхонь [4].

Таблиця 2.2.

Рекомендовані межі при мікробіологічному контролі частин зон у функціонуючому стані

Клас	Проба повітря, КУО/м ³	Седиментація на пластину, (д=55 мм) КУО/4 год	Контактні пластини, (д=55 мм), КУО/пластина	Відбиток 5 пальців у рукавичці, КУО/рукавичка
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	–
D	200	100	50	–

Невід'ємною складовою матеріально-технічного забезпечення є лабораторії контролю якості, оснащені сучасним аналітичним обладнанням для визначення фізико-хімічних і біологічних характеристик мРНК. Контроль охоплює оцінку цілісності молекули, концентрації, стерильності, рівня ендотоксинів та ефективності інкапсуляції у ліпідні наночастинки [5].

Значну роль відіграє також холодовий ланцюг. Багато мРНК-препаратів потребують зберігання при низьких або наднизьких температурах (від –20 °С до –80 °С), що вимагає використання спеціалізованих морозильних камер і систем безперервного температурного моніторингу [6].

Отже, матеріально-технічне забезпечення виробництва мРНК-вакцин є комплексною багаторівневою системою, яка поєднує сучасні виробничі приміщення, інженерну інфраструктуру, аналітичні лабораторії та системи контролю середовища. Саме ця сукупність факторів забезпечує відтворюваність технологічних процесів і відповідність продукції міжнародним стандартам якості.

2.2 Обладнання та технологічні параметри виробництва мРНК-вакцин

Ефективність виробництва мРНК-вакцин значною мірою визначається рівнем технологічного оснащення підприємства та можливістю точного контролю критичних параметрів процесу. Біотехнологічний цикл включає декілька взаємопов'язаних етапів – від отримання плазмідної ДНК до формування готового вакцинного препарату – кожен із яких потребує спеціалізованого обладнання [1].

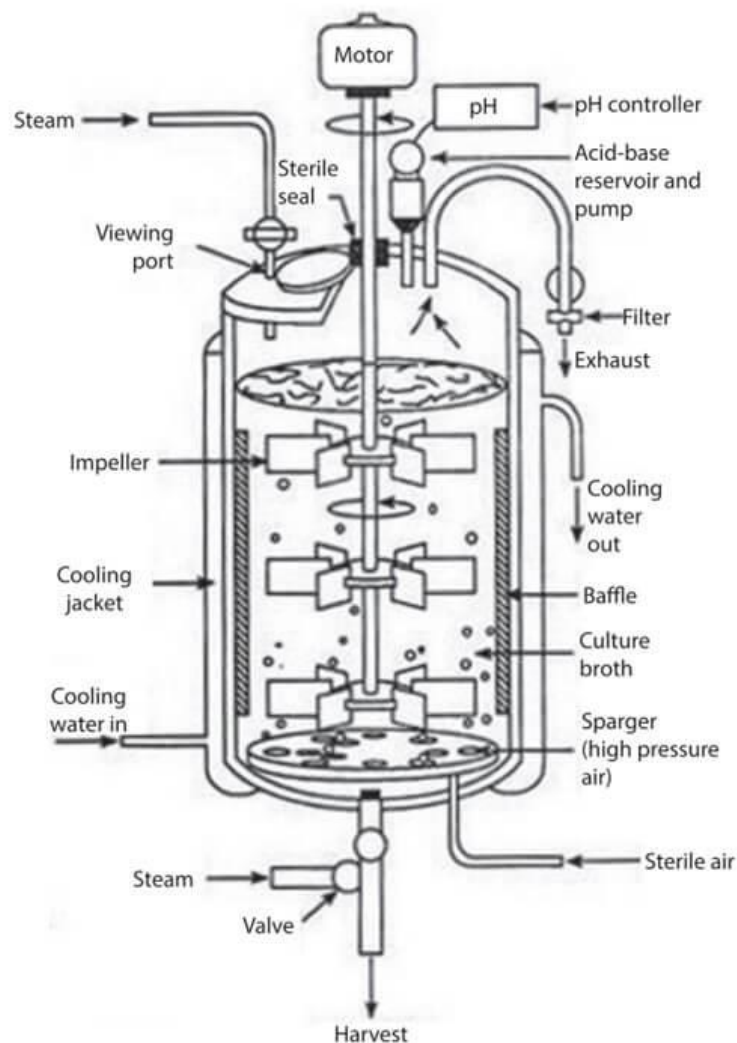


Рис. 2.1 Біореактор для вирощування *E. coli* з трансформованою плазмідною ДНК

Початковою стадією є культивування бактеріальних клітин, найчастіше *Escherichia coli*, у біореакторах із автоматизованими системами керування.

(рис. 2.1). Сучасні ферментери дозволяють контролювати температуру на рівні близько 37 °С, підтримувати рН у межах 6,8–7,4 та забезпечувати концентрацію розчиненого кисню не нижче 30 %, що є необхідним для інтенсивного росту клітин і накопичення плазмід [7].

Швидкість перемішування зазвичай варіює від 200 до 800 об/хв і сприяє рівномірному розподілу поживних компонентів. Після завершення ферментації біомасу відокремлюють за допомогою високошвидкісних центрифуг або систем тангенціальної фільтрації.

Подальший лізис клітин часто здійснюється у високотискових гомогенізаторах, де тиск може досягати 600–1500 бар, що забезпечує ефективне руйнування клітинних оболонок без значної деградації нуклеїнових кислот [7].

Очищення плазмідної ДНК проводять із застосуванням хроматографічних систем, зокрема іонообмінної хроматографії. Робочий тиск у колонках зазвичай становить 3–5 бар, що дозволяє досягати високої роздільної здатності та чистоти продукту [5].

Синтез мРНК відбувається шляхом ферментативної *in vitro* транскрипції з використанням РНК-полімерази бактеріофага Т7. Реакція найчастіше проходить при температурі 37 °С у буферному середовищі з концентрацією іонів магнію приблизно 5–20 мМ і триває від двох до шести годин залежно від довжини транскрипту [1, 8]. Після завершення транскрипції ДНК-матрицю видаляють ферментативною обробкою ДНКазою.

Наступним критичним етапом є очищення мРНК, яке може виконуватися методом високоефективної рідинної хроматографії або тангенціальної фільтрації з використанням мембран із порогом відсікання 100–300 кДа (рис. 2.2). Це дозволяє ефективно видаляти ферменти, залишкові нуклеотиди та дволанцюгові РНК-домішки, здатні спричинити небажані імунні реакції [8].

Для забезпечення стабільності та ефективної доставки мРНК застосовується технологія інкапсуляції у ліпідні наночастинки. Формування

таких частинок зазвичай здійснюється у мікрофлюїдних змішувачах, де водна фаза, що містить мРНК, швидко змішується з органічною фазою ліпідів. Контроль швидкості потоків і співвідношення фаз (приблизно 3:1) дозволяє отримувати наночастинки розміром 60–100 нм, які демонструють оптимальні характеристики для клітинного поглинання [9].

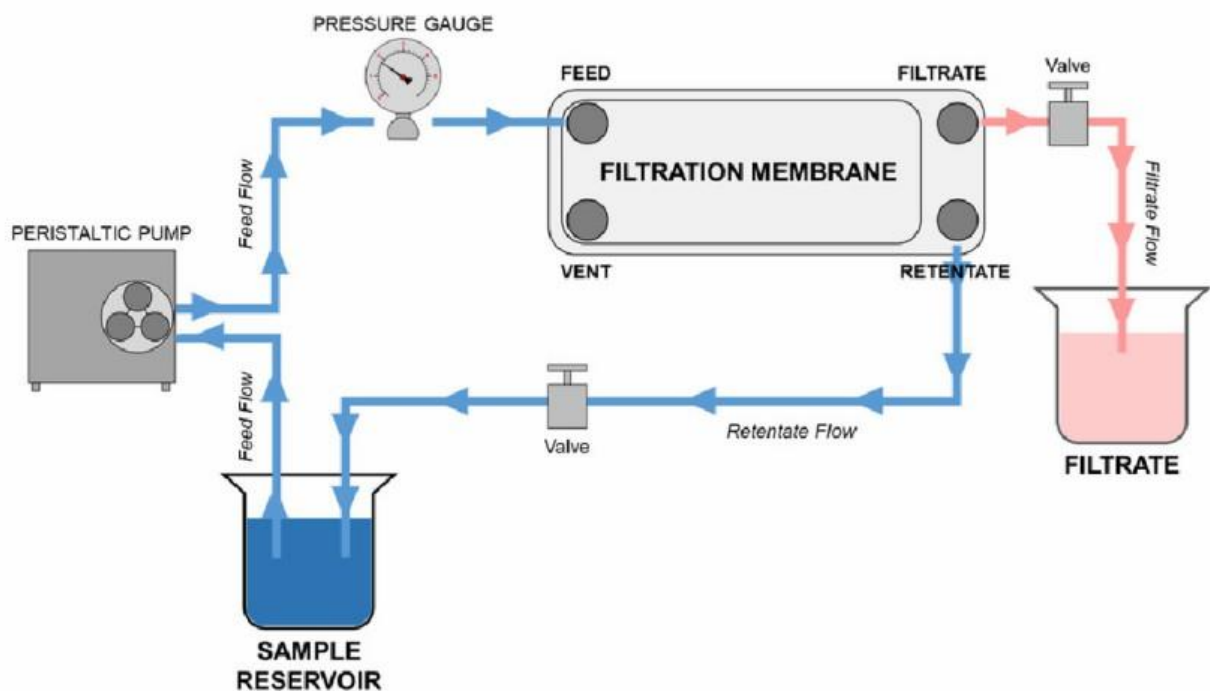


Рис. 2.2 Схема тангенціальної фільтрації

Перед розливом готовий препарат проходить стерильну фільтрацію через мембрани з діаметром пор 0,22 мкм, після чого здійснюється асептичне наповнення флаконів на автоматизованих виробничих лініях у середовищі з контрольованою чистотою [3].

Контроль якості реалізується із застосуванням спектрофотометрії для визначення концентрації РНК, капілярного електрофорезу для оцінки її цілісності, полімеразної ланцюгової реакції для виявлення залишкової ДНК,

методів динамічного світлорозсіювання для вимірювання розміру наночастинок та LAL-тесту для визначення рівня ендотоксинів [5].

Таким чином, виробництво мРНК-вакцин базується на інтеграції високоточного обладнання, автоматизованих систем керування та строгого контролю технологічних параметрів. Саме поєднання цих факторів забезпечує відтворюваність процесу та отримання якісного і безпечного біофармацевтичного препарату.

2.3 Вимоги GMP до виробництва мРНК-вакцин

Виробництво мРНК-вакцин, як і інших біофармацевтичних препаратів, повинно здійснюватися відповідно до принципів належної виробничої практики (Good Manufacturing Practice, GMP), що регламентують організацію виробничого процесу, контроль якості та управління ризиками. Дотримання стандартів GMP є обов'язковою умовою для забезпечення безпечності, ефективності та відтворюваності лікарських засобів [1].

Одним із фундаментальних принципів GMP є створення системи забезпечення якості, яка охоплює всі етапи життєвого циклу препарату – від закупівлі сировини до випуску готової продукції. Така система базується на документованих процедурах, що гарантують простежуваність кожної серії та можливість швидкого виявлення відхилень [2].

Особливе значення у виробництві мРНК-препаратів має контроль вихідних матеріалів. Плазмідна ДНК, ферменти, нуклеотиди та ліпідні компоненти повинні відповідати фармакопейним вимогам і проходити вхідний контроль якості. Будь-які домішки можуть впливати на стабільність мРНК або

викликати небажані імунні реакції, тому контроль чистоти є критично важливим [3].

GMP також висуває суворі вимоги до виробничих приміщень. (рис 2.3) Вони повинні бути спроектовані таким чином, щоб мінімізувати ризик контамінації та забезпечити логічну послідовність технологічних операцій. Для біотехнологічних препаратів особливо важливим є використання чистих кімнат із контрольованими параметрами повітря та системами HEPA-фільтрації [1].

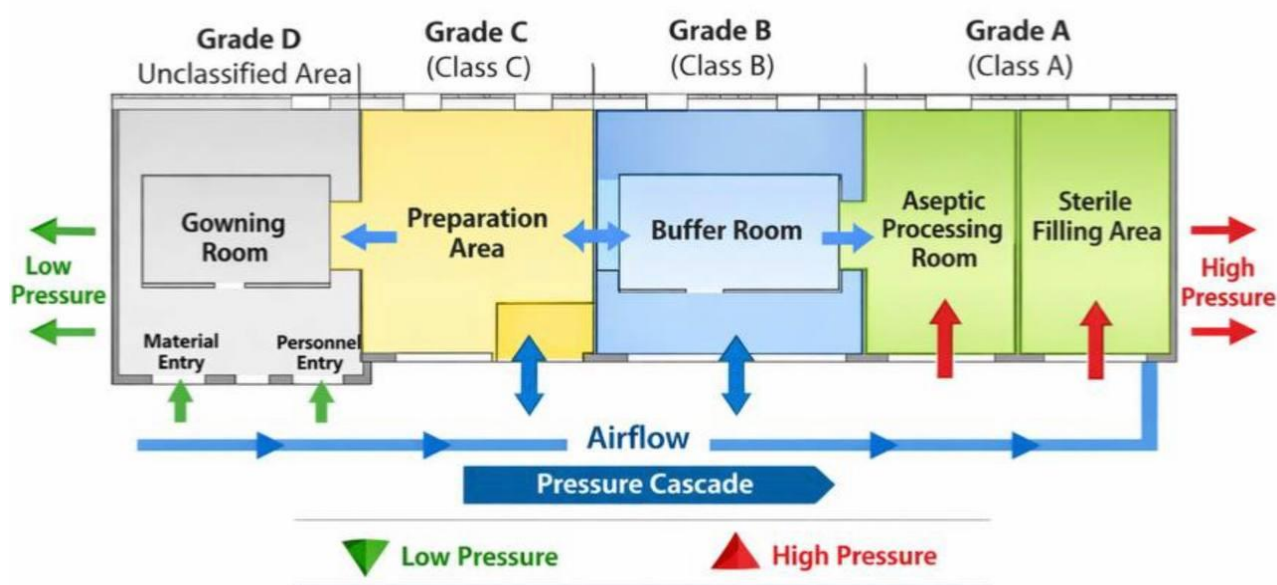


Рис 2.3 Схема проектування приміщень згідно GMP

Не менш важливим є кваліфікація обладнання. У фармацевтичній практиці застосовують концепцію DQ, IQ, OQ та PQ (Design, Installation, Operational, Performance Qualification), яка підтверджує, що обладнання правильно спроектоване, встановлене та функціонує відповідно до заданих параметрів [4].

Валідація процесів є ще одним ключовим елементом GMP. Виробник повинен довести, що технологічний процес стабільно забезпечує отримання продукту з наперед визначеними характеристиками. Це включає валідацію

критичних стадій – транскрипції, очищення мРНК, інкапсуляції у ліпідні наночастинки та стерильного наповнення [2].

Особливу роль відіграє управління ризиками для якості (Quality Risk Management). Цей підхід передбачає систематичну ідентифікацію потенційних загроз для продукту, оцінку їхнього впливу та впровадження стратегій контролю. У виробництві мРНК-вакцин до таких ризиків належать деградація РНК, мікробна контамінація та варіабельність характеристик наночастинок [5].

GMP також встановлює високі вимоги до персоналу. Працівники повинні мати відповідну освіту, проходити регулярне навчання та дотримуватися правил асептичної роботи. Оскільки людський фактор є одним із головних джерел контамінації, велика увага приділяється використанню стерильного одягу та контролю доступу до чистих зон [1].

Документація є невід’ємною складовою GMP. Усі виробничі операції повинні бути чітко задокументовані, включно з технологічними інструкціями, протоколами контролю якості та звітами про відхилення. Принцип «якщо це не задокументовано – це не виконано» є базовим для фармацевтичного виробництва [2].

Контроль стерильності має критичне значення для ін’єкційних препаратів. Він включає моніторинг виробничого середовища, тестування готової продукції та перевірку ефективності стерилізаційних процесів. Будь-яке відхилення може становити ризик для здоров’я пацієнтів [3].

Окрему увагу приділяють транспортуванню та зберіганню продукції. Система холодового ланцюга повинна бути валідованою, а температурні режими – безперервно контролюватися та документуватися [6].

Таким чином, впровадження вимог GMP у виробництво мРНК-вакцин забезпечує високий рівень контролю якості, знижує виробничі ризики та гарантує відповідність продукції міжнародним стандартам. Дотримання цих принципів є необхідною умовою для широкого застосування мРНК-технологій у сучасній медицині.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Процес виробництва мРНК-вакцин

3.1.1. Підготовка обладнання та комунікацій

На даному етапі проводиться мікробіологічний та технологічний контроль. Для миття обладнання та комунікацій використовується миючі та дезінфікуючі розчини, також використовується питна вода для ополіскування. Миття відбувається за температури 50-70 С протягом 2 год. Ополіскування триває 50-60 хв при температурі 80 С.

Стерилізація проводиться протягом 90 хв гострою парою при температурі 130 С. Після завершення проводиться контроль якості стерилізації та перевірка справності обладнання.

Підготовка виробничих приміщень за GMP передбачає розподіл їх на класи. У приміщеннях класу А кількість колоній у повітрі повинно бути в межах <1 КУО/м³ і ламінарний потік повітря в межах 0,45 м/с. Для забезпечення належних умов функціонування приміщення класу А навколо себе має приміщення класу В.

Наступними чистими зонами для реалізації виробництва є клас С і D, які несуть більший ризик контамінації в порівнянні з попередніми приміщеннями. Для них характерна кількість колоній у повітрі від 100 до 200 КУО/м³.

Подальшим етапом підготовки є очищення повітря. Для приміщень класу А це здійснюється за допомоги фільтрів третього ступеня, а саме фільтрів HEPA що забезпечують ефективність фільтрації більше 99% та відокремлюють частинки розміром 0,3 мкм.

Для приміщень класу С і D повітря пропускають через фільтри другого ступеня, що забезпечує 50-60% ефективності очищення та видалення механічних частинок розміром 1.5 мкм.

3.1.2. Загальні принципи виробництва мРНК-вакцин

Технологія виробництва мРНК-вакцин ґрунтується на застосуванні *in vitro* транскрипції (IVT), що дозволяє формувати синтетичні молекули інформаційної РНК поза межами живої клітини [35,36]. IVT-технологія розглядається як одна з найбільш гнучких платформ у сучасній вакцинології, оскільки основні виробничі етапи є універсальними і не залежать від конкретної антигенної послідовності [35,37].

Для отримання нової вакцини необхідно змінити лише фрагмент ДНК, що кодує білок-мішень, тоді як інші компоненти (кеп-структура, нетрансляційні області, полі(А)-хвіст та системи доставки) зберігаються без значних модифікацій [38].

Типовий процес включає послідовність операцій: конструювання плазмідної матриці, лінеаризацію ДНК-шаблону, транскрипцію *in vitro*, формування кап-структури та полі(А)-хвоста, очищення препарату, формуляцію в систему доставки, а також контроль якості та вивільнення лікарського препарату (рис.3.1) [39].

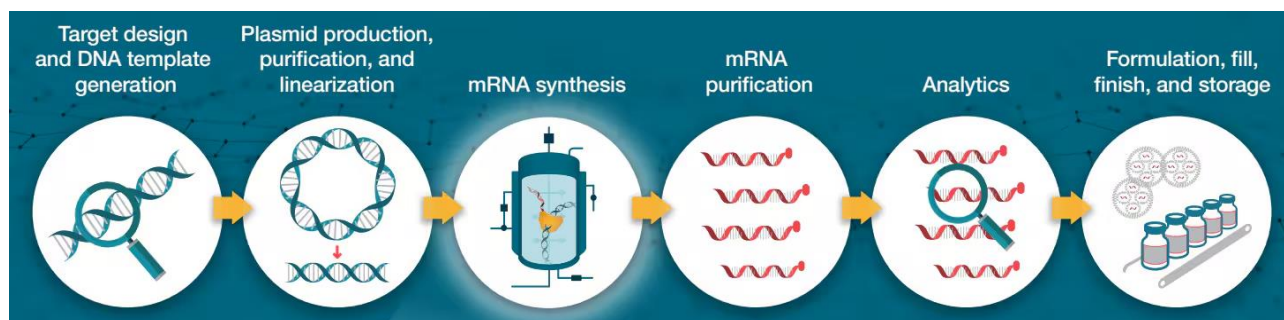


Рис. 3.1 Процес розробки мРНК-вакцин

Кожен з перелічених етапів впливає на якість, біологічну активність та імуногенність кінцевого продукту [40]. Платформний підхід дозволив досягти рекордно швидкої розробки вакцин проти SARS-CoV-2, що до пандемії вважалося технологічно неможливим. Так, для мРНК-вакцин BNT162b2

(BioNTech/Pfizer) та mRNA-1273 (Moderna) перехід від секвенування патогену до перших клінічних випробувань зайняв лише 60–70 днів [41, 42]. На відміну від традиційних платформ (живі атенуйовані, інактивовані, білкові або векторні вакцини), підхід на основі мРНК не потребує культивування патогенів, що суттєво знижує біологічні ризики та спрощує регуляторні вимоги до біобезпеки [43].

Ще однією принциповою перевагою є гнучкість у боротьбі з високовидозмінними патогенами, такими як SARS-CoV-2, ВІЛ або респіраторні віруси, де заміна антигену може бути виконана швидко без повного перепроєктування технології [41, 44]. Зокрема, мРНК-платформа стала першою, що була використана для створення оновлених «бустерних» вакцин проти нових варіантів SARS-CoV-2 (Omicron, XBB), зі збереженням тієї ж виробничої інфраструктури [44, 45]. У регуляторному полі мРНК-технологія вважається стандартизованою платформою, що потенційно дозволяє пришвидшити затвердження нових вакцин з аналогічною виробничою схемою за умови зміни лише антигенної послідовності [46].

З точки зору фармацевтичної промисловості платформа відповідає вимогам GMP, а її модульність дозволила великим виробникам швидко масштабувати виробництво під час пандемії завдяки використанню однотипних реакційних систем, реагентів та обладнання [45, 47].

Загалом, мРНК-технологія розглядається як основа для формування нового покоління вакцин, що включають як профілактичні, так і терапевтичні застосування, зокрема у сфері онкоімунології, вірусології та орфанних захворювань [48].

Плазмідна ДНК як стартовий шаблон для синтезу мРНК

Першим етапом виробництва мРНК-вакцин є створення плазмідної ДНК (пДНК), що виступає матрицею для *in vitro* транскрипції. Плазміда проєктується таким чином, щоб містити ключові елементи мРНК-конструкції:

промотор ДНК-залежної РНК-полімерази (зазвичай T7), 5'- та 3'-нетрансльовані області (UTR), відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує відповідний антиген, а також послідовність полі(A) або сигнал для поліаденилювання [35, 39]. У промисловій практиці найчастіше використовують плазмідні вектори на базі pUC або ColE1-репліконів, що забезпечують високий копійний рівень у бактеріальних клітинах *Escherichia coli* та дозволяють ефективно масштабувати виробництво в умовах ферментації [39].

Важливим аспектом є оптимізація кодуючої послідовності ORF, що включає корекцію GC-вмісту, вибір кодонів під пул транспортних РНК клітини-господаря, мінімізацію вторинних структур РНК та усунення мотивів, які можуть активувати внутрішньоклітинні сенсори вродженого імунітету (TLR3, RIG-I, PKR та інші) [36, 39]. Такі модифікації дозволяють підвищити трансляційну ефективність, а також знизити небажану інтерферон-опосередковану відповідь, що може зменшувати продукцію білка. Корекція 3'-UTR спрямована на підвищення стабільності транскрипту; у ряді платформ використовують комбінації елементів α - та β -глобіну, що сприяють більш тривалій експресії антигену [39].

Після завершення молекулярного конструювання плазміда трансформується у *E. coli* для отримання необхідної кількості ДНК, після чого вирощується у біореакторах (ферментери). Культивування проводиться за наступними параметрами: температура 37 C, рН 6,7-7,1, частота перемішування 300 об/хв. Загальний час культивування 4 доби.

На етапі виділення ключовим є видалення домішок, таких як бактеріальна геномна ДНК, білки, пептидоглікани та ендотоксини, які можуть викликати небажані імунні реакції або впливати на функціональні характеристики IVT-транскрипції [40].

Очищення пДНК проводять за допомогою хроматографічних методів відповідно до вимог GMP та регуляторних стандартів FDA та EMA [40,47]. Перед проведенням *in vitro* транскрипції плазмиду піддають лінеаризації

за допомогою рестрикційних ендонуклеаз. Лінеаризація забезпечує коректне завершення транскрипту та запобігає утворенню подовжених продуктів [39]. Фільтрація проводиться методом пропускання компонентів через керамічну мембрану з розміром пор 0.2 мкм.

***In vitro* транскрипція та синтез мРНК.** Після лінеаризації і фільтрації плазмідна ДНК використовується як матриця для процесу *in vitro* транскрипції (IVT), який є центральною біохімічною стадією виробництва мРНК-вакцин. IVT проводиться за участю ДНК-залежної РНК-полімерази (найчастіше Т7-полімерази), нуклеозидтрифосфатів (NTP), буферних компонентів та допоміжних факторів, що забезпечують ефективний переніс генетичної інформації з матриці ДНК на молекулу мРНК [35, 39].

Для промислових платформ IVT-процес оптимізують за параметрами рН, температури, концентрації солей та співвідношення субстратів, що дозволяє збільшити вихід продукту та мінімізувати побічні домішки [39].

На цьому етапі формуються фрагменти мРНК з 5'-кеп-структурою, яка є критичною для ініціації трансляції та стабільності транскрипту. Кеп може додаватися двома шляхами: ко-транскрипційно, коли кеп-аналог включається безпосередньо під час IVT, або ферментативно після транскрипції (посттранскрипційне кепування), що здійснюється за допомогою гуанілілтрансферази та 2'-О-метилтрансферази.

Вибір стратегії залежить від необхідного типу кепу (Cap0 або Cap1) та вимог до імуногенності кінцевого продукту [36, 41]. Cap1-структура вважається більш фізіологічною для еукаріотичних клітин та менш імуногенною, що позитивно впливає на трансляційну активність мРНК [36].

Іншим ключовим елементом є полі(А)-хвіст, який забезпечує стабільність та покращує трансляцію через взаємодію з полі(А)-зв'язуючими білками. Поліаденилювання може бути реалізоване різними методами: шляхом включення полі(А)-послідовності до плазміди, ферментативним додаванням

полі(А)-полімерази або за допомогою конструкцій з подвійним полі(А)-сигналом для підвищення однорідності хвоста [39]. Довжина полі(А)-хвоста впливає на швидкість деградації транскрипту та рівень експресії антигену, тому вона контролюється як критичний параметр продукту [36].

IVT може супроводжуватися утворенням небажаних побічних продуктів, таких як оліго-рибонуклеотиди, що є наслідком абортивної ініціації, або двониткова РНК (dsRNA), утворена внаслідок самодоповнення 3'-кінця або некоректної полімеразної активності (Рис 3.3). Двониткові РНК активують рецептори вродженого імунітету (MDA5, RIG-I) та індуюють інтерферон І типу, що може пригнічувати трансляцію антигену та знижувати ефективність вакцини [36, 44]. Тому видалення таких домішок є важливою частиною подальшого очищення.

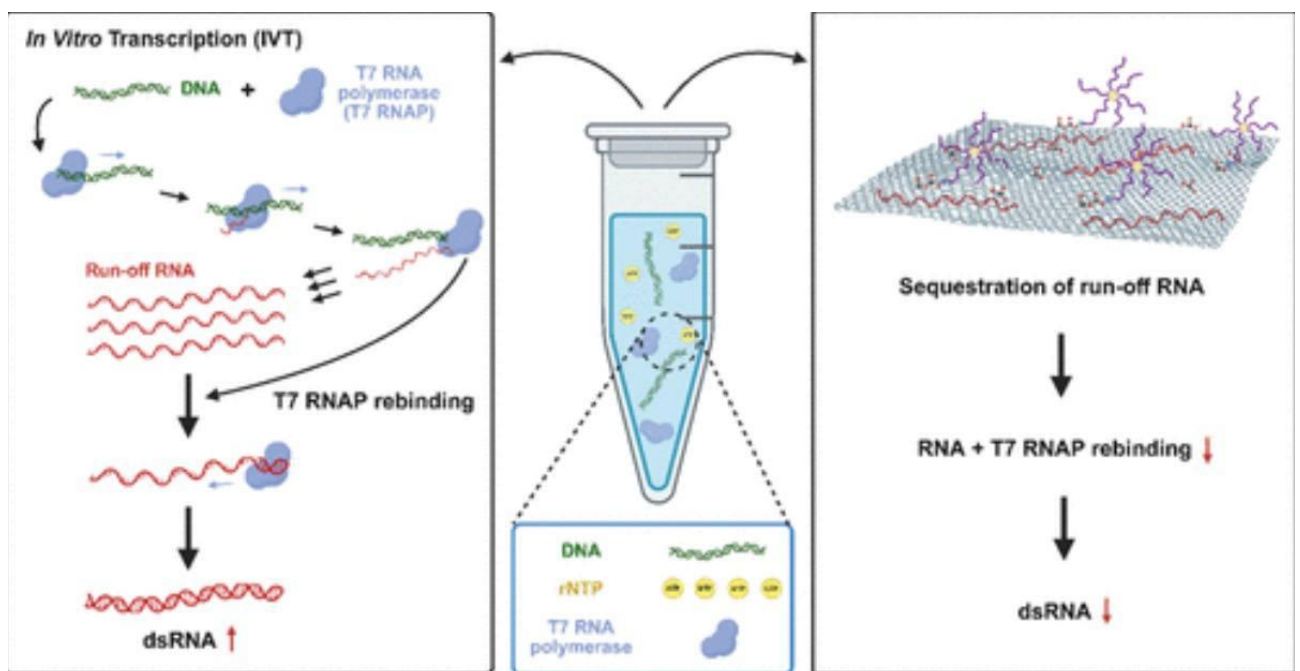


Рис. 3.2 In vitro транскрипція з використанням Т7 РНК-полімерази

Після завершення транскрипції проводиться ферментативне руйнування матричної ДНК за допомогою DNase, що запобігає перенесенню бактеріальних домішок до кінцевого продукту [39].

На цьому етапі формується активна субстанція мРНК, яка підлягає наступному очищенню та формуляції. IVT-процес вважається універсальним інструментом для платформи мРНК, оскільки зміна антигену не потребує переробки реакційних умов, ферментів чи виробничих систем, що спрощує масштабування та пришвидшує адаптацію технології для нових патогенів [41, 45].

Очищення мРНК та контроль домішок. Після завершення процесу *in vitro* транскрипції отриманий продукт містить не лише таргетну мРНК, але й низку небажаних домішок, які можуть впливати як на безпеку, так і на ефективність вакцини.

До таких домішок належать залишки ферментів IVT, неінкорпоровані нуклеозидтрифосфати, залишкова матрична ДНК, короткі оліго-рибонуклеотиди та двониткова РНК (dsRNA). Остання є особливо важливою мішенню для очищення, оскільки її присутність активує рецептори вродженого імунітету та індукує інтерферон I типу, що може істотно пригнічувати трансляцію антигену та знижувати імуногенність вакцини [36, 44].

Очищення мРНК є критичним виробничим етапом і проводиться шляхом застосування хроматографічних технологій, серед яких найбільш поширені аніонообмінна хроматографія (рис. 3.4), поділ за розміром (size-exclusion chromatography), а також вискоефективна рідинна хроматографія (HPLC). Аніонообмінні сорбенти дозволяють ефективно розділяти мРНК за довжиною фрагментів та зарядом, тоді як HPLC забезпечує високий ступінь очищення від малих домішок та dsRNA [40, 47].

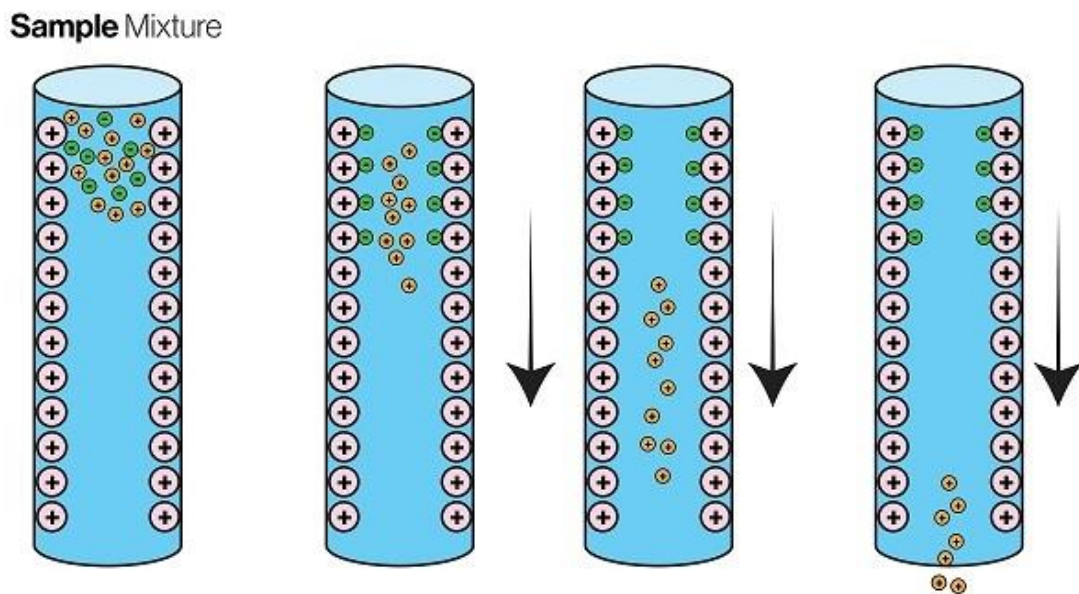


Рис. 3.3 Процес очищення мРНК за допомоги хроматографії

Альтернативні методи, такі як селюлозне очищення, ґрунтуються на здатності dsRNA зв'язуватися з селюлозою в присутності етанолу, що дозволяє селективно видаляти двониткові фрагменти з IVT-препарату. Використання подібних технологій продемонструвало зниження вродженої інтерферон-опосередкованої відповіді та підвищення експресії репортерних білків *in vitro* та *in vivo* [44].

Ключовим компонентом наступного етапу є ферментативне руйнування залишкової матричної ДНК за допомогою DNase, що усуває ризик перенесення бактеріальних генетичних компонентів у кінцевий продукт [39]. Залишки DNase та інших ферментів також підлягають видаленню шляхом додаткового очищення, оскільки вони можуть викликати небажані реакції або впливати на стабільність мРНК [40].

Очищений продукт проходить контроль чистоти та однорідності, включаючи аналіз довжини транскрипту, вміст dsRNA, наявність залишкової ДНК, співвідношення структурних форм мРНК, а також визначення концентрації та біологічної активності. Методи контролю включають RT-qPCR,

капілярний електрофорез, HPLC, тести на ендотоксини та клітинні тести для оцінки трансляційної активності [47].

У регуляторних вимогах ЕМА та FDA очищення мРНК від домішок розглядається як одна з основних умов безпеки та ефективності платформи, а ступінь очищення формально визначається як критичний параметр якості продукту (таб. 3.1) [46,47].

Таблиця 3.1.

Ознаки якості готової вакцини

Характеристика	Перевірка
Ідентичність	Підтвердження послідовності
Склад	Вміст РНК
Цільність	Відсоток інтактної м-РНК і фрагментів м-РНК
	5' cap
	3' poly(A)
	Цільність ланцюга м-РНК
Безпека	Ендотоксини
	Стерильність
	Біологічне навантаження
Чистота	Домішки з м-РНК
	Шаблон залишкової ДНК

Таким чином, очищення формує лікарську субстанцію мРНК, яка відповідає вимогам GMP і може бути введена у систему доставки на наступних етапах виробництва. Без ефективного очищення платформа мРНК не змогла б забезпечувати достатній рівень білкової експресії та імунної відповіді [36,44].

Інкапсуляція мРНК та системи доставки. Після очищення активна субстанція мРНК інкапсуляція у систему доставки, яка забезпечує її захист, транспортування та доставку у цитоплазму клітин-мішеней. Найбільш ефективною і на даний момент домінуючою системою для вакцин є ліпідні наночастинки (LNP-lipid nanoparticles).

Інкапсуляція мРНК у LNP здійснюється шляхом швидкого мікрофлюїдного змішування водного розчину мРНК з органічним розчином ліпідів. У процесі розведення органічного розчинника відбувається самозбірка наночастинок, у яких мРНК електростатично взаємодіє з іонізованими ліпідами.

LNP виконують ряд ключових функцій: захищають мРНК від деградації нуклеазами, сприяють клітинному поглинанню, забезпечують ендосомальний вихід транскрипту та підвищують трансляційну ефективність [35, 41, 49]. Типова LNP складається з чотирьох головних компонентів: іонізованого ліпиду, фосфоліпиду, холестерину та ліпідного компоненту з поліетиленгліколем (PEG-lipid), кожен з яких виконує специфічну роль у стабільності та транспорті конструкції [49].

Іонізований ліпід взаємодіє з негативно зарядженою мРНК та забезпечує доставку у цитозоль. Фосфоліпід формує бішарову структуру, подібну до клітинної мембрани. Холестерин регулює плинність наночастинок. PEG-ліпід забезпечує стабільність у кровотоці та уповільнює фагоцитоз [49, 50]. Процес формуляції LNP здійснюється шляхом мікрофлюїдизації, коли водний розчин мРНК змішується з ліпідним розчином у спирті у контрольованих умовах швидкого змішування. Така технологія дозволяє отримувати частинки з діаметром 60–120 нм та низькою полідисперсністю, що важливо для відтворюваності та GMP-виробництва [49].

Крім захисту від деградації, LNP забезпечують ефективне проникнення мРНК у клітину шляхом ендоцитозу. Після поглинання частинки потрапляють до ендосом, де зниження рН активує іонізований ліпід, який порушує мембрану

ендосоми та вивільняє мРНК у цитозоль. Ефективність ендосомального виходу є одним з найбільш критичних параметрів платформи, який впливає на кількість синтезованого антигену та загальну імунну відповідь [41, 50].

У практиці вакцинації LNP демонструють не лише високу трансляційну ефективність, але й органотропність, тобто здатність спрямовувати доставку у певні тканини. Для мРНК-вакцин проти COVID-19 найбільш важливою була доставка у м'язову тканину та її дендритні клітини, що дозволяє формувати адекватну презентацію антигену та стимулювати як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь [45, 49].

Розробка альтернативних носіїв, таких як полімерні наночастинки, ліпосоми, вірусоподібні частинки (VLP) та катіонні емульсії, триває, однак саме LNP наразі займають провідне місце у клінічно схвалених платформах через баланс ефективності, біосумісності та масштабованості виробництва [49]. Важливо, що LNP-технологія є платформною, що дозволяє застосовувати її для різних мРНК-конструкцій без зміни систем доставки, що знижує бар'єри для адаптації технології до нових патогенів [45, 49].

Таким чином, системи доставки мРНК є не лише транспортним засобом, а фактично другою половиною платформи мРНК-вакцин, що визначає не менше параметрів ефективності, ніж сам транскрипт [41].

3.2. Перспектива застосування мРНК-технологій

3.2.1. мРНК-вакцини проти інфекційних та неінфекційних захворювань

Технологія мРНК має значний потенціал для профілактики інфекційних захворювань, що виходить далеко за межі успішного застосування платформи проти SARS-CoV-2.

Особливий інтерес викликають патогени, щодо яких традиційні вакцинні підходи виявилися недостатньо ефективними або технічно складними. До таких патогенів належать вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), цитомегаловірус (CMV), вірус Епштейна–Барр (EBV), респіраторно-синцитіальний вірус (RSV), вірус Зіка, а також високоваріабельні інфекції, зокрема грип [41, 45, 51].

Платформа мРНК дозволяє швидко модифікувати антигенні послідовності, що є критичним для патогенів із високими темпами мутацій або антигенного дрейфу. Одним із найбільш складних об'єктів вакцинології є ВІЛ, для якого протягом десятиліть не вдалося створити ефективну профілактичну вакцину через високу мінливість вірусу та його здатність ухилятися від гуморальної та клітинної імунної відповіді [51].

Технологія мРНК у цій сфері дозволяє експресувати складні багантигенні конструкції, включаючи дизайн імуногенів на основі *germline targeting*, які спрямовані на індукцію широконейтралізуючих антитіл (bNAbs). Moderna та NIN наразі проводять клінічні випробування мРНК-кандидатів проти ВІЛ у фазі I [51, 52].

Перспективним напрямом є вакцини проти CMV, що становить ризик для новонароджених та імунокомпрометованих осіб. CMV-кандидати на основі мРНК спрямовані на індукцію як гуморальної, так і цитотоксичної відповіді через експресію глікопротеїнів gB та pentameric complex. Препарат Moderna mRNA-1647 знаходиться у фазі III клінічних досліджень [52].

Аналогічна технологія досліджується щодо вакцин проти EBV, де метою є профілактика інфекцій, асоційованих з онкогенними та аутоімунними ускладненнями [52].

Грип також є перспективним об'єктом для мРНК-технології через швидкі темпи антигенного дрейфу та зміну сезонних штамів. Відмінність мРНК-підходу полягає в можливості швидко оновлювати антигенні конструкції на основі циркулюючих штамів, що може зменшити часові затримки, властиві виробництву класичних інактивованих вакцин. Компанії Moderna та CureVac проводять клінічні випробування мультивалентних мРНК-кандидатів проти грипу [52, 53].

Цікаві результати отримано у сфері зоонозних інфекцій, зокрема вірусу Зіка, де платформа мРНК дозволяє кодувати структурні білки E та prM, індукуючи нейтралізуючі антитіла та клітинну відповідь [53]. Додатково вивчається застосування мРНК у боротьбі з туберкульозом, де необхідне поєднання гуморальної та Т-клітинної відповіді [53].

Таким чином, мРНК-вакцини мають потенціал змінити підходи до профілактики інфекцій, для яких традиційні платформи виявилися недостатньо ефективними або повільними у виробництві. Завдяки платформності, швидкій змінюваності антигену та здатності індукувати комплексну імунну відповідь, технологія розглядається як один з найбільш перспективних інструментів майбутньої вакцинології [41, 45].

Окрім вакцинології та онкоімунології, мРНК-технологія активно досліджується як платформа для лікування ряду неінфекційних та генетичних захворювань, де ключовим механізмом є експресія терапевтичних білків без інтеграції у геном. У цьому підході мРНК виконує роль тимчасового матриксу, що дозволяє організму синтезувати потрібний білок *in situ* [45, 54, 57]. Така стратегія може застосовуватися для заміщення дефіцитних білків, модифікації імунної реактивності або корекції метаболічних порушень.

Однією з найбільш перспективних сфер є лікування орфанних генетичних захворювань, пов'язаних із відсутністю або дефіцитом специфічних ферментів (наприклад, метаболічні хвороби лізосомного накопичення). Традиційні методи ферментозамісної терапії мають обмежену ефективність та високі витрати, тоді

як використання мРНК потенційно дозволяє забезпечити ендогенну продукцію ферменту [57].

Іншим напрямом є серцево-судинна патологія, зокрема відновлення тканини міокарда після інфаркту. Дослідження *in vivo* продемонстрували можливість експресії факторів росту та регенерації кардіоміоцитів за допомогою мРНК, що покращувало функціональні показники серця в тваринних моделях [57, 58].

Цікавим є застосування мРНК у модуляції імунної відповіді, зокрема у лікуванні автоімунних захворювань. На відміну від імуносупресивних препаратів, мРНК-платформа може бути спрямована на індукцію антиген-специфічної толерантності, що зменшує ризики системної імуносупресії [57].

Окремо досліджується експресія антитіл та білків-факторів, що зазвичай вводяться екзогенно, включаючи фактори згортання при гемофілії. Відмінність мРНК-терапії від традиційної білкової терапії полягає у можливості тканинно-специфічної експресії, що знижує вимоги до дозування та потенційно зменшує ризик імуногенності білка [58].

У технологічному вимірі мРНК-терапія стикається із викликами, пов'язаними із системною доставкою, тривалістю експресії та необхідністю уникнення небажаної інтерферон-опосередкованої відповіді. Проте успішні приклади терапевтичної експресії *in vivo* у тваринних моделях та перші клінічні випробування формують основу для переходу до ширшого клінічного застосування [54, 57].

У підсумку, мРНК-платформа поступово виходить за межі вакцинології та формує новий клас терапевтичних молекул. Перспективи включають орфанні генетичні захворювання, автоімунні стани, серцево-судинні патології, регенеративну медицину та білковозамісну терапію [45, 57, 58].

3.2.2. мРНК у онкології: персоналізовані вакцини та неоантигенні платформи

Однією з найбільш перспективних та інноваційних сфер застосування мРНК-технології є онкоімунологія. На відміну від профілактичних вакцин проти інфекційних агентів, онковакцини мають терапевтичний характер і спрямовані на активацію імунної системи проти пухлинних клітин [45, 54].

Центральним поняттям у цьому напрямі є неоантигени, що виникають внаслідок соматичних мутацій у пухлині й відсутні у нормальних тканинах організму. Саме неоантигени визначають імунну специфічність пухлини та можуть бути використані як мішені для індивідуалізованої вакцинації [54, 55].

Платформа мРНК забезпечує низку переваг для онкоімунології:

- По-перше, технологія дозволяє кодувати одночасно декілька неоантигенів або їх поєднання, що важливо для подолання пухлинної гетерогенності та механізмів ухилення від імунної відповіді.
- По-друге, мРНК-вакцини можуть бути виготовлені у персоналізованому форматі на основі секвенування пухлини конкретного пацієнта, що відкриває можливості для застосування персоналізованої медицини [54, 55].

У клінічному аспекті мРНК-вакцини здатні індукувати як CD4+, так і CD8+ Т-клітинну відповідь, що є критично важливим для контролю пухлинного росту [55].

Особливу увагу приділяють комбінаційним підходам із інгібіторами контрольних точок імунітету (checkpoint inhibitors), такими як анти-PD-1 та анти-CTLA-4, які вже змінили парадигму лікування меланоми та ряду солідних пухлин. Клінічні дослідження показали, що поєднання мРНК-вакцин з інгібіцією PD-1 підсилює протипухлинну відповідь та може зменшувати ризик рецидиву [55].

На технологічному рівні персоналізовані мРНК-вакцини проходять складний процес виробництва, що включає біопсію пухлини, секвенування

(WES + RNA-seq), ідентифікацію неоантигенів, алгоритмічну селекцію кандидатів, синтез мРНК та формуляцію у LNP. Провідні платформи, такі як BioNTech (iNeST) та Moderna (mRNA-4157), вже досягли клінічних випробувань фази II [55, 56].

Іншим напрямом є застосування мРНК для експресії цитокінів, хемокінів чи ко-стимуляторних молекул, а також для програмування дендритних клітин. Такі підходи можуть індукувати мікрооточення, сприятливе для інфільтрації пухлини Т-клітинами, або сприяти диференціації антигенпрезентуючих клітин [54, 56].

Переваги мРНК-технології в онкології пояснюють значний інтерес фармацевтичної індустрії. На даний момент активним є портфель клінічних досліджень у меланомі, недрібноклітинному раку легень, гліобластомі, колоректальному раку та раку молочної залози [56].

Одночасно ведеться розробка платформних алгоритмів для відбору неоантигенів, що використовують методи машинного навчання та прогнозування HLA-презентації [55, 56].

Таким чином, мРНК-технологія формує новий напрям терапевтичної вакцинології в онкології, який поєднує молекулярну біологію, біоінформатику та імунотерапію. Враховуючи успіх checkpoint-інгібіторів та CAR-T терапії, мРНК-вакцини мають потенціал зайняти місце у мультимодальних схемах лікування [45, 55].

3.3. Переваги та недоліки платформного підходу мРНК

Платформний підхід у мРНК-технології є одним із ключових чинників, що визначають її потенціал у сучасній вакцинології та терапії. На відміну від традиційних вакцин, де кожний продукт потребує повного циклу розробки, мРНК-платформа дозволяє зберігати інваріантними більшість виробничих процесів, змінюючи лише антиген-кодуючу послідовність. Це значно скорочує

час від ідентифікації мішені до отримання готового препарату та спрощує адаптацію технології до нових патогенів [41, 45].

Особливо важливим є відсутність необхідності працювати з живими патогенами, що знижує ризики біобезпеки та регуляторні бар'єри. До переваг платформи належить також висока гнучкість дизайну конструкцій, що дозволяє кодувати складні білки, мультиантигенні набори або неоантигени, а також експресувати білки, які важко отримати класичними методами [54, 56].

Крім того, мРНК не інтегрується у геном, що зменшує ризик мутагенезу, а тимчасовий характер експресії дозволяє зменшити токсичні ефекти, пов'язані з тривалою або неконтрольованою продукцією білків [45, 57].

Разом з тим, технологія має низку обмежень і викликів. Найважливішими серед них є питання доставки та стабільності, оскільки мРНК є хімічно нестабільною молекулою, яка швидко деградує під впливом нуклеаз. Хоча ліпідні наночастинки забезпечили прорив у цьому аспекті, вони водночас вимагають низькотемпературного зберігання та мають обмеження щодо системної доставки [41, 49].

Питання імунної активації також є предметом досліджень: надмірна інтерферон-опосередкована відповідь може пригнічувати трансляцію, тоді як недостатня активація може зменшувати імуногенність вакцин [36, 44]. Важливим технологічним викликом є масштабованість і вартість виробництва, особливо для персоналізованих онковакцин, де цикл виробництва повинен бути максимально скороченим та стандартизованим [55, 56].

Регуляторно мРНК-клас перебуває у процесі формування, і хоча пандемія SARS-CoV-2 пришвидшила стандартизацію процесів, потреба у додаткових довгострокових даних безпеки та ефективності залишається актуальною [46, 47]. До економічних аспектів належать питання інвестицій у виробничі потужності, спеціалізоване обладнання та холодовий ланцюг [47, 58].

Беручи до уваги усю попередню інформацію можна стверджувати, що платформа мРНК має значні переваги – гнучкість, швидкість розробки,

масштабованість і можливість персоналізації, – які роблять її одним із провідних напрямів біофармацевтичної індустрії.

Водночас обмеження, пов'язані з доставкою, стабільністю, виробничими витратами та логістикою, визначають напрям подальших наукових та технологічних досліджень [45, 49].

Перспектива клінічних досліджень і технологічного розвитку мРНК-платформи. Перспективи розвитку мРНК-технологій охоплюють як розширення спектра клінічних застосувань, так і вдосконалення виробничих, регуляторних та логістичних аспектів. На рівні клінічних випробувань очікується розширення кількості препаратів у сферах інфекційних захворювань, онкології, імуномодуляції та орфанних патологій.

Після пандемії SARS-CoV-2 платформа продемонструвала здатність до швидкої модифікації та масштабування, що сформувало новий підхід до «платформної реєстрації» лікарських засобів, де частину даних безпеки та ефективності можна переносити між продуктами, створеними на основі однієї технологічної платформи [41, 45, 47].

Перспективним є розвиток персоналізованої медицини, особливо в онкології, де неоантигенні вакцини можуть відігравати роль ад'ювантної терапії або комбінуватись із інгібіторами контрольних точок імунітету, CAR-T-клітинами та іншими імунотерапевтичними стратегіями [54–56].

Одночасно ведеться розробка універсальних мРНК-вакцин проти грипу та ВІЛ, що потребують швидкого оновлення антигенів з урахуванням еволюції патогена [51–53].

Технологічний розвиток платформи зосереджений на вдосконаленні систем доставки. Окрім ліпідних наночастинок першого покоління, досліджуються полімерні носії, ліпосоми, вірусоподібні частинки та тканинно-специфічні ліпідні формуляції, здатні підвищувати тривалість експресії або

забезпечувати селективну експресію білка в окремих органах чи тканинах [49, 57].

Стабільність та логістика залишаються одними з головних викликів. Розробка ліофілізованих форм мРНК-вакцин та формуляцій, що витримують умови холодильного або кімнатного зберігання, може суттєво спростити холододовий ланцюг та забезпечити доступ до терапії у регіонах із низькою інфраструктурою. Подібні підходи вже розглядаються ВООЗ у контексті глобальних програм вакцинації [47, 50].

Фармацевтичний сектор демонструє тенденцію до переходу на GMP-платформні виробництва, здатні оперативно змінювати продукт без заміни всієї технологічної лінії, що знижує бар'єри для розробки та скорочує час від проектування до клінічного застосування [45, 47].

Одночасно регуляторний ландшафт еволюціонує у напрямку платформного мислення, що позиціонує мРНК як одну з ключових технологій майбутньої фармацевтики. Всі ці аспекти ведуть до того, що майбутній розвиток мРНК-технології визначатиметься поєднанням клінічних, технологічних та регуляторних факторів. Її потенціал виходить за межі вакцинології та поступово формує нову категорію терапевтичних препаратів [45, 56–58].

ВИСНОВКИ

1. У кваліфікаційній роботі розглянуто наукові дослідження провідних зарубіжних та вітчизняних вчених щодо запровадження технології виробництва мРНК-вакцин як одних з найбільш перспективних напрямків сучасної вакцинології та біофармацевтики.

2. Встановлено, що технологія мРНК-вакцин поєднує в собі високий рівень гнучкості, можливість оперативної модифікації антигенних послідовностей, відсутність ризику геномної інтеграції та здатність індукувати комплексну імунну відповідь.

3. Проаналізовано процес виробництва мРНК-вакцин, який базується на поєднанні інженерії плазмідної ДНК, *in vitro* транскрипції, очищення та формування певних транспортних елементів для доставки мРНК-вакцин у певні клітини організму.

4. Система доставки на основі ліпідних наночастинок відіграє центральну роль у забезпеченні стабільності транскрипту, клітинного проникнення та ефективної цитозольної експресії.

5. У роботі розглянуто сучасні та перспективні напрямки застосування мРНК у медицині, зокрема їхні властивості забезпечили позитивний лікувальний ефект під час пандемії COVID-19 та визначили її потенціал у подальшому розвитку медичної науки.

6. Досліджено ключові переваги та недоліки використання мРНК-вакцин. До переваг належать швидкість розробки, універсальність, персоналізація та можливість стандартизації виробничих процесів. До недоліків – нестабільність мРНК, складність систем доставки, висока вартість виробництва та потреба у спеціалізованій інфраструктурі.

7. Розглянуто перспективи розвитку мРНК-технологій як розширення спектра клінічних застосувань, так і вдосконалення виробничих, регуляторних та логістичних аспектів. На рівні клінічних випробувань очікується розширення

кількості препаратів у сферах інфекційних захворювань, онкології, імуномодуляції та орфанних патологій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Pardi N., Hogan M. J., Porter F. W., Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018. Vol. 17. P. 261–279. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
2. Hou X., Zaks T., Langer R., Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery // *Nature Reviews Materials*. 2021. Vol. 6. P. 1078–1094. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
3. Karikó K., Buckstein M., Ni H., Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors // *Immunity*. 2005. Vol. 23, No. 2. P. 165–175.
4. Weissman D., Karikó K. mRNA vaccine development // *Molecular Therapy*. 2020. Vol. 28, No. 4. P. 999–1000.
5. Pullan S. T. et al. SARS-CoV-2 vaccines: rapid development and platforms // *The Lancet*. 2020. Vol. 395. P. 1339–1340.
6. Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI). 100-day vaccine mission overview. 2023. URL: <https://cepi.net>
7. World Health Organization. mRNA vaccine platform report. Geneva, 2023. URL: <https://www.who.int>
8. Centers for Disease Control and Prevention. mRNA COVID-19 vaccines. URL: <https://www.cdc.gov>
9. Brennan M. E. et al. Messenger RNA and protein expression after direct injection of DNA into mouse muscle // *Cell*. 1989. Vol. 57. P. 347–354.
10. Malone R. W., Felgner P. L., Verma I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. Vol. 86. P. 6077–6081.
11. Wolff J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo // *Science*. 1990. Vol. 247. P. 1465–1468.
12. Midoux P., Pichon C. Lipid-based mRNA vaccine delivery systems // *Biomaterials*. 2015. Vol. 48. P. 1–14.

13. Karikó K., Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress RNA recognition // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. Vol. 102. P. 183–188.
14. Karikó K. et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior translational capacity // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 29. P. 367–374.
15. Cullis P. R., Hope M. J. Lipid nanoparticle systems for nucleic acid delivery // *Molecular Therapy*. 2017. Vol. 25. P. 1467–1475.
16. Sahin U. et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity // *Nature*. 2017. Vol. 547. P. 222–226. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature23003>
17. Sahin U., Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy // *Science*. 2018. Vol. 359. P. 1355–1360.
18. The Nobel Assembly. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2023 — Karikó & Weissman. Stockholm, 2023. URL: <https://www.nobelprize.org>
19. Kis Z. et al. Rapid development and deployment of high-volume vaccines // *Biotechnology Journal*. 2021. Vol. 16. Article e2000600.
20. U.S. Food and Drug Administration. Vaccine platform regulatory guidance. Silver Spring, 2022. URL: <https://www.fda.gov>
21. European Medicines Agency. mRNA manufacturing & quality guidelines. 2022. URL: <https://www.ema.europa.eu>
22. Plotkin S., Orenstein W., Offit P. *Vaccines*. 7th ed. Elsevier, 2018. 1700 p.
23. Minor P. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges // *Virology Journal*. 2015. Vol. 12. Article 1–7.
24. Kushnir N. et al. Vaccine manufacturing: challenges and solutions // *Vaccine*. 2012. Vol. 31. P. 58–83.
25. Logunov D. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine // *The Lancet*. 2021. Vol. 397. P. 671–681.

26. Schlake T. et al. Developing mRNA-vaccine technologies // *RNA Biology*. 2014. Vol. 11. P. 1–13.
27. Blakney A. K. et al. The next generation of RNA vaccines // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021. Vol. 20. P. 817–838.
28. Kis Z., Shattock R., Shah N. et al. Modular manufacturing for mRNA vaccines // *Biotechnology Journal*. 2022. Vol. 17. Article e2100567.
29. Pardi N. et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA // *Nature Communications*. 2015. Vol. 6. Article 6589.
30. Thess A. et al. Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications // *Molecular Therapy*. 2015. Vol. 23. P. 1456–1464.
31. Geall A. J. et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109. P. 14604–14609.
32. Maruggi G. et al. mRNA vaccines — advances and perspectives // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2019. Vol. 59. P. 387–409.
33. Martin S. A. et al. Cap-dependent translation and mRNA stability // *Journal of Biological Chemistry*. 1975. Vol. 250. P. 9322–9329.
34. Gallie D. R. The role of untranslated regions in translational control // *Plant Molecular Biology*. 1993. Vol. 21. P. 1–11.
35. Roundtree I. A. et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation // *Cell*. 2017. Vol. 169. P. 1187–1200.
36. Sahin U. et al. Personalized neoantigen vaccines for cancer immunotherapy // *Nature Medicine*. 2019. Vol. 25. P. 1–9.
37. Moderna. Clinical pipeline overview. 2024. URL: <https://www.modernatx.com>
38. BioNTech. iNeST platform for personalized cancer vaccines. 2024. URL: <https://www.biontech.de>
39. National Institutes of Health. HIV mRNA vaccine trial report, Phase I. 2024. URL: <https://www.nih.gov>

40. Moderna. CMV vaccine mRNA-1647 Phase III update. 2023. URL: <https://www.modernatx.com>
41. Moderna. EBV vaccine program overview. 2023. URL: <https://www.modernatx.com>
42. Eyre T. et al. Germline-targeting immunogens for HIV vaccines // Science. 2022. Vol. 377. P. 1–8.
43. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. HIV bNAbs induction strategies. 2023. URL: <https://www.niaid.nih.gov>
44. Choi A. et al. Safety and immunogenicity of variant mRNA vaccine boosters // Nature Medicine. 2022. Vol. 28. P. 2025–2031.
45. John S. et al. A Zika virus modified mRNA vaccine protects against lethal infection // Cell Reports. 2017. Vol. 21. P. 1–10.
46. Bekker L.-G. et al. Tuberculosis vaccine candidates — new approaches // The Lancet Infectious Diseases. 2021. Vol. 21. P. e196–e205.
47. Kranz L. M. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells // Nature. 2016. Vol. 534. P. 396–401.
48. Ott P. A. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine // Nature. 2017. Vol. 547. P. 217–221.
49. Darvin P. et al. Immune checkpoint inhibitors // Nature Reviews Drug Discovery. 2018. Vol. 17. P. 401–414.
50. Sahin U., Türeci Ö. Cancer vaccines — the next generation // Science. 2020. Vol. 370. P. 1–9.
51. Schneeberger P. H. H. et al. mRNA-engineered dendritic cell vaccines // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. Article 672457.
52. Broos K. et al. Neoantigen prediction algorithms // Nature Biotechnology. 2022. Vol. 40. P. 163–173.
53. Moderna. mRNA cardiovascular therapy pipeline. 2023. URL: <https://www.modernatx.com>

54. Zangi L. et al. Modified mRNA directs cardiac regeneration // *Nature Biotechnology*. 2013. Vol. 31. P. 898–907.
55. De Jesus J. G. et al. mRNA for enzyme replacement therapy // *Molecular Therapy*. 2021. Vol. 29. P. 1664–1672.
56. Uddin F. et al. mRNA therapeutics in autoimmune diseases // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023. Vol. 22. P. 261–279.
57. Coalition for Epidemic Preparedness Innovations. mRNA platform regulatory roadmap. 2024. URL: <https://cepi.net>
58. World Health Organization. Global mRNA technology transfer initiative report. 2023. URL: <https://www.who.int>
59. European Medicines Agency. mRNA vaccine clinical & quality framework. 2024. URL: <https://www.ema.europa.eu>
60. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for platform technologies in vaccines. 2024. URL: <https://www.fda.gov>